

**Ação de Derivados de Monoterpenos e Indóis com
Atividade Quimioterápica sobre os Sistemas Transdutores
de Energia e na Contenção do Processo de Metástase**

RAUL FERRAZ ARRUDA

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE
FLUMINENSE DARCY RIBEIRO- UENF**

CAMPOS DOS GOYTACAZES /RJ
Dezembro - 2019

Ação de Derivados de Monoterpenos e Indóis com Atividade Quimioterápica sobre os Sistemas Transdutores de Energia e na Contenção do Processo de Metástase

RAUL FERRAZ ARRUDA

“Tese de doutorado apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia.”

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Rocha Façanha

Co-orientador: Prof. Dr. Adolfo Horn Jr.

CAMPOS DOS GOYTACAZES /RJ
Dezembro - 2019

Sumário

1. Introdução Geral	9
1.1 Câncer.....	9
1.2 Quimiorresistência	10
1.3. Alvos Moleculares na terapia contra o câncer	11
1.4. Estrutura e Funcionamento da V-ATPase	12
2. Capítulo I: Mecanismo de Ação de Monoterpenos Inibidores de Sistemas Transdutores de Energia na Contenção do Processo de Metástase.....	16
2.1 Introdução.....	16
2.1.1. Melanoma	16
2.1.2. Óleos essenciais.....	17
2.1.3 Mirtenal.....	18
2.1.4. Avaliação Termográfica.....	19
2.2. Justificativa.....	20
2.3. Objetivo Geral	21
2.3.1. Objetivos Específicos	21
2.4. Materiais e Métodos.....	22
2.4.1. Terpenos	22
2.4.2. Cultura de Células.....	22
2.4.3. Indução de Metástase	22
2.4.4. Controle de peso corporal.....	23
2.4.5. Sacrifício e análise histológica	24
2.4.6. Análises Histológicas.....	24
2.4.7. Fracionamento Celular.....	24
2.4.8. Dosagem de Proteínas.....	25
2.4.9. atividade de hidrólise da v atpase.....	26
2.4.10. Análise Termométrica.....	26
2.4.11. Análise Estatística	27
2.5. Resultados	28
2.5.1. Conjugado Mirtenal com Cisplatina	28
2.5.2. Indução de Metástase nos Linfonodos	29
2.5.3 Volume Tumoral.....	29
2.5.4. Análise Termométrica com MART.....	30

2.5.5. Atividade das bombas de Prótons dos tumores.....	31
2.5.6. Comparação da videotermometria com atividade das Bombas de prótons.....	32
2.6. Discussão.....	34
2.7. Conclusão.....	39
3. Capítulo II - Síntese, estrutura e atividade antiproliferativa de um novo complexo mononuclear de IAA-cobre (II) em células THP-1 de leucemia.....	40
3.1. Introdução.....	40
3.1.1. Leucemias.....	41
3.1.2. Classificação das Leucemias.....	42
3.1.3 Células THP-1 e Quimorresistência.....	42
3.1.4. Quimioterapia Antineoplásica.....	43
3.1.5. Complexos Metálicos.....	44
3.1.6 . Ácido indol-3-acético.....	46
3.1.7. Química de Coordenação.....	46
3.2. Justificativa.....	47
3. Objetivos.....	48
3.3.1. Objetivo Geral.....	48
3.3.2. Objetivos Específicos.....	48
3.4. Metodologia.....	49
3.4.1. Quimioterápicos.....	49
3.4.2. Caracterização Físico-química dos precursores ligantes e complexos.....	49
3.4.3. Cristalografia de Raios-X.....	49
3.4.4. Cultura de Células.....	49
3.4.5. Testes de viabilidade celular- Ensaio metabólico do MTT.....	50
3.4.6. Tratamento in vivo de tumor induzido por THP-1.....	50
3.4.7. Massa corpórea.....	50
3.5. Resultados.....	51
3.5.1 Síntese e estrutura do composto de coordenação de cobre (II)	51

3.5.2. Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio MTT.....	53
3.5.3. Teste de toxicidade aguda para o complexo IAA-cobre (1) - DL50.....	53
3.6. Discussão.....	56
4. Conclusões.....	59
5, Referências.....	61

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar a Deus por ter me possibilitado entrar no curso bem como me dar forças para prosseguir.

Agradeço a minha família que sempre me apoiou e incentivou.

Ao meu orientador Arnaldo Rocha Façanha pelos ensinamentos, paciência e dedicação.

Agradeço ao meu co-orientador Adolfo Horn por todos ensinamentos e suporte em seu laboratório – LCQUI/CCT/UENF.

A colega de doutorado e colaboradora Brunna Xavier Martins, pela parceria de 6 anos principalmente nos experimentos bioquímicos, contribuindo diretamente nos resultados alcançados.

Ao Dr. Hassan Jerdy, e Prof. Eulógio Carlos Q. de Carvalho (HV-UENF), pela valiosa colaboração nas análises histológicas, contribuindo diretamente para os resultados alcançados.

Ao Prof. André Lacerda (UEA HV-UENF) e a colega de doutorado Paula Cabral (Instituto Galzu) pela valiosa oportunidade de colaborar na validação do sistema MART de termometria, e pela parceria que tornou possível a descoberta das correlações entre a emissão térmica tumoral com a atividade das H^+ -ATPases.

Ao amigo, colega de doutorado e parceiro nos experimentos de síntese Jacques Douglas, que contribuiu efetivamente na síntese dos compostos.

Ao Prof. Wagner Terra (IFF) pela grande contribuição no artigo de qualificação e também na formatação final desse trabalho.

Aos colegas de laboratório por todos os momentos vividos!

Aos membros da banca pela inestimável colaboração para o aprimoramento desta tese.

A UENF pela estrutura e a CAPES pela bolsa de demanda social.

Resumo

O papel crucial exercido por sistemas que controlam o pH celular tem sido revelado por estudos seminais que têm descrito relações diretas entre mudanças no balanço acidificação/alcalinização do microambiente celular e tecidual, com o desenvolvimento de várias patologias, inclusive do câncer. Trabalhos publicados em meados do século XX por Otto Warburg já relatavam que o microambiente tumoral era mais ácido do que o de tecidos normais, devido ao aumento do fluxo glicolítico com consequente geração de ácido láctico. Atualmente, já é bem estabelecido que tal acidificação leva ao aumento na transcrição de fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e de interleucinas, intensificando a expressão de catepsinas e metaloproteases, podendo levar também ao aumento da atividade do Fator Nuclear Kappa B (NF- κ B), desencadeando a migração de vesículas secretórias para a periferia celular e a exocitose de seus produtos. As V-ATPases presentes nestas vesículas e na membrana plasmática das células tumorais, possuem potencial para exercer um controle fino da acidificação e alcalinização de microdomínios nas membranas celulares, no citoplasma e no meio extracelular e. O envolvimento destas H⁺-ATPases com diferentes rotas de sinalização, como a de HIF, mTOR e TGF- β , e nas interações com o sistema imune no microambiente tumoral, tem sido relatado como elemento chave integrante de processos como a quimiorresistência, grau da malignidade, migração, invasão e proliferação. Nesta tese, a inibição dessas bombas iônicas é evidenciada como opção no combate ao câncer, por meio da validação do potencial quimioterápico de terpenoides e indóis derivados de plantas. Evidências bioquímicas e celulares demonstram que monoterpenos o mirtenal, o ácido indolacético (AIA) e complexos derivados destas moléculas, podem levar à indução de morte celular programada e atenuação da proliferação e metástase de células tumorais de melanoma e leucemia. Os resultados obtidos abrem novas vias para a pesquisa de produtos naturais e derivados sintéticos capazes de seletivamente inibir as V-ATPases de células tumorais, e assim, impedir a condição ácida e os distúrbios bioenergéticos que levam a tumorigênese e metástase em diferentes tipos de cânceres. O mecanismo de ação proposto também fornece bases bioquímicas e moleculares para ampliar nossa compreensão da reprogramação metabólica envolvida na indução e progressão tumoral.

Palavras Chaves: Acidificação tumoral, Oncologia Molecular, Fitoterápicos.

Abstract

A crucial role played by the main systems that control the cell pH has emerged from seminal studies that revealed direct relationships between transitions of acidification and alkalization in cell and tissue microenvironments with development of various pathologies, including cancers. More than 50 years ago Warburg reported that the tumor microenvironment would be more acidic than normal tissues due to a increased glycolytic flow along with the lactic acid generation. It is now well-known that this acidification leads to increased transcription of vascular endothelial growth factors (VEGF) and interleukins, intensifying the expression of cathepsins and metalloproteases, and may also lead to increase the Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) activity, triggering a migration of secretory vesicles to the cell periphery and the exocytosis of their contents. V-ATPases are proton pumps present in the membrane of these vesicles and also in tumor cell plasma membranes, which play a fine control of the pHs of extracellular and cytoplasmic microdomains, respectively. The involvement of these H⁺-ATPases with different signaling pathways, such as that triggered by HIF, mTOR and TGF- β , and their functional interactions with the tumor microenvironment immune system has been reported to be part of chemoresistance, malignancy, migration, invasion and proliferation. In this work, it was demonstrated that the inhibition of these proton pumps by plant-derived monoterpenes and indoles, more specifically by mirtenol and Auxins, and some derived complexes, can cause melanoma and leukemia cells death and attenuate their proliferation and metastasis. The results obtained in this work open new avenues for the natural product research as a base to the development of new synthetic drugs directed to selectively inhibiting tumor V-ATPases, and thus, preventing the bioenergetic reprogramming that leads to tumor cell proliferation and metastasis in different types of cancer. The proposed mechanism of action also provides biochemical and molecular basis to broaden our understanding of the metabolic reprogramming of the tumor induction and progress.

Keywords: Tumorigenesis, anticancer molecular targets, herbal medicines.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Câncer

No âmbito da patologia, o câncer compreende um conjunto de mais de uma centena de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células malignas, ou seja, que apresentam alterações genéticas que lhes conferem a capacidade de se proliferar e invadir outros órgãos e tecidos (metástases). As células cancerígenas possuem características próprias que as diferem das células sadias do tecido original, pois as alterações genéticas pelas quais passaram resultam na perda da identidade tecidual e prejudicam o funcionamento harmônico do tecido, órgão e organismo afetados (Kumar *et al.*, 2005).

Quando uma massa tumoral apresenta células que se dividem lentamente sem apresentar potencial invasivo, isto é indicativo da formação dos chamados tumores benignos, os que não produzem metástases e são altamente diferenciados, apresentando escassa mitose, raramente produzindo riscos à saúde (Domingo *et al.*, 2008). Por outro lado, os tumores malignos apresentam células que se dividem desordenadamente e devido a sua baixa diferenciação, adquirem a capacidade de se proliferar indefinidamente e migrar para vários órgãos levando a formação de metástases (Bacac & Stamenkovic, 2008). Os cânceres se classificam em três grupos: os de mucosas e células epiteliais são denominados carcinomas, os de tecidos conjuntivos, como ossos, músculos ou cartilagens são os sarcomas e o terceiro grupo de cânceres são os de tecido sanguíneo, conhecidos como leucemias (Kumar *et al.*, 2005).

O envelhecimento naturalmente leva ao acúmulo de mutações no genoma das células, o que aumentam a suscetibilidade à transformação maligna. Mas dentre os casos registrados cerca de 80 a 90% podem ser associados à exposição a fatores ambientais mutagênicos, tais como o fumo, radiação solar e outras fontes de radiação ionizantes, e alguns vírus oncogênicos. Porém, o surgimento de um câncer também depende da intensidade e duração da exposição das células aos agentes causadores (Sober *et al.*, 2001; Sondak *et al.*, 2004).

Segundo a organização mundial de saúde (OMS/WHO) o número de mortes por câncer no mundo deve aumentar 45% até 2030, em 2018 o número de mortes foi de 9,6 milhões em 2030 esse número deve chegar 11,5 milhões (WHO, 2020). No Brasil, segundo o INCA, em 2020 surgiram 429.990 novos casos de câncer no Brasil sendo 225.980 em homens e 223.110 em mulheres.

1.2. Quimiorresistência

Apesar dos avanços no tratamento contra o câncer a resistência aos agentes quimioterápicos continua como uma das principais razões para a falha no tratamento em pacientes com câncer. A resistência a múltiplas drogas é o principal mecanismo que leva à aquisição do fenótipo multirresistente através da expressão de transportadores de efluxo de moléculas com baixa seletividade, tais como a glicoproteína P (Pgp) codificada pelo gene MDR1 de membrana plasmática, pertencente à família das proteínas associadas a resistência a múltiplas drogas (MDR; *Multidrug-resistance-associated protein*, ou simplesmente, *Multidrug resistance proteins*) (Pérez - Saýans *et al*, 2010).

As glicoproteínas P (Pgp) assim como todas as MDR pertencem a superfamília de transportadores ABC (*ATP-binding cassette transporters*). Estas proteínas transportadoras comportam-se como bombas, catalisando o transporte ativo (dependente da hidrólise de ATP) para o meio extracelular, de moléculas exógenas de forma inespecífica, permitindo as células tumorais evitar os efeitos tóxicos de várias drogas terapêuticas. A expressão de diferentes níveis de Pgp tem sido correlacionada com o grau e resistência a drogas tumoral, sendo baixos níveis encontrados em células pouco resistentes. Glicoproteínas P também são encontradas em tecidos saudáveis, com os maiores níveis encontrados nas glândulas suprarrenais, rins, mucosa intestinal e fígado, sugerindo que estas glicoproteínas estão envolvidas na desintoxicação e transporte de moléculas lipofílicas (Pérez-Saýans *et al.*, 2010).

Outras moléculas também são apontadas como responsáveis pela resistência à múltiplas drogas, incluindo a glutatona S-transferase-p e a DNA topoisomerase II. Entretanto, mesmo a ação destas moléculas, em conjunto,

ainda não exaurem totalmente os diferentes mecanismos necessários para explicar o complexo fenômeno de resistência a múltiplas drogas expressa pela maioria dos tumores.

1.3. Alvos moleculares na terapia anticâncer

Diversas abordagens moleculares estão em contínua investigação produzindo informações seminais sobre novos alvos mais seletivos, capazes de prover uma atuação mais precisa dos agentes antitumorais, visando minimizar possíveis efeitos colaterais e danos as células sadias. Informações fornecidas por marcadores moleculares e análises histológicas podem possibilitar a distinção de amostras com maior ou menor potencial de agressividade tumoral, ou seja, se relacionam com o prognóstico. Elementos como EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), KRAS (*Kirsten rat sarcoma vírus*), BRAF, TP53, HER2, EML4-ALK (*Echinoderm microtubule-associated protein-like4/Anaplastic lymphoma kinase*), MET, RE (receptor de estrógeno) e RP (receptor de progesterona) estão entre as alterações moleculares mais conhecidas, e com comprovada aplicabilidade prognóstica (Chimenti *et al.*, 2011).

A partir do trabalho seminal de Martinez-Zaguilan e colaboradores (1993), descrevendo pela primeira vez a expressão diferencial de V-ATPases na membrana plasmática nas células tumorais, a investigação da desregulação do pH intra e extracelular, passou a merecer crescente atenção na pesquisa das bases moleculares da reprogramação metabólica oncológica. A desregulação do pH é uma característica adaptativa da maioria dos tipos de câncer, independentemente da sua origem genética ou tecidual. Um pH intracelular neutro/levemente alcalino é permissivo à proliferação celular e evasão da apoptose e de outros tipos de morte celular programada. A diminuição do pH extracelular favorece a evasão da resposta imune contra o tumor, promove o remodelamento da matriz extracelular e estimula proteases ativadas por ácido, facilitando a invasão e disseminação das células tumorais (Chimenti *et al.*, 2011).

1.4. Estrutura e Funcionamento da V-ATPase

As V-ATPases são complexos proteicos compostos por pelo menos 13 polipeptídeos diferentes organizados em dois domínios, além de proteínas acessórias funcionais na montagem e estabilidade estrutural da holoenzima. O domínio V_0 é o domínio transmembranar responsável pela translocação de prótons. É constituído por seis subunidades diferentes – designadas a, d, e, c, c' c'' (eucariotos superiores não possuem subunidade c'). Estas proteínas (c, c', c'') são altamente hidrofóbicas, e formam um anel inserido na membrana plasmática. A translocação de prótons é feita pela rotação deste anel proteolipídico, do qual também participa diretamente a subunidade 'a', a qual possui em sua configuração estrutural terciária, dois hemi-canaís por onde são transportados os prótons (Forgac, 2007). O domínio V_1 é o mais periférico e está localizado na face citoplasmática da membrana. Este é responsável pela hidrólise de ATP, sendo composto por 8 subunidades (A, B, C, D, E, F, G, H), algumas das quais presentes repetidamente na holoenzima. Trímeros das subunidades A e B interagem estruturalmente de forma alternada formando um arranjo hexamérico, domínio no qual se encontram os três sítios catalíticos da enzima, onde ocorre a catálise da hidrólise de ATP em ADP e P_i (Forgac, 2007).

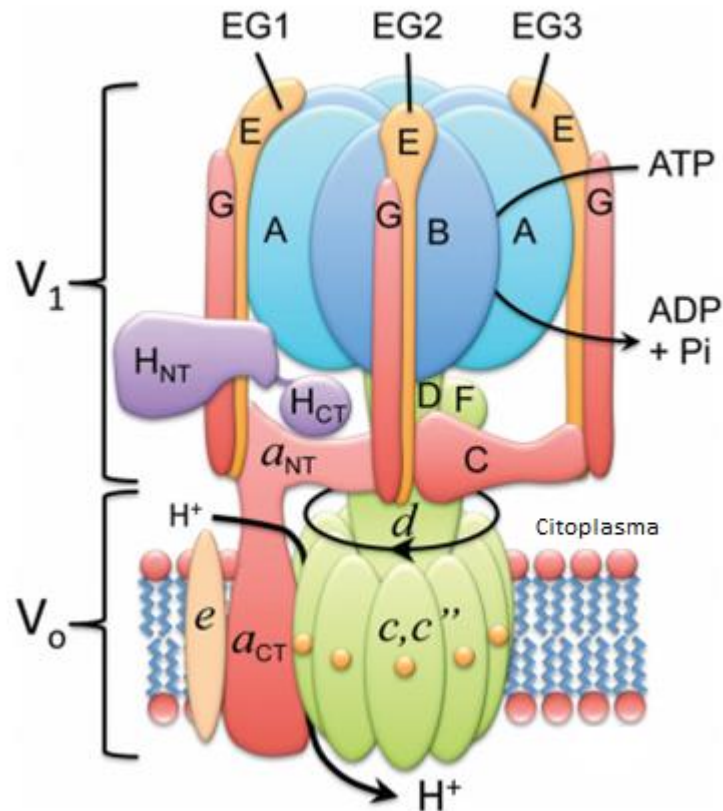


Figura 1. Estrutura da V-ATPase. O complexo da (V-) ATPase vacuolar é composto por um domínio periférico, responsável pela hidrólise de ATP (V₁); e um domínio integral de membrana (V₀) que está envolvido na translocação de prótons através da membrana. (Adaptado de McGuire, 2017)

Na V-ATPase, a maioria de suas subunidades constituintes formam elementos de suporte, estabilização e conexão, ligando os dois domínios V₁ e V₀. Tal qual descrito originalmente para as F-ATPases, as V-ATPases também têm sido descritas como ‘nanomotores moleculares’. O suporte central constituído pelas subunidades d, D e F se estruturam funcionalmente como um eixo de rotor, que acopla a energia libertada da hidrólise de ATP no domínio catalítico V₁ à rotação de componentes do domínio V₀. O suporte periférico, formado pelas subunidades C, E, G, H e domínio N-terminal da subunidade a, tem como função prevenir a rotação do complexo formado pelas subunidades A e B durante o funcionamento da bomba, servindo desta forma como “stator”. As subunidades componentes do “stator” não só estabilizam todo o complexo durante o processo de rotação como também participam de forma determinante na regulação da V-ATPase (McGuire, 2017).

O transporte de prótons através da V-ATPase é feito através de um mecanismo energizado pela hidrólise de ATP no domínio catalítico da enzima A_3B_3 , onde mudanças conformacionais induzidas na subunidade A, gera uma força de torque rotacional (FIG. 2). Assim, quando os prótons entram no complexo V_0 através de um dos hemi-canais na subunidade a, ocorre a protonação de sítios de ligação existentes no anel proteolípídico composto pelas subunidades c, c' e c''. À medida que o torque produzido em A rotaciona o complexo D, F, d, que compõe o eixo que integra V_1 com V_0 , as mudanças conformacionais induzidas pela hidrólise de ATP se propagam para o complexo a, c, c' e c'' que compõe o canal de H^+ cuja integração de suas próprias dinâmicas moleculares induzidas por estas mudanças conformacionais criam um movimento rotacional em todo o complexo do domínio V_0 transmembranar, e este gira, criando uma sequência de mudanças conformacionais nos domínios protonados do rotor, fazendo com que os prótons atravessem a bicamada lipídica ao completar uma volta completa no canal e regressar à subunidade a, mas desta vez ao hemi-canal de saída (Cipriano *et al.*, 2008).

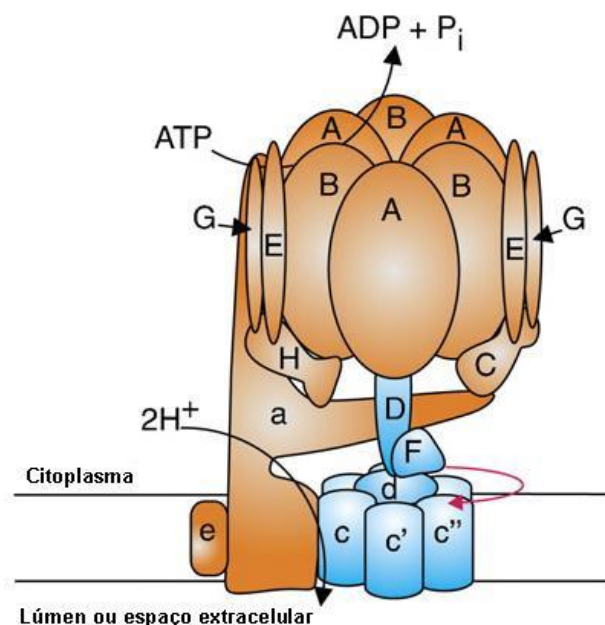


Figura 2. Mecanismo rotacional de translocação de prótons da V-ATPase. A hidrólise de ATP provoca alterações conformacionais nas subunidades A do domínio V_1 , que gera a rotação do rotor. Entretanto, os prótons entram no complexo V_0 através de um dos hemi-canais na subunidade a, ligando-se a um dos locais de ligação existentes no anel proteolípido e saindo para o lúmen ou espaço extracelular através do segundo hemi-canal (Adaptado de Cipriano *et al.*, 2008).

V-ATPases podem estar presentes tanto nas membranas de compartimentos intracelulares como na membrana plasmática (Hinton *et al.*, 2009). No primeiro caso, estas membranas delimitam as cisternas e vesículas do Complexo de Golgi, vesículas endossomais, lisossomais, vacúolos (no caso de células vegetais e fúngicas) e vesículas secretoras. Com tão ampla distribuição, as V-ATPases participam em todos os passos do caminho secretório de proteínas e do tráfego vesicular vital para o metabolismo da célula, exercendo papéis fundamentais desde a formação de endossomos precoces, a acidificação de endossomos tardios e lisossomais, até a formação e função dos autofagossomos. Este sistema primário de transporte iônico exerce funções fundamentais também na membrana plasmática ao participar da geração e controle de potenciais de membrana, tendo a capacidade de energizar processos de transporte secundários acoplados, funcionando assim na importação e/ou exportação de várias moléculas e íons. As V-ATPases estão naturalmente presentes na membrana plasmática de alguns tipos celulares (figura 4), como nos hepatócitos (Stone *et al.*, 1989), macrófagos (Swallow *et al.*, 1990), osteoclastos (Väänänen *et. al.*, 1990), células epiteliais (Turrini *et al.*, 1989), células parientais (Väänänen *et. al.*, 1990), células secretoras do trato urinário, células intercaladas do ducto coletor renal, e membranas apicais do intestino médio de insetos (Macguire, 2017). A V-ATPase também é fundamental na regulação do pH citoplasmático das células, por exemplo, no equilíbrio do processo de manutenção do esqueleto ósseo e no armazenamento do esperma no epidídimo e vaso deferente. Nas células tumorais está diretamente relacionada na manutenção do pH ácido extracelular e também na migração das células durante a angiogênese e a invasão das células tumorais (Mcguire, 2017).

2. Capítulo I: Mecanismo de Ação de Monoterpenos Inibidores de Sistemas Transdutores de Energia na Contenção do Processo de Metástase

2.1. Introdução

2.1.1. Melanoma

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou que para cada ano do triênio 2020/2022 sejam diagnosticados no Brasil 8459 casos de câncer de pele tipo melanoma (4200 em homens e 4250 em mulheres). Esses valores correspondem há um risco estimado de 4,03 novos casos a cada 100 mil homens e 3,94 para cada 100 mil mulheres.

A quebra da homeostase do melanócito é considerada a base para o desenvolvimento e progressão do melanoma. Os melanócitos são células dendríticas originárias da crista neural, que migram durante o desenvolvimento embrionário para a epiderme e cuja principal função é a síntese e transferência dos grânulos de melanina para os queratinócitos circunvizinhos (Slominski *et al.*, 1995). O melanoma surge então, quando os melanócitos tornam-se malignos, sendo denominado cutâneo quando se originam da pele, ou intraocular (ou ocular) quando se origina nos olhos (GBM, 2012). Inicia-se como uma lesão escura que aumenta de tamanho em extensão, apresentando características de fácil reconhecimento como Assimetria, Bordas irregulares, Coloração variada, e Diâmetro maior que 6 milímetros (sistema diagnóstico ABCD do melanoma). Podem ocorrer modificações como dor, coceira, regressão (desaparecimento de parte ou total), manchas ou pontos escuros ao redor da região, sangramento e pequena ferida na superfície, (Domingues, 2018).

Devido à alta capacidade de invasão e metástase, a detecção precoce é essencial para o tratamento, pois melanomas primários são amplamente curáveis através de remoção cirúrgica, enquanto o tratamento da doença avançada tem uma probabilidade de cura menor que 5% (Kieran *et al.*, 2008).

Atualmente, o tratamento contra melanomas, inclui radioterapia e quimioterapia de controle hormonal quando diagnosticados precocemente, todavia, em estágios avançados, o tratamento passa a ser somente paliativo e as drogas mais usadas são Ipilimumab, vemurafenib e cisplatina (INCA, 2015).

2.1.2. Óleos Essenciais

Óleos essenciais de extratos vegetais têm sido usados para uma grande variedade de propósitos estéticos, alimentares e medicinais durante milhares de anos (Jones, 1996). Estes efeitos variam desde o uso de jacarandá e cedro na perfumaria, ou na aromatização de bebidas com limão, erva-doce ou óleo de bagas de zimbro (Lawless, 1995), bem como a aplicação de óleo de capim-limão para a preservação de grãos e outros gêneros alimentares armazenados (Mishra & Dubey, 1994). Em particular, a atividade antimicrobiana de óleos de extratos vegetais e seus princípios ativos tem fundamentado suas múltiplas aplicações, incluindo o uso extensivo de extratos brutos ou processados na conservação de alimentos, síntese produtos farmacêuticos, medicina alternativa e terapias naturais (Lis-Balchin & Deans, 1997).

Na maioria dos casos os óleos essenciais têm uma composição química bastante complexa, contendo vários tipos de carboidratos, álcoois, éteres, aldeídos e cetonas, os quais são responsáveis pelas propriedades organolépticas e farmacológicas de plantas aromáticas e medicinais. Mas muitos constituintes de óleos essenciais são metabólitos secundários vestigiais, como os fenilpropanóides e terpenóides, usualmente presentes em diminutas concentrações, no entanto, por vezes são estes os que apresentam as principais funções medicinais e organoléptica. Dentre estes, merece destaque os terpenos, moléculas voláteis com a faixa do ponto de ebulição de 140 - 180 °C, dotados de efeitos farmacológicos que incluem propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes (e.g., Golan *et al.*, 2014) e anticarcinogênicas (e.g., Brandão *et al.*, 2010; Matsuo *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2019; Jang *et al.*, 2019). Todavia, poucos têm sido amplamente aceitos e incorporados aos protocolos quimioterápicos anticâncer padrões, como os diterpenos, Docetaxel e Paclitaxel, utilizados no tratamento do câncer de mama, ovário e pulmão; e

no tratamento do câncer de bexiga, esôfago e pulmão, respectivamente (Brandão *et. al.*, 2010).

A classificação dos terpenos se baseia no número de unidades isoprenicas: monoterpenos (C10, 2 unidades), sesquiterpenos (C15, 3 unidades), diterpenos (C20, 4 unidades), sesterpenos (C25, 5 unidades), triterpenos (C30, 6 unidades) e tetraterpenos (C40, 8 unidades) sendo os monoterpenos e sesquiterpenos os terpenos mais frequentes em óleos voláteis (Simoes & Spitzer, 2003). Além, dos diterpenos supracitados, têm sido crescentemente reconhecido o potencial quimioterápico dos monoterpenos, nos últimos anos vários monoterpenos utilizados na indústria alimentícia e de cosméticos, por suas propriedades organolépticas, passaram a ser alvos de estudos dedicados a reposição farmacológica, estratégia em que se explora drogas existentes e já aprovadas para uso humano, e redirecioná-las para o desenvolvimento de novos tratamentos de doenças emergentes ou resistentes aos tratamentos convencionais (Sleire *et al.*, 2017).

2.1.3. Mirtenal

Com poucos relatos na literatura, o mirtenal, um monoterpeno oxigenado bicíclico, teve sua primeira ação anticâncer descrita em 2010 por Imelouane e colaboradores, os quais estudaram os principais componentes de óleo essencial extraído da *Lavandula dentata*, e observaram que células tumorais de Glioma humano, U373 MG, são sensíveis aos efeitos citotóxicos desse extrato, sugerindo o mirtenal como um dos principais princípios ativos. Martins (2011), descreveu o mirtenal como um potente inibidor de bombas de H^+ , e resultados *in vitro* demonstraram até 80 % de inibição das bombas de prótons. desde então, nosso grupo vem investigando o potencial do mirtenal como inibidor de bombas de H^+ , e avançando em testes *in vivo* do mirtenal no combate ao melanoma.

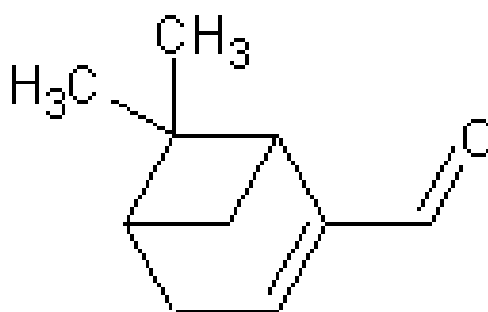


Figura 3. Representação da estrutura química do monoterpene mirtenal.

Associações entre alterações de temperatura e doença são relatadas desde os primeiros registros na história da civilização humana. Em 1500 a.C. já existiam descrições de processos febris e inflamatórios. Hipócrates, no ano de 460 a.C., descreveu a importância da avaliação térmica de diversas partes do corpo humano (Andrade Filho, 1999). Na medicina moderna, é consenso que um incremento de temperatura em determinado tecido pode representar a presença de processos inflamatórios ou infecciosos, enquanto uma diminuição da temperatura tecidual pode indicar a existência de processos isquêmicos.

A termografia, ou imagem gerada pelo calor, surgiu durante a Segunda Guerra Mundial com o aperfeiçoamento dos filmes infravermelhos (com sensibilidade a comprimentos de onda abaixo do espectro visível). Após o término da guerra iniciou-se a utilização desta tecnologia com outras finalidades. A termografia é considerada uma análise não invasiva e não destrutiva de sensoriamento remoto, que se baseia na detecção da radiação térmica emitida por todos os corpos de temperatura não nula. Embora seja pouco utilizada no Brasil, em países da América do Norte a termografia vem encontrando largo emprego na área médica. Os primeiros trabalhos realizados foram na área de oncologia, quando foram observados tumores mamários humanos revelados por meio de registros termográficos de aumento na temperatura de pele (Christiansen & Gerow, 1990).

Para a geração de imagens Videotermométricas de Campo Aberto em Tempo-Real (VCATR) foi utilizada a estação MART (*Metabolic Activity in Real-Time*), um equipamento desenvolvido pela médica Paula Cabral (Instituto Galzu), que possibilita com precisão observar micro nódulos que apresentam

temperatura diferenciada. O metabolismo tumoral diferenciado tende a liberar calor e consequentemente é detectado pelo equipamento, cujo potencial de análise tem sido validado e aprimorado sob a orientação do professor André Laceda (LSA/CCTA/UENF) em colaboração com o nosso grupo de pesquisa (LBCT/CBB/UENF).

2.2. Justificativa

O câncer consiste num dos maiores problemas de saúde pública do mundo. Dentre os cânceres mais mortais melanoma se destaca como um dos tipos de tumores mais invasivos e de difícil controle (Costa et al., 2018). A pesquisa por metodologias terapêuticas inovadoras, economicamente viáveis e com a menor carga possível de efeitos colaterais, sobre o metabolismo das células saudáveis se reveste de grande interesse social, científico e tecnológico

De acordo com dados prévios produzidos por nosso grupo de pesquisa (Martins *et al.*, 2018), o mirtrenal se mostrou efetivo na inibição das V-ATPases de células tumorais, principalmente melanoma, levando a resultados bioquímicos e fisiopatológicos que sugerem um grande potencial para desenvolvimento de novos tratamentos terapêuticos anticâncer, justificando o aprofundamento dos estudos sobre o uso deste monoterpeno em combinação com quimioterápicos já usados contra o melanoma e disponíveis no mercado. Uma outra proposta bastante atrativa diz respeito a síntese de derivados deste monoterpeno em conjugação com metais, visando a potencialização das propriedades anticarcinogênicas e antimetastáticas previamente descritas para o mirtrenal e outros monoterpenos estruturalmente correlacionados.

2.3. Objetivo Geral

- Estudar o metabolismo tumoral e sua relação com o potencial quimioterápico do monoterpeno mirtenal em conjunto com drogas já usadas no mercado, e comparando tais atividades com a de novas moléculas conjugadas com metais sintetizadas a partir deste monoterpeno.

2.3.1. Objetivos Específicos

- Avaliar as diferenças de efetividade de tratamentos conjuntos do mirtenal com cisplatina *in vitro* e *in vivo*;
- Verificar as alterações metabólicas termogênicas via o uso da plataforma MART, de forma a identificar as diferentes áreas de um tumor e analisar a atividade das bombas de prótons, levando em conta seus papéis no metabolismo tumoral;

2.4. Materiais e Métodos

2.4.1. Terpenos

O monoterpeno mirtenal (*1R*)-2-Pinen-10-al, (*1R*)-6,6-Dimethylbicyclo [3.1.1]hept-2-en-2-carboxaldehyde) de fórmula molecular C₁₀H₁₄O, foi obtido comercialmente (Sigma Aldrich), e diluído em DMSO a 0.97% e PBS resultando nas concentrações finais de 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg e 50 mg/kg.

2.4.2. Cultura de Células

As células B16F10, de melanoma murino muito metastática, foram adquiridas do Banco Células do Rio de Janeiro (BCRJ), criado e mantido pelo Prof. Radovan Borojevic, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). As culturas foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, em garrafas de cultura de 25cm³ a 37°C com 5% de CO₂ e umidade controlada.

2.4.3. Indução de Metástase

Células B16-F10, foram retiradas da garrafa, com tripsina, centrifugadas e ressuspensas de modo a ajustar a concentração de 5×10^5 células por 0,1 mL. Foram usados camundongos C57BL/6 para a indução com 8 semanas de idade, os camundongos foram divididos em grupos com 7 animais cada de modo a se obter 3 grupos: camundongos sem tratamento, camundongos tratados com DMSO e camundongos tratados com mirtenal. As linhagens de células tumorais foram então aplicadas nos camundongos por duas vias diferentes de maneira a se induzir dois tipos diferentes de metástase em diferentes grupos, metástase pulmonar e metástase nos linfonodos.

Para observar metástase pulmonar, foram aplicadas 5×10^5 células em uma das veias da calda do camundongo. Para induzir metástases nos linfonodos as células foram aplicadas na parte superior da orelha.

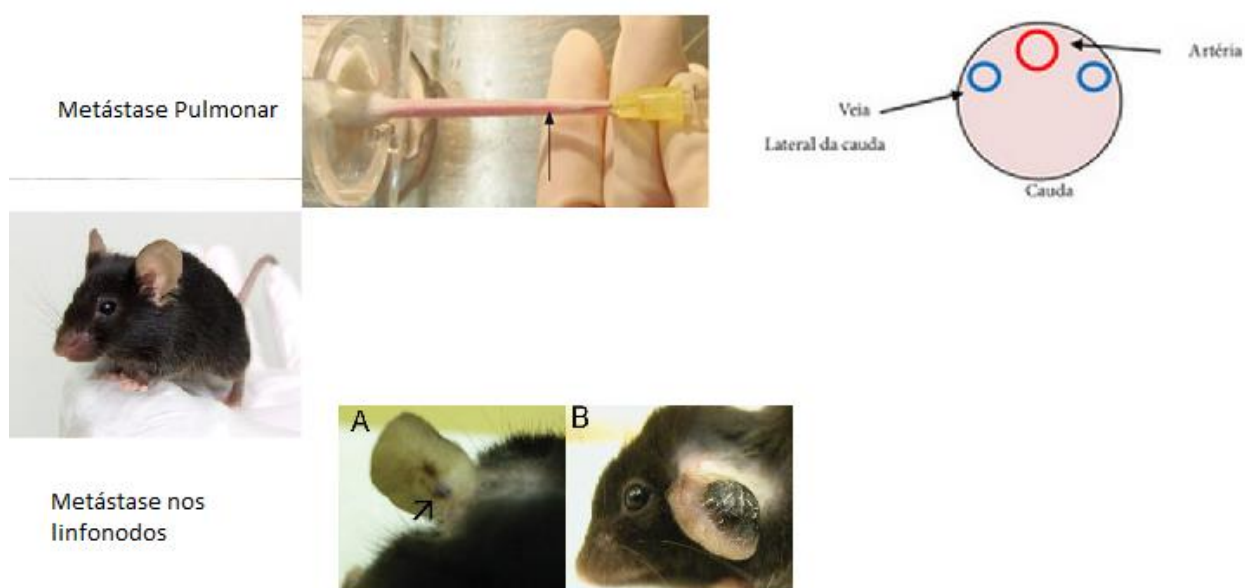


Figura 4: Esquema ilustrando os modelos de indução de metástase.

Os tratamentos foram realizados a partir do primeiro dia de inoculação das cobaias com as células tumorais, para indução da metástase, aplicando-se o quimioterápico (mirtenal) ou só de sua solução solvente (controle), por meio de injeção via intraperitoneal, com reforços a cada 72 horas, durante 21 dias após a indução da metástase pulmonar e dos linfonodos.

2.4.4. Controle do peso corporal

O peso corpóreo foi acompanhado individualmente, a cada 3 dias, com o auxílio de balança de precisão, como um dos parâmetros usados para se comparar os aspectos clínicos relacionados com a eficiência do tratamento. Os valores obtidos foram utilizados na construção da curva de ganho de peso corporal, e todo tratamento gráfico dos dados fora desenvolvido no software GraphPadPrism 5.0.

2.4.5. Parâmetros bioquímicos do plasma

Amostras de sangue foram coletadas no final dos 21 dias de tratamento dos camundongos. A coleta foi feita por punção cardíaca, as amostras foram então encaminhadas para análise bioquímica automatizada, por meio da plataforma analítica *VitrosR 950 Chemistry System* (Laboratório Plínio Bacelar). Foram dosadas, alanina transaminase (ALT) e aspartatotransaminase (AST), e ureia e creatinina a fim de avaliar possíveis alterações no quadro clínico decorrente da indução da metástase e/ou do tratamento com Mirtenal. Os valores obtidos foram compilados em gráficos de barras, com os dados de cada parâmetro emparelhados lado a lado para prover maior clareza nas análises comparativas da evolução clínica geral de cada cobaia.

2.4.6. Análises histológicas

Os animais foram acompanhados durante 21 dias após a indução da metástase pulmonar e dos linfonodos e sacrificados seguindo todas os procedimentos padrões, aprovados pela Comissão de Uso de Animais de Laboratório da UENF. Durante a necropsia, foram retirados, rim, fígado e coração e pulmão para verificar alterações histopatológicas. Os órgãos foram fixados em formol 10% posteriormente foram clivados, desidratados em série crescentes de etanol (70%, 80%, 90% e 100%), clarificados em xilol, impregnados e incluídos em parafina e as seções foram então montadas e coroadas com hematoxilina e eosina. As amostras foram então observadas no microscópio Zeiss Axioplan e fotografadas no sistema Axiovision.

2.4.7. Fracionamento celular e purificação das membranas

Tumores retirados dos camundongos foram macerados e centrifugados por 5 minutos a 1200 rpm, para posterior retirada do meio DMEM e aplicação do tampão de lavagem com 10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, 1 mM PMSF e 3 mM benzamidina em pH 7,4. Posteriormente, foram centrifugados seguindo uma sequência de lavagem com o tampão de lavagem repetida duas vezes em centrífuga refrigerada a 500 rpm por 5 minutos a 4°C, coletando-se o precipitado e descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi então homogeneizado em Potter (Figura 11) e o homogenato submetido à nova

centrifugação de lavagem a 500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi então coletado e centrifugado em micro-ultracentrífuga a 10.000 x *g* por 10 minutos a 4°C, para isolar a fração mitocondrial. O sobrenadante resultante é então centrifugado a 100.000 x *g* para isolar a fração microssomal, a qual precipita a esta velocidade de centrifugação e foi homogeneizada em tampão de ressuspensão contendo 250 mM de sacarose, 1 mM EGTA e 50 mM de Tris-HCl em pH 7,2. A fração microssomal foi então depositada cuidadosamente no topo de um gradiente descontínuo de sacarose (46% e 25% sacarose, 1 mM EGTA e 50 mM de Tris-HCl em pH 7,2) e submetida à centrifugação a 100.000 x *g* por 30 minutos a 4°C, sendo coletada a fração que constitui uma banda que acumula na interface entre as duas concentrações do gradiente de sacarose, constituindo a fração enriquecida com vesículas oriundas da membrana plasmática. Esta fração foi então centrifugada novamente a 100.000 x *g* por 30 minutos em tampão de ressuspensão e as membranas celulares purificadas, foram usadas imediatamente em análises funcionais de transporte de H⁺, ou congeladas em N₂ líquido e armazenadas a -70°C, para análises posteriores.

2.4.8. Dosagens de Proteína

A fração de vesículas purificadas teve o seu conteúdo de proteínas totais dosado pelo método de Bradford (1976). A solução de Bradford foi confeccionada com 100 mg de *Coomassie Brilliant Blue*, 50 mL de etanol sobre agitação durante 1 hora, e depois foram adicionados 100 mL de ácido ortofosfórico e o volume foi completado para 1000 mL de H₂O destilada, a solução foi então filtrada em papel filtro 4 vezes. A curva padrão foi obtida utilizando solução de BSA 1mg/mL diluída a concentrações variando de 2 a 18 µg, completando o volume para 100 µL de H₂O ultra pura e adicionando 900 µL da solução de Bradford. As amostras (10 µL) foram colocadas em 90 µL de H₂O Milique e 900 µL de Bradford, após 15 minutos foi feita à leitura a 595 nm no espectrofotômetro.

2.4.9. Atividade de hidrólise de ATP da V-ATPase

Para mensurar a atividade enzimática das bombas de H^+ de cada um dos tumores retirados da orelha dos camundongos (B16F10) foram utilizadas as frações de membrana plasmática das V-ATPases. Para tal, o meio de reação básico continha: Hepes-Tris 10 mM (pH 7,0 para plasmalema ou 8,0 para mitocôndrias), $MgSO_4$ 1 mM, Molibdato de sódio 0,2 mM e ATP 1 mM; levado ao volume final com adição da apropriada quantidade de H_2O ultra-pura para cada condição de ensaio. Para a revelação da atividade da V-ATPase foi usado inibidor específico (Nitrato 50 mM), além dos monoterpeno e Mirtenol nas seguintes concentrações: 50 μM ; 100 μM ; 200 μM . A reação foi disparada com a adição de cada fração de membranas (plasmalema ou mitocôndria; na concentração de 0,030 mg/mL de proteína) e parada após 0 e 30 minutos de tempo de incubação, pela retirada de alíquotas que foram imediatamente transferidas para tubos de ensaio contendo TCA a 5 %, mantidos em gelo. Para revelar o fosfato liberado pela hidrólise de ATP, usou-se o método clássico de Fiske e Subbarow (1925), molibdato de amônio e ácido ascórbico e leitura em leitor de Elisa a 750 nm (Adaptado de Summer *et al.*, 1995).

2.4.10. Análises Termométricas

Para a geração de imagens videotermométricas de campo aberto em tempo-real foi utilizada uma estação MART (*Metabolic Activity in Real-Time*), composta de uma ilha de trabalho computadorizada, acoplada a uma câmara geradora de imagem, sensível a comprimentos de onda na faixa do infravermelho, e conectada através de uma lança ajustável à distância, permitindo posicioná-la sobre a mesa cirúrgica, a alturas ajustáveis do corpo do paciente (no caso as cobaias utilizadas neste estudo), de forma a melhor enquadrar o campo de avaliação sem comprometer o campo cirúrgico. As imagens coletadas pela estação MART são ajustadas *in loco* pelo operador do equipamento, o qual processa, devolve e grava as imagens dinâmicas, em tempo real, durante a cirurgia.

Os tecidos removidos foram devidamente identificados e direcionados para o diagnóstico histopatológico e para análises bioquímicas complementares da atividade das bombas de prótons.

2.4.11. Análise Estatística

As análises estatísticas foram feitas para os testes de controle de peso e de atividade da V-ATPase, por meio do programa Graph Pad Prism versão 5.0. O teste estatístico utilizado foi o método de comparação múltipla de Tukey (*tukey's multiple comparison test, one-way ANOVA*).

2.5. Resultados

2.5.1. Tratamento com mirtrenal conjugado a cisplatina

A fim de expandir o potencial da ação antimetastática previamente descrita para o mirtrenal (Martins *et al.*, 2019), analisamos se este monoterpene poderia ser usado como adjuvante em tratamentos terapêuticos clássicos. Para tanto, foram realizadas análises de MTT de tratamentos conjugando mirtrenal juntamente com cisplatina, em interações com diferentes linhagens celulares tumorais. O mirtrenal potencializou a ação anticâncer da cisplatina em cerca de 50%.

Concentração de cisplatina necessária para atingir o IC50 em células B16F10 pré-tratadas com Mirtrenal				
Mirtrenal		Cisplatina (μM)		
Pré-tratamento	Concentrações (μM)	24h	48h	72h
—	—	102,0	54,0	43,0
		92,0	66,4	47,0
		95,0	58,0	40,0
0h	15	58,0	34,0	17,0
		52,0	36,0	14,0
		60,0	39,0	12,0
24h	15	45,0	28,0	<10
		46,0	26,0	<10
		40,0	30,0	<11
48h	15	21,0	15,0	<10
		25,0	17,0	<10
		22,0	20,0	<10

Tabela 1: Toxicidade do mirtrenal sobre a linhagem de melanoma murino B16F10. Aplicada a concentração de 15 μM (previamente descrita como não tóxica a linhagens não tumorais) em interação com diferentes concentrações de cisplatina em cada grupo para a verificação do IC₅₀.

2.5.2. Indução de Metástase nos Linfonodos

Os camundongos foram divididos em 4 grupos de 5 animais cada, em todos foram induzidas metástases nos linfonodos com células de melanoma murino B16F10. O grupo controle não recebeu nenhum tipo de tratamento; a outro grupo fora administrado somente uma solução aquosa de DMSO, na mesma concentração usada para dissolver o mirtrenal; a outro grupo fora administrado

somente o mirtenal; e ao último grupo foi dado o tratamento conjugado mirtenal e cisplatina. Todos os tratamentos foram iniciados a partir do dia da indução metástase, sendo administrado reforço a cada 3 dias. Após 21 dias da indução, foi feita a necropsia e a retirada dos linfonodos e dos tumores primários formados na área de aplicação na orelha. Na Figura 6A, observa-se metástase no linfonodo de um camundongo pertencente ao grupo que não recebeu nenhum tratamento, em 6B um exemplo de linfonodo de um dos camundongos que recebeu somente a solução controle de DMSO, em 6C vemos o efeito característico promovido em camundongos tratados com mirtenal, e em 6D o resultado obtido em camundongos tratados com ambos, mirtenal e cisplatina, com significativa diminuição do crescimento tumoral formado nos linfonodos.



Figura 5: Metástase nos linfonodos; em A grupo controle, camundongo que não recebeu tratamento; em B camundongo pertencente ao grupo tratado com DMSO; em C camundongo tratado com mirtenal, em D Camundongo tratado com mirtenal e cisplatina.

2.5.3. Volume Tumoral

Ao longo do tratamento foram acompanhados parâmetros de crescimento tumoral, e ao final do tratamento os animais foram sacrificados e os tumores pesados e a área total calculada. Nos Camundongos nos quais foram administrados ambos os fármacos (tratamento conjugado mirtenal + cisplatina), observou-se uma diminuição de 50% do volume tumoral quando comparado ao tratamento unicamente com mirtenal, e de cerca de 75% quando comparado com o grupo tratado só com cisplatina.

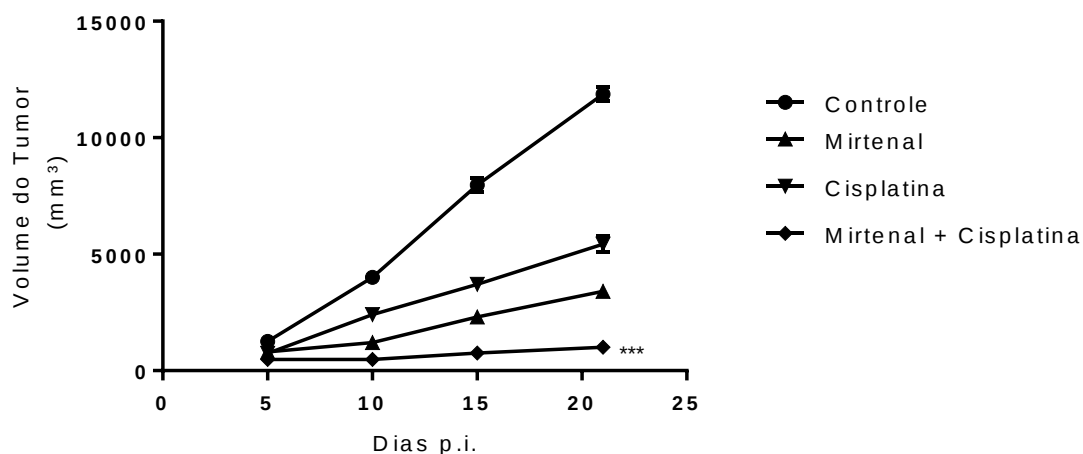


Figura 6 - Volume tumoral: Círculos fechados, grupo controle, camundongos que não receberam tratamento algum; triângulos invertidos, camundongos pertencentes ao grupo tratado com cisplatina; triângulos regulares mostram dados de camundongos tratado com mirtenal, e losangos apresentam dados de camundongos tratados com a conjugação de mirtenal e cisplatina.

2.5.4. Análise Termométrica

Para a geração de imagens Videotermométricas de Campo Aberto em Tempo-Real foi utilizada a estação MART (*Metabolic Activity in Real-time*; sistema desenvolvido pelo Instituto Galzu; testado no presente trabalho de tese, em colaboração com a Dra. Paula Cabral e o Dr. André Lacerda na Unidade de Experimentação Animal, UEA-UENF). A câmera de captura de imagens, sensível ao infravermelho, no sistema MART encontra-se presa a um braço articulado que a posiciona sobre o campo cirúrgico, deixando espaço livre para o fluxo normal dos procedimentos cirúrgicos, dispondo de um sistema operador que processa e devolve imagens em tempo real, durante a cirurgia. Foi possível observar diferenças de temperatura nas regiões afetadas pela indução tumoral em camundongos tratados e não tratados, onde verificou-se decréscimos de mais de 1 °C de entre tumores de camundongos que receberam o tratamento em relação a tumores de camundongos controle (Figura 8A) não tratados com mirtenal. Tal diferença de temperatura indica uma queda no metabolismo tumoral que se refletiu em grande redução do volume dos tumores de animais que receberam o tratamento com mirtenal (Figura 8B).

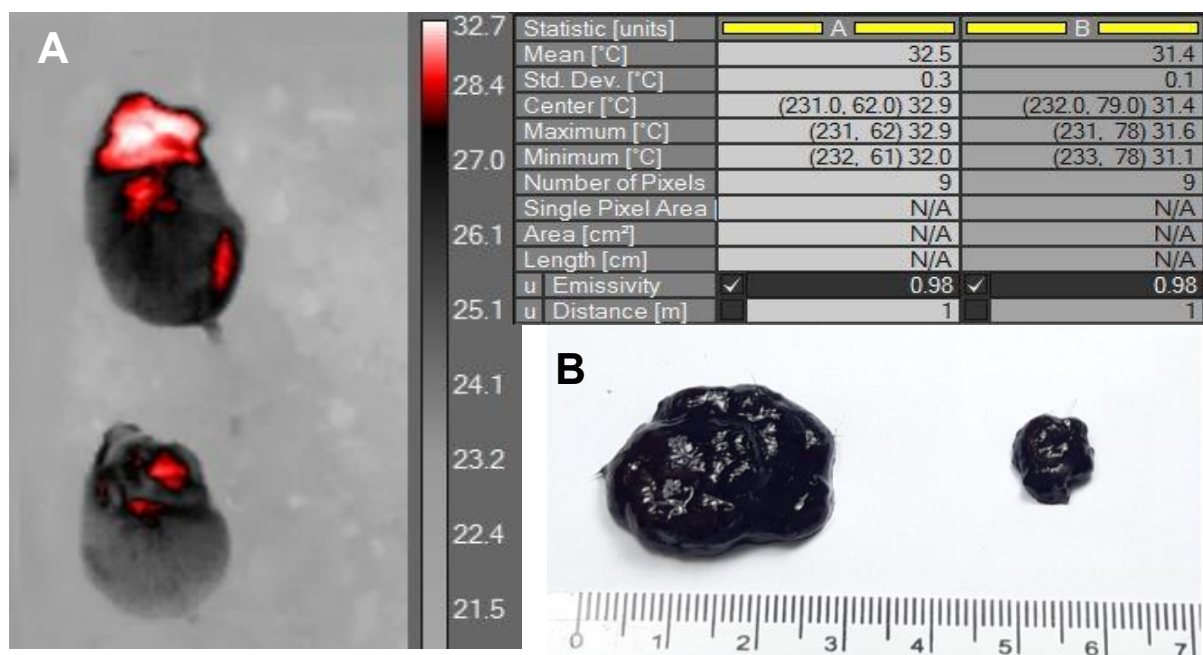


Figura 7 - Análise calorimétrica (MART) e morfométrica de tumores induzidos: (A) Camundongo tratado com mirtrenal (100 μ M; animal da porção inferior da fig.) comparado a um não tratado (animal da porção superior da fig.), tendo seus tumores visualizados e digitalizados pelo sistema MART e no quadro ao lado os dados com tratamento estatístico obtido através do software; (B) Tumores cirurgicamente retirados dos respectivos camundongos para análises morfométricas.

2.5.5. Atividade das bombas de Prótons dos tumores.

O procedimento de isolamento e purificação das membranas celulares dos tumores induzidos na orelha dos camundongos foi realizado por fracionamento celular, como descrito em materiais e métodos, e a atividade enzimática de hidrólise de ATP das frações de membranas purificadas contendo as bombas iônicas foram avaliadas quanto à taxa de inibição promovida pelo tratamento com o monoterpeno mirtrenal na concentração 100 μ M. Em preparações de membranas celulares purificadas de tumores retirados de camundongos controle, não previamente tratados com mirtrenal, quando as membranas foram incubadas com 100 μ M mirtrenal por 30 minutos, observou-se inibição de 70% da atividade da V-ATPase (Figura 10A). Na figura 10B, observa-se a atividade total da V-ATPase em vesículas de membranas celulares purificadas de tumores não tratados e tratados com mirtrenal, onde tumores tratados apresentaram atividade 55% menor que os não tratados.

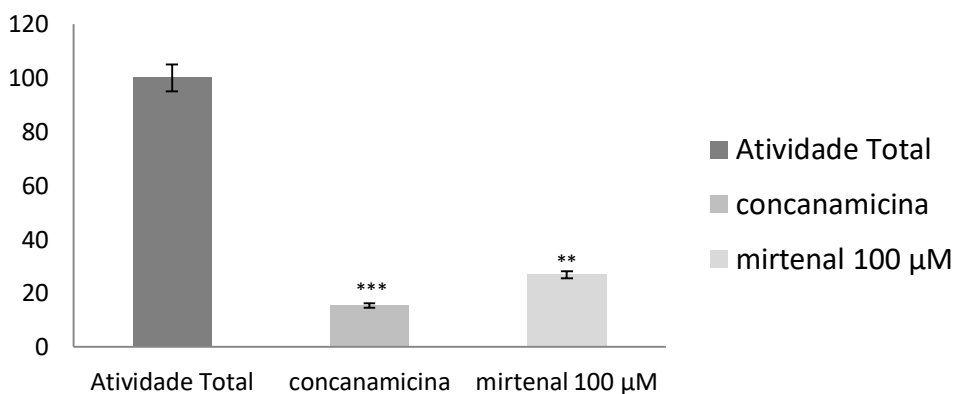
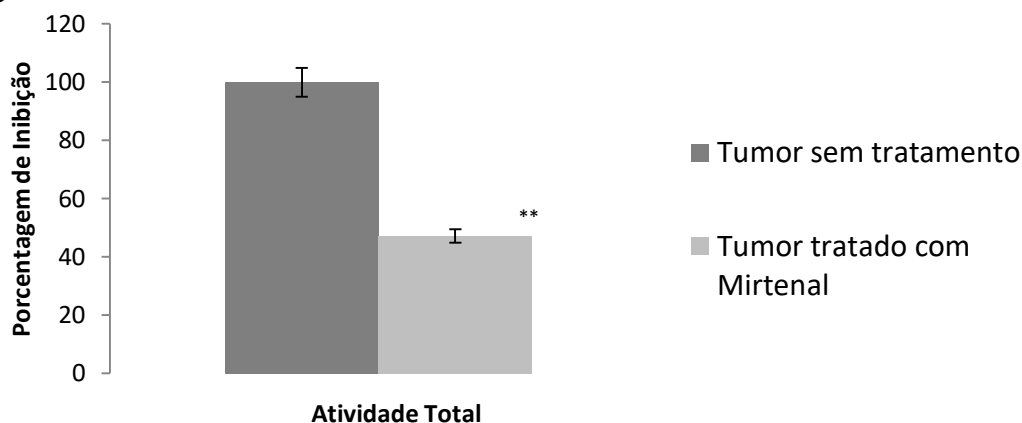
A**Porcentagem de Inibição da V-ATPase****B****Porcentagem de Inibição da V - ATPase**

Figura 8: Atividade Específica de Hidrólise de ATP: em A comparação da atividade da V-ATPase quando inibida com mirtenal e concanamicina A; e em B comparação da atividade da V-ATPase de membranas purificadas de camundongos não tratados e tratados com mirtenal ($P < 0,001$).

2.5.6. Comparação de Dados da Videotermometria com os de Atividade das Bombas Iônicas

A fim de correlacionar a diferença de temperatura observada no MART com o metabolismo tumoral, regiões dos tumores que estavam em diferentes temperaturas foram cirurgicamente retiradas e processadas para o isolamento de membranas celulares para as análises de atividade das bombas iônicas. Na Figura 10A, em regiões tumorais distanciadas cerca de 5 mm (Figura 10A, pontos A e B delimitados pelas miras em amarelo) foram detectadas diferenças

de até 1 °C. Quando amostras teciduais de pontos centrais e periféricos com esta mesma diferença de 1 °C foram enzimaticamente analisadas, se observou atividades de hidrólise de ATP 50% maiores nas amostras das regiões centrais mais quentes (Figura 10B).

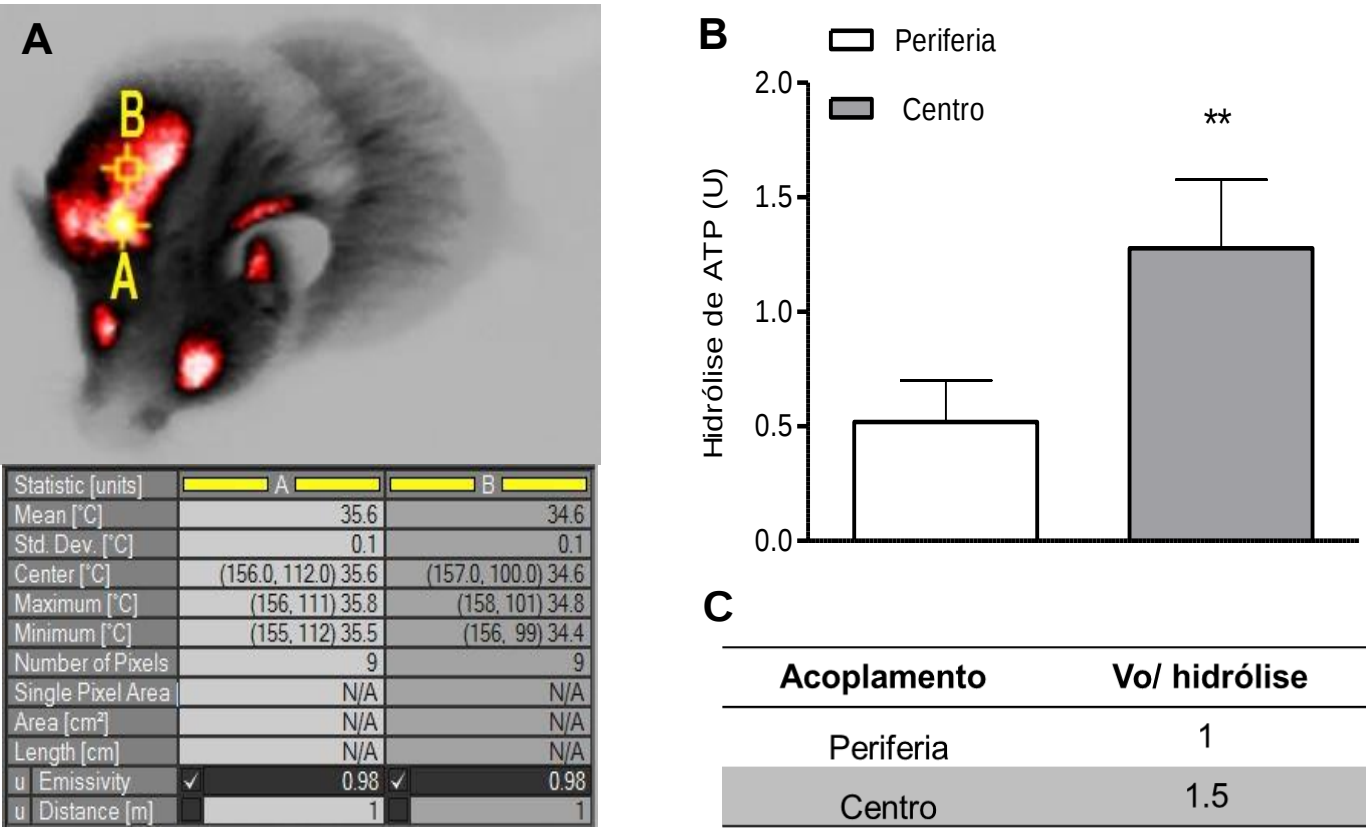


Figura 9: Mensuração da Atividade Metabólica Tumoral Via Análises Termométricas e Enzimáticas: A – Imagem termométrica de um animal modelo, destacando as regiões central (A) e periférica (B) do tumor induzido por células de melanoma; e abaixo a tabulação dos dados estatísticos obtidos através do software FLIR (sistema MART); B – Atividades enzimáticas de hidrólise de ATP e transporte de prótons de membranas celulares isoladas das regiões demarcadas em A (amostras retiradas do centro e da periferia do tumor); C – Tabela apresentando o cálculo do acoplamento das atividades das H⁺-ATPases, características do metabolismo das células tumorais de cada região (N=5, *p> 0,05 e **p>0,01).

2.6. Discussão

Avanços substanciais nas pesquisas sobre melanoma vêm sendo desenvolvidos nos últimos anos, mas o prognóstico tardio, a agressividade da doença e a resistência às drogas disponíveis continuam a dificultar o tratamento e estimulam a busca por novos alvos terapêuticos com objetivo de melhorar a qualidade de vida e o tempo de sobrevivência dos pacientes (INCA, 2020).

Mudanças de pH intracelulares e acidificações do microambiente tumoral vem sendo descritas como responsáveis por processos como quimiorresistência, invasão, migração e proliferação tumoral. Otto Warburg foi pioneiro na descrição desse fenômeno, e entre as décadas de vinte e sessenta do século passado, publicou uma série de trabalhos seminais demonstrando as relações existentes entre as alterações do pH tumoral com o aumento do fluxo glicolítico e geração de ácido lático, mesmo na presença de oxigênio nos tecidos (Warburg, 1924, 1956). Desde então, o famoso 'Efeito Warburg' vem sendo alvo de estudos e discussão em inúmeras pesquisas ao redor do mundo (e.g., Vander Heiden, 2009). Atualmente, sabemos que tal acidificação leva ao aumento na transcrição de fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e de interleucinas, intensificando a expressão de Catepsinas e metaloproteases, podendo levar também ao aumento da atividade do Fator Nuclear Kappa B (NF- κ B), desencadeando a migração de vesículas lisossomais para a periferia celular e a exocitose de seus produtos (Macguire, 2017). As V-ATPases presentes nestas vesículas e na membrana plasmática das células tumorais, são responsáveis por esse controle fino da acidificação e alcalinização, de microdomínios de endomembranas e da membrana plasmática, modulando as oscilações de pH tanto do meio externo quanto do citoplasma (Macguire, 2017; Martins *et al.*, 2019). Nosso grupo vem demonstrando a presença e importância da atividade das bombas de H^+ no controle da tumorigenese em diversos modelos de câncer. No primeiro trabalho de dissertação do grupo abordando a temática da oncologia celular e molecular, Julianna Santos (2009), demonstrou que linhagens celulares J774A₁ (não carcinogênica) e B16F0 (pouco metastática), apresentam semelhantes perfis de atividades hidrolítica para as V-ATPases e F-ATPases, diferindo

drasticamente do resultado obtido com a linhagem B16F10 (muito metastática), a qual apresentou uma maior atividade destas ATPases e mais elevada sensibilidade aos inibidores (Santos, 2009).

As V-ATPases têm como função principal a geração de fluxo de prótons (Nakamura, 2003; Senoune e Forgac, 2004; Saroussi e Nelson, 2009) e na esfera das células tumorais, a acidificação promovida por estas enzimas transportadoras tem se relacionado como o potencial de invasão e metástase tumoral (Senoune e Martinez-Zaguilán, 2007; Fais *et al.*, 2007). Segundo Martinez-Zaguilán e colaboradores (1998), a manutenção do pH ácido extracelular sob controle da V-ATPase que possui expressão aumentada nas membranas celulares de várias células carcinogênicas, exerce influência sobre processos celulares chaves como: proliferação e mobilidade celulares, tumorigênese, metástase, apoptose e resistência a drogas.

Atualmente, comercialmente disponíveis, existem os inibidores clássicos de V-ATPases, a bafilomicina A1 e a concanamida A, os quais são extremamente tóxicos e impróprios para o uso clínico em seres humanos induzindo a morte celular de forma indiscriminada (Nishihara, 1995). Portanto, torna-se estratégica a busca por novos inibidores menos agressivos e mais específicos, capazes de inibir a atividade das bombas de prótons e o processo de metástase causando o mínimo possível de efeitos colaterais sobre as células sadias.

Os efeitos tóxicos das drogas antitumorais se devem principalmente à baixa seletividade, ou seja, a maioria das drogas disponíveis interagem com fatores presentes tanto nas células cancerígenas quanto nas células normais humanas. Portanto, substâncias que possam atuar diretamente sobre as células tumorais e poupando o maior número possível de células normais são consideradas promissoras para a continuidade dos testes em fases avançadas de avaliação do potencial antitumoral. Portanto, os primeiros testes que executamos no presente trabalho foram ensaios de DL50 do mirtenal de modo a verificar a especificidade da toxicidade deste monoterpene, e uma vez comprovada certa seletividade por células cancerígenas, passar a aferição da concentração mais baixa possível que possa induzir a morte especificamente

de células de câncer sem afetar as normais e padronizar os intervalos de tempo do tratamento.

O monoterpene mirtenal foi também complexado com diferentes íons metálicos, com o objetivo de se potencializar sua ação, porém todos os complexos obtidos apresentaram significativa perda da ação antitumoral em comparação com o mirtenal não complexado, sugerindo que as mudanças induzidas na estrutura diminuíram seu efeito em vez de potencializá-lo. A atividade do complexo 1, por exemplo, não deve ter sido efetiva devido provavelmente a piora nas propriedades químicas que fazem o mirtenal particionar facilmente nas membranas, o que de certa forma corrobora o mecanismo descrito por Martins e colaboradores (2019), no qual o efeito inibitório do mirtenal estaria diretamente relacionado com efeitos desestabilizadores do mirtenal na estrutura interna dos lipídeos anulares inerentes aos rafts de membrana que promovem a interação funcional de V-ATPases com outros sistemas proteicos relevantes para a oncogênese.

O mirtenal foi testado conjuntamente com a cisplatina a fim de testar sua utilidade como adjuvante a potencializar a atividade da cisplatina. Com 48 horas de interação a potencialização foi de 30 % e podendo chegar a 80 % quando as células eram pré-tratadas com mirtenal por 48 horas e depois adicionado a cisplatina e incubando por mais 48 horas.

Quando testados *in vivo*, o mirtenal foi usado na concentração de 15 mg/kg e a cisplatina 25 mg/kg, e os resultados mostraram que no grupo tratado com o conjugado das duas drogas os tumores eram menores, os camundongos apresentavam uma sobrevida maior, além do volume tumoral ser 50 % menor quando comparado ao tratamento somente com o mirtenal e 70 % menor quando comparado com o tratamento só com a cisplatina (Figuras 7 e 8).

Corroborando com Martins e colaboradores (2019), nossos experimentos da ação deste monoterpene ensaiado *in vitro*, diretamente adicionado às membranas celulares isoladas onde a enzima se encontra expressa, demonstraram a eficácia do mirtenal como inibidor da V-ATPase, e indutor de apoptose em células de melanoma murinho B16F10 e B16F0 e melanoma humano Skmell-5, nossos dados também demonstram a eficácia do

mirtenal no tratamento de camundongos com metástases induzidas no pulmão e linfonodos (dados não mostrados neste trabalho, por integrarem outra tese; Brunna Martins, 2018).

Várias técnicas de indução metastática em modelos de melanoma murinos foram desenvolvidos ao longo das últimas décadas (1-13) e são utilizadas para determinar a função de proteínas específicas na progressão do melanoma e que se aproximam em certos aspectos biológicos ao ser humano, facilitando a busca por novas drogas (Cobertt, 2002). A mais conhecida e aceita é a indução intravenosa onde se observa metástase nos pulmões (Guimarães *et al.*, 2010). Existem também modelos de metástase óssea, ovárica, retal e hepática (Vantyghem *et al.*, 2003, Kishimoto *et al.*, 2013). Em 2010, Bobek e colaboradores, desenvolveram um novo tipo de metástase com células de melanoma em que por injeção de células cancerosas entre a pele e a cartilagem no lado dorsal da orelha pode se observar metástase nos linfonodos. Também foi demonstrado que a indução de células B16F10 no peritônio pode, eventualmente, gerar linfonodos metastáticos (Chirivi *et al.*, 1994)

Na Figura 9, observa-se uma análise por videotermometria dos camundongos, onde animais do grupo não tratado apresentaram em seus tumores uma temperatura de cerca de 1,1 °C maior que os tumores dos camundongos tratados com mirtenal. Análises enzimáticas de atividade ATPásica foram realizadas neste material para averiguar o quanto as bombas de prótons são importantes no processo de tumorigênese e na angiogênese, previamente relacionada com as alterações termogênicas.

Na Figura 11, observa-se a comparação das imagens videotermométricas com a atividade das bombas iônicas. Foram selecionados os locais de maior variação de temperatura tumoral, os quais chegaram a ter atividade ATPásica 50 % maiores quando comparadas com as amostras das áreas periféricas do tumor, as quais eram cerca de 1 °C mais frias que o cerne do tumor, demonstrando assim a participação das bombas iônicas energizadas por ATP nos processos tumorigênicos.

Estes dados corroboram com os resultados relatados por Lu e colaboradores que em 2005 demonstraram que inibições *in vivo* da atividade da V-ATPase pela técnica de RNAi induz um retardo da progressão do melanoma humano, associado a diminuição da extrusão de prótons pelas células tumorais, ratificando a hipótese em que a regulação do pH celular via H^+ -ATPases pode ter um papel chave na homeostase tumoral. Matsuo e colaboradores (2011), descreveram também que o α -pineno, outro monoterpreno com grandes similaridades estruturais com o mirtenal, foi capaz de induzir apoptose em células B16F10.

O tratamento com mirtenal também foi efetivo em camundongos com metástase nos linfonodos, na Figura 15, observa-se que houve grande diferença no tamanho da metástase quando o camundongo foi submetido ao tratamento com mirtenal. A fim de amostrar a capacidade de invasão destas células foi feita a análise histológica dessas amostras. Na Figura 16, observa-se que nos camundongos tratados com mirtenal houve apenas discretos sinais de invasão do tecido, observando-se a porção cortical do linfonodo com a capsula linfonodal intacta, e a presença de somente pequenas aglomerações de células com características tumorais, mas com pouca melanina. Nos camundongos não tratados observa-se uma grande área de necrose, abundância de células tumorais altamente melanizadas, e uma porção cortical do tecido que já perdeu completamente sua forma original.

Na Literatura, existem poucos relatos de tratamentos de camundongos com metástase nos linfonodos. O mais relevante e recente demonstrou que através de imunoterapia se conseguiu inibir parcialmente o potencial metastático das células tumorais (Henry, *et al* 2015). Levando em consideração a importância da V-ATPase na progressão tumoral, empreendemos esforços para mostrar a atuação do mirtenal sobre as bombas translocadoras de H^+ . Foi feito fracionamento de membranas de tumores induzidos na orelha dos camundongos e foi ensaiada a atividade da V-ATPase. Na figura 10 A, observa-se inibição de cerca de 80 % da atividade da V-ATPase quando comparada com a total, e na Figura 10 B, observa-se a inibição de 60 % da V-ATPase de tumores retirados do grupo tratado quando comparado com o grupo não tratado.

Esses dados corroboram com dados do grupo, nos quais Martins (2011) demonstrou, *in vitro*, que o mirtenal foi capaz de inibir a V-ATPase e também a F-ATPase, e observou-se também por fluorescência o acúmulo de vesículas ácidas próximo a membrana plasmática. Em 2018, Martins demonstrou que o mirtenal foi capaz de induzir apoptose em células de melanoma murino B16F10, sendo possível ver a retração do núcleo, redução do volume celular, ativação de caspases e liberação da fosfatidilserina.

A busca por novas drogas no combate ao câncer tem sido incessante, principalmente contra o melanoma que é particularmente, o câncer de pele mais agressivo e de pior prognóstico. A acidificação tem sido descrita como de suma importância nos processos tumorigênicos, e os presentes dados e outros previamente produzidos por nosso grupo destacam o mirtenal como um novo alvo para estudos futuros que visem produzir novos compostos através da síntese de complexos organometálicos e testando novas combinações com quimioterápicos clássicos, visando a potencialização dos tratamentos através da conjugação de drogas.

2.7. Conclusão

O monoterpeno mirtenal, além do efeito antimetastático já previamente relatado por nosso grupo, foi aqui demonstrado ser capaz de hipersensibilizar as células para ação da cisplatina, levando a diminuição drástica da concentração necessária de cisplatina para a efetividade do tratamento.

- Com o uso do sistema MART de aquisição de imagens termométricas de alta precisão observou-se diferentes microdomínios em áreas dos tumores com diferentes temperaturas, e nossos dados revelaram existir uma estreita relação destas diferenças térmicas com o metabolismo tumoral, enzimaticamente aferido pela atividade da V-ATPase que apresentou maior eficiência (acoplamento funcional) nas áreas centrais, termicamente mais ativas do tumor.

3. Capítulo II - Síntese, estrutura e atividade antiproliferativa de um novo complexo binuclear de IAA-cobre (II) em células THP-1 de leucemia

3.1. Introdução

3.1.1. Leucemias

As leucemias são neoplasias malignas originadas de células precursoras hematopoiéticas, caracterizadas pela perda da habilidade normal de diferenciação e proliferação desregulada de progenitores (denominados blastos), levando a um acúmulo de células imaturas, clonais e não-funcionantes na medula óssea (MO) e, posteriormente, no sangue periférico (SP). A MO normal possui menos de 5% de células blásticas, com uma evidente proliferação e maturação das séries eritrocitária, megacariocitária e granulocitária. No entanto, à medida que se acumulam na MO, as células leucêmicas suprimem a expansão dos progenitores hematopoiéticos normais, o que leva ao quadro clínico característico das leucemias: anemia, trombocitopenia e infecções resultantes da diminuição dos leucócitos funcionais no SP (Kampen 2012). O termo leucemia foi originalmente descrito por Rudolf Virchow (1821-1902), e deriva da expressão grega leukós haima, que significa "sangue branco".

As causas que levam ao desenvolvimento da leucemia não são completamente determinadas, embora, atualmente, uma série de fatores descritos como leucemogênicos tenham sido identificados, e estão envolvidos na ativação de oncogenes (genes associados à evolução e proliferação de células neoplásicas) ou na inativação de genes supressores tumorais. Similarmente ao que acontece na grande maioria dos casos de câncer, diferentes fatores podem estar diretamente associados a etiologia das neoplasias hematopoiéticas, incluindo fatores genéticos, imunológicos e ambientais, incluindo infecções (Gromminger, *et al.*, 2012).

Um maior risco de desenvolver leucemias já foi comprovado em indivíduos com distúrbios congênitos associados a anormalidades

cromossômicas. Por exemplo, estudos mostraram que o risco de leucemia é 15 vezes maior em pacientes com Síndrome de Down, comparado ao risco da população geral. Similarmente, síndromes de instabilidade cromossômica, tais como Anemia de Fanconi e a Anemia de Bloom, também foram associadas a um maior risco de desenvolver leucemias (Seif, 2011). Vários estudos comprovaram uma etiologia viral em vários casos de leucemias humanas. Diferentes patógenos já foram descritos como associados, incluindo o vírus linfotrópico de células T humanas do tipo I e II (HTLV-1), isolados em linfócitos neoplásicos oriundos de pacientes com LLA; e o vírus Epstein Barr, pertencente ao grupo do herpes vírus, tendo sido considerado como possível agente etiológico do linfoma de Burkitt. Além das infecções virais, os fatores de risco mais frequentemente associados ao desenvolvimento de neoplasias hematopoiéticas, incluem a exposição à radiação ionizante, ao benzeno e às quimioterapias citotóxicas (Gromminger, *et. al.*, 2012).

3.1.2. Classificação das Leucemias

As leucemias são inicialmente classificadas quanto a linhagem hematopoiética predominantemente envolvida no processo (linfoide ou mieloide) e quanto ao grau de maturidade dessas células (agudas ou crônicas). Desta forma, uma classificação inicial subdivide as leucemias em quatro padrões distintos (Meenaghan, *et al.*, 2012):

- Leucemia linfoblástica aguda (LLA);
- Leucemia mielóide aguda (LMA);
- Leucemia linfoide crônica (LLC);
- Leucemia mieloide crônica (LMC);

Nas leucemias crônicas (LC), há um aumento lento de células neoplásicas mais diferenciadas, que substituem paulatinamente os elementos normais da medula óssea levando a um quadro mais favorável. Por outro lado, as leucemias agudas (LA) se caracterizam por um infiltrado predominantemente de células com características blásticas, de rápida evolução clínica e curso potencialmente fatal (Meenaghan *et al.*, 2012). As LA apresentam uma grande relevância clínica, uma vez que constitui a principal

causa de óbito por câncer em crianças e adultos com menos de 39 anos de idade, sendo a LLA mais comum em crianças, e a LMA mais prevalente em adultos (Deschler e Lubbert, 2006).

Embora o grupo das LA seja altamente heterogêneo, a apresentação clínica dos diferentes subtipos é semelhante. Inicialmente, o diagnóstico das leucemias agudas era realizado apenas através da análise morfológica e citoquímica do esfregaço sanguíneo e medular. Posteriormente, surgiram novas técnicas (imunofenotipagem, citogenética e biologia molecular) para a adequada classificação, que hoje são indispensáveis para um diagnóstico diferencial entre elas, que se faz extremamente importante, uma vez que determina a escolha do melhor esquema terapêutico a ser utilizado (Haferlach *et al.*, 2005)

3.1.3. Células THP -1 e Quimorresistência

As células THP-1 designam uma linhagem celular semelhante a monócitos, porém imortalizados, derivada de um caso infantil de leucemia monocítica aguda. As células THP-1, incluindo seus derivados geneticamente modificados, representam ferramentas valiosas para a investigação da toxicidade de drogas, bem como sua comparação com outras células tumorais menos diferenciadas. Linhagens celulares humanas levam a análise e interpretação de resultados mais complexas, sendo possível estudar funções, mecanismos e respostas celulares bem como vias de sinalização e transporte de nutrientes e drogas. Estes apoiam a atividade farmacológica comprovada *in vivo* de droga e eficácia na promoção de saúde de compostos selecionados para uso humano. (Chanput, 2014).

As células THP-1 são consideradas menos resistentes a drogas quando comparadas a outras células tumorais de linhagem humanas e murinas. A quimorresistência está muito relacionada aos mecanismos de resistência a múltiplas drogas (sigla do termo em inglês - MDRs). As MDRs atuam na diminuição do acúmulo de drogas dentro das células, e são um ponto que diferenciam células mais resistentes. A expressão diferencial nas membranas da Glicoproteína P e as ATPases são descritas como importantes no processo

de quimiorresistência pela expulsão das drogas para o meio extracelular e pela modulação do microambiente tumoral.

3.1.4. Quimioterapia Antineoplásica

Existem três tipos principais de tratamento para o câncer: cirurgia, radioterapia e quimioterapia (Murad e Katz, 2000). Outros métodos, também utilizados hoje em dia, compreendem a fotirradiação com derivados hematoporfíricos (HTP) e a imunoterapia. O objetivo de cada um destes tratamentos é erradicar o câncer, normalmente por meio da terapia combinada, onde é associado mais do que um tipo de tratamento. Apenas com os métodos de tratamento citados, um terço dos pacientes alcança a cura total através de medidas locais (cirurgia ou radioterapia), que são eficazes quando o tumor ainda não sofreu metástase por ocasião do tratamento. Todavia, na maioria dos casos, a neoplasia caracteriza-se pelo desenvolvimento precoce de micrometástases, indicando a necessidade de uma abordagem sistêmica, que pode ser efetuada em somente cerca de 60-70% dos casos (Deschler e Lubbert, 2006).

O grande avanço da quimioterapia moderna aconteceu após a introdução da cisplatina durante a década de 70, o que mudou consideravelmente a perspectiva para pacientes com câncer testicular, sendo mais tarde também usada no tratamento de outros tumores sólidos. Durante as décadas seguintes, alguns novos fármacos contribuíram substancialmente como opções para o tratamento do câncer, entre eles o taxol, com alta atividade contra o câncer de mama, e os inibidores de topoisomerase I, como o Irinotecano. Além disso, os antimetabólicos fludarabina e cladribina têm estendido o leque de opções para o tratamento de alguns tipos de linfomas (Nygren, 2001).

Uma grande limitação da quimioterapia no tratamento do câncer são seus frequentes efeitos colaterais. Embora os fármacos com ação antitumoral sejam produzidos com o objetivo de causar danos às células cancerígenas, células hematopoiéticas e células epiteliais intestinais normais, e os queratinócitos da matriz capilar são frequentemente suscetíveis aos efeitos tóxicos desses agentes, o que explica a maior parte dos efeitos colaterais da

quimioterapia: náuseas, perda de cabelo e susceptibilidade maior às infecções. Porém, o corpo recupera-se destes inconvenientes após o tratamento, e o uso clínico desses fármacos exige que os benefícios sejam confrontados com a toxicidade, na procura de um índice terapêutico favorável. Outra importante limitação da quimioterapia é a resistência específica de alguns tumores a determinados medicamentos aliada ao problema da resistência a múltiplas drogas (MDR), os quais têm sido apontados como uma das principais causas de falha terapêutica e de mortes (Almeida *et al.*, 2005).

Desde o sucesso clínico do composto cisplatina, desenvolveu-se uma intensa busca por novos complexos metálicos que também apresentassem atividade antitumoral, o que levou à descoberta de outros complexos de platina bem como complexos que não contém platina. A química de coordenação permitiu a busca por esses novos complexos, dos quais alguns já são utilizados na clínica médica, com diferentes tipos de mecanismos de ação já descritos.

3.1.5. Complexos Metálicos

As drogas usadas atualmente no combate ao câncer podem ser divididas em duas categorias: citotóxica levando a morte celular, citostática agindo como estabilizador inibindo o desenvolvimento celular. Ambas as categorias levam a uma redução do tamanho do tumor, uma vez que aumentar a mortalidade ou inibir o desenvolvimento acarretam efeitos drásticos nas células tumorais.

Aplicações de metais são datados na literatura em 5000 anos, porém foi só no início da década de 1940 que o uso da primeira quimioterapia sistêmica foi documentada com sucesso. Baseado na experiência de guerra sobre os efeitos do gás mostarda no sistema linfático, esse agente foi utilizado para o tratamento de um paciente com linfoma. Embora o tumor tenha rapidamente crescido após um efeito antitumoral inicial, essa experiência marcou o início da quimioterapia a tumores malignos (Almeida *et al.*, 2005).

O grande avanço na quimioterapia moderna aconteceu após a introdução da cisplatina durante a década de 1970, mudando

consideravelmente a perspectiva para pacientes com câncer testicular, sendo mais tarde usada no tratamento de outros tumores sólidos.

A cisplatina atualmente é o composto mais usado como droga citotóxica em tratamentos convencionais contra o câncer. Os elementos metálicos de transição são responsáveis pelas propriedades funcionais de diferentes enzimas. Os biometais, são obtidos através da formação de complexos com diferentes bioligantes, seus mecanismos de ação são definidos pelas propriedades cinéticas e termodinâmicas.

Compostos candidatos a fármacos devem apresentar algumas propriedades importantes: carga neutra, baixo peso molecular, estabilidade hidrolítica e termodinâmica, biodisponibilidade oral e capacidade funcional. Considera-se que um bom agente terapêutico deve também ser capaz de cruzar membranas biológicas tanto no processo de absorção inicial quanto no processo de captação intracelular. Poucos íons metálicos possuem um mecanismo inerente de transporte ativo ou facilitado, com exceção de metais essenciais como cobre, zinco e ferro. Essa capacidade de alguns compostos metálicos está relacionada diretamente com alguns fatores como hidrossolubilidade, lipossolubilidade, volatilidade, peso molecular, toxidez e lipofilicidade.

Uma característica importante dos elementos metálicos é que eles facilmente perdem elétrons formando íons carregados positivamente que são solúveis em fluidos biológicos. Metais são deficientes em elétrons, muitos compostos biológicos como H_2O , amino ácidos, fosfatos, ácidos, incluído o DNA, são ricos em elétrons. A atração de cargas opostas leva a uma tendência geral dos metais de se ligar e interagir com moléculas biológicas.

Complexos metálicos ou complexos de coordenação, são estruturas constituídas de um átomo central (metal) ligado a ânions (ligantes). Esses compostos têm algumas vantagens sobre compostos carbônicos convencionais. Estas vantagens são devidas à sua capacidade de coordenar ligantes numa configuração tridimensional, permitindo assim a funcionalização de grupos adaptados a alvos moleculares definidos. No desenvolvimento de novas drogas os ligantes são importantes, uma vez que podem limitar os

efeitos tóxicos dos metais e potencializar suas propriedades terapêuticas (Brown *et al.*, 2005).

3.1.6. ácido indol-3-acético

O ácido indol-3-acético (AIA) é um metabólito do aminoácido triptofano produzido nas células vegetais, nos animais, inclusive no homem e em alguns microorganismos como bactérias e fungos. AIA é classificado como hormônio vegetal pertencente ao grupo das auxinas (Mills, 1991). Nos vegetais, o AIA exerce um importante papel no controle de muitos processos fisiológicos tais como a divisão celular, crescimento, diferenciação e resposta aos estímulos abióticos (Bartel, 1997).

Em animais o AIA está presente na urina, no líquido cefalorraquidiano, no plasma e em diversos órgãos como pulmão, rim, fígado e cérebro (Pugine *et al.*, 2007). A presença de AIA nos animais pode ser devida a três vias: a) síntese a partir do triptofano; b) absorção intestinal via produção bacteriana e c) absorção intestinal via dieta rica em vegetais (Martinez *et al.*, 2003). Segundo alguns autores a administração intragástrica de AIA não apresenta toxicidade para ratos ou camundongos (Martinez *et al.*, 2003).

3.1.7. Química de Coordenação

A fim de entender se um composto metálico em particular pode ser escolhido para uma determinada aplicação medicinal, preliminarmente é necessário entender as propriedades químicas deste composto. A área da química que estuda tais compostos denomina-se química de coordenação. A origem da química de coordenação como um braço da química clássica data do início do século 20 e é marcado pela atribuição do prêmio Nobel a Alfred Werner em 1913. Dentre outras conquistas, Werner estabeleceu a estrutura do composto de coordenação conhecido hoje como cisplatina, usado amplamente na terapia antitumoral (Brown *et al.*, 2005).

Compostos de coordenação podem ser definidos como substâncias que contêm metais ao qual estão ligados moléculas ou ânions, denominados genericamente de ligantes. O conjunto de ligantes dá forma a esfera de coordenação do íon metálico, e o átomo do ligante que se liga ao íon metálico

é o átomo doador. O número de átomos doadores ligados ao íon metálico representa o número de coordenação do íon metálico (Brown *et al.*, 2005).

Compostos de coordenação são instrumentos chave de outra área da química, a inorgânica medicinal. A química inorgânica medicinal busca explorar as propriedades únicas de íons metálicos para a concepção de novos medicamentos. No desenvolvimento de metalofármacos, as moléculas orgânicas (ligantes) apresentam papel importante, uma vez que podem limitar os efeitos tóxicos dos metais e potencializar suas propriedades terapêuticas. Ligantes sintéticos planejados para obtenção de compostos de coordenação podem permitir a obtenção de novos agentes terapêuticos; Brujininx e Sadler, 2008).

3.2. Justificativa

O câncer consiste num dos maiores problemas de saúde pública do mundo. Segundo a organização mundial de saúde, milhões de pessoas são diagnosticadas com câncer no mundo, o que virá a constituir a causa mortis da maioria dessas pessoas (WHO 2020).

A quimioterapia ainda continua sendo a principal forma de tratamento para a maior parte dos cânceres, onde aliada a outros tratamentos como a radioterapia e a cirurgia alcança boas taxas de cura e regressão do tumor. Em relação à quimioterapia, a grande limitação continua sendo o problema gerado pelos efeitos tóxicos dos fármacos usados durante o tratamento, os quais não são seletivos para o tumor e acabam provocando fortes efeitos colaterais no organismo do paciente, como náuseas, perda de cabelo e imunodeficiência, que estão entre os mais comuns.

Outro problema muito comum é resistência dos tumores às principais drogas disponíveis, intrínseca a alguns tumores e adquirida por outros durante o tratamento, elevando o número de casos de inefetividade terapêutica e mortes. Portanto, a identificação de novos agentes antitumorais mais potentes, seletivos, e menos tóxicos, permanece como uma das mais urgentes metas para o combate ao câncer.

O grupo de pesquisa de Bioenergética e Sinalização Celular da UENF vêm obtendo resultados consistentes em pesquisas relacionadas ao câncer.

Tais resultados tem servido de motivação para a continuação das pesquisas na busca de novos compostos capazes de interagir com diferentes alvos celulares, como DNA, RNA e proteínas, visando a obtenção de novos metalofármacos com potenciais aplicações terapêuticas futuras.

3.3. Objetivos

3.3.1. Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo a síntese e a caracterização de compostos de coordenação de AIA com cobre (II) contendo ligantes N, O-doadores e a amina, bem como a avaliação da atividade antineoplásica dos mesmos frente a 2 linhagens de células de câncer de pele melanômico e 1 linhagem de células leucêmicas.

3.3.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar o ligante *ácido indol-3-acético* (AIA).
- Sintetizar complexos de AIA com cobre (II) utilizando o ligante proposto.
- Caracterizar o composto de coordenação obtido pelas técnicas de espectroscopia de infravermelho, análise elementar, espectrometria de massas com ionização por *electrospray* e medidas de condutividade.
- Avaliar o efeito dos compostos na viabilidade celular.
- Determinar Dose Letal Mediana (DL50) dos compostos em camundongos C57/BL6.
- Analisar a atividade do complexo quando em contato com tumores leucêmicos em cobaias.

3.4. Metodologia

3.4.1. Quimioterápicos

A complexação do AIA foi feita em colaboração do grupo com o LCQUI. A Cisplatina e Nitrato de cobre II foram comprados da Sigma-Aldrich.

3.4.2. Caracterização Físico-química dos precursores ligantes e complexos.

As sínteses dos ligantes e dos complexos foram realizadas utilizando-se solventes de graus PA adquiridos de fontes comerciais (Aldrich, Acros, Vetec, Synth e Merck) sem prévia purificação. As reações orgânicas foram acompanhadas por análise cromatográfica em camada delgada (TLC) (sílica gel F254 – Merck) utilizando-se solvente adequado. As reações foram realizadas sob agitação magnética e, para aquelas que necessitem de aquecimentos, foram usadas placas de agitação com aquecimento marca Fisatom ou Fisher e termômetro para controle da temperatura de banho.

3.4.3. Cristalografia de Raios-X

O Cristal formado foi analisado por **cristalografia de raios X** que é uma técnica que consiste em fazer passar um feixe de raios X, uma forma de radiação eletromagnética, através do cristal da substância sujeita ao estudo.

3.4.4. Cultura de Células

As células B16 F10 e B16 F0 melanoma murinho muito metastática e pouco metastática respectivamente, e as células THP 1, Leucemia, foram adquiridas do Banco Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB em garrafas de cultura de 25cm³a 37°C com 5% de CO₂ e umidade controlada.

3.4.5. Testes de viabilidade celular- Ensaio do MTT

O teste de viabilidade celular utilizando a ensaio de redução do MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio), Sigma, M2128, foi feito de acordo com a metodologia descrita por Mosmann (1983). Para os testes, as células foram transferidas para placas de cultura de 96 poços, e incubadas em diferentes tempos com as drogas analisadas. A viabilidade foi avaliada pelo teste do MTT, que forma uma solução amarelada, a qual muda sua coloração sob o efeito da atividade redox das desidrogenases de NAD(P)H, formando cristais insolúveis de formazan, de coloração azul ou roxa. Após 4 horas de incubação, foi retirada 100 µL do sobrenadante das culturas de células e os cristais púrpuras precipitados de MTT foram solubilizados em 100 µL de solução de isopropanol (Merck, 1009781000) com 0,0014% de HCl fumegante. E a amostra foi lida com comprimento de onda ajustado para 570nm, cuja densidade ótica se correlaciona à atividade metabólica celular e a taxa de viabilidade celular, calculada de acordo com a fórmula a abaixo:

$$\text{TVC} = ((\text{MDOT} - \text{MDOCN}) \times 100) / (\text{MDOCP} - \text{MDOCN})$$

Onde:

TVC = Taxa de Viabilidade Celular

MDOT = Média das Densidades Ópticas de Cada Teste

MDOCN = Média das Densidades Ópticas do Controle Negativo

MDOCP = Média das Densidades Ópticas do Controle Positivo

3.4.6. Tratamento in vivo de tumor induzido por THP-1

Todos os procedimentos com camundongos foram aprovados pelo Comitê de Uso de Ética Animal da Universidade Estadual Fluminense do Norte de Darcy Ribeiro (Rio de Janeiro, Brasil). Camundongos machos BALB / c nus, com 6 e 8 semanas de idade, foram mantidos em condições livres de patógenos em salas de fluxo laminar com temperatura e umidade constantes. As células THP-1 (1×10^7 células) em 0,1 mL de DMEM foram injetadas por via subcutânea na parte de trás do mouse. Quando os tumores estavam visíveis,

os camundongos portadores de tumor foram divididos aleatoriamente em quatro grupos (6 / grupo) e tratados com cisplatina (como controle positivo) ou complexo IAA do complexo cooper (II) e camundongos não tratados foram injetados com 0,05 mL de DMSO. Os ratos foram tratados a cada 72 h por 6 semanas. Os tamanhos dos tumores foram medidos usando pinças no início, meio e no final do tratamento.

3.4.7. Massa corpórea

O peso corpóreo foi acompanhado individualmente a cada 3 dias. Medições individuais de peso foram obtidas com o auxílio de uma balança, de forma a acompanhar o seu aumento ou diminuição para uma análise clínica dos animais. Os valores obtidos foram utilizados na construção da curva de ganho de peso corporal, no software GraphPadPrism 5.0.

3.5. Resultados

3.5.1. Síntese e estrutura do composto de coordenação de cobre (II)

O complexo IAA-cobre (II) foi sintetizado pela coordenação do grupo carboxilato presente no ligante IAA após desprotonação do ácido carboxílico (Figura 20). O complexo foi isolado como sólidos verdes estáveis ao ar. Em seguida, os cristais isolados foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho e a estrutura molecular foi determinada por difração de raios-x.

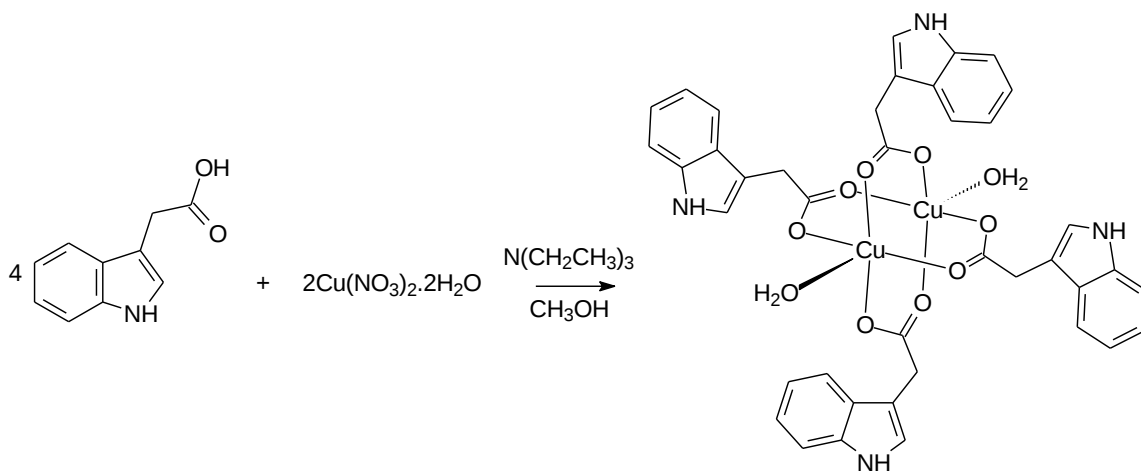


Figura 10: Esquema de síntese do complexo de cobre II.

O espectro de infravermelho do complexo foi analisado e comparado com o espectro do ligante IAA. A banda intensa observada acima de 3380 cm⁻¹ para o ligante e o complexo (figura 1S suplementar), que estão relacionadas ao N-H do grupo amina para ambos os compostos. Outra banda intensa presente em ambos os espectros foi observada em 1701 cm⁻¹ para o ligante e em 1591 cm⁻¹ para o complexo. Essa redução observada se deve ao enfraquecimento das ligações C = O após a complexação, indicando a coordenação desse grupo carboxila com o centro de cobre, conforme confirmado pela difração de raios-X. Como nos ligantes, os complexos mostram bandas próximas a 1200 cm⁻¹ e 1400 cm⁻¹, atribuídas ao alongamento axial da C-N e da C = C, respectivamente. Detectou-se perto de 740 cm⁻¹ em ambos os espectros, nos modos de flexão orto-aromáticos fora do plano.

A estrutura molecular do complexo de cobre (II) sintetizado neste trabalho foi resolvida por difração de raios-X e é apresentada na Fig. X. Os principais comprimentos e ângulos de ligação são mostrados na Tabela 1. O complexo IAA-cobre (II) apresentou dois cobres no centro da estrutura, assumindo uma geometria piramidal quadrada cercada por quatro moléculas IAA ligadas ao centro de cobre por um ambiente O5 como resultado da presença de um ligante H₂O na posição apical.

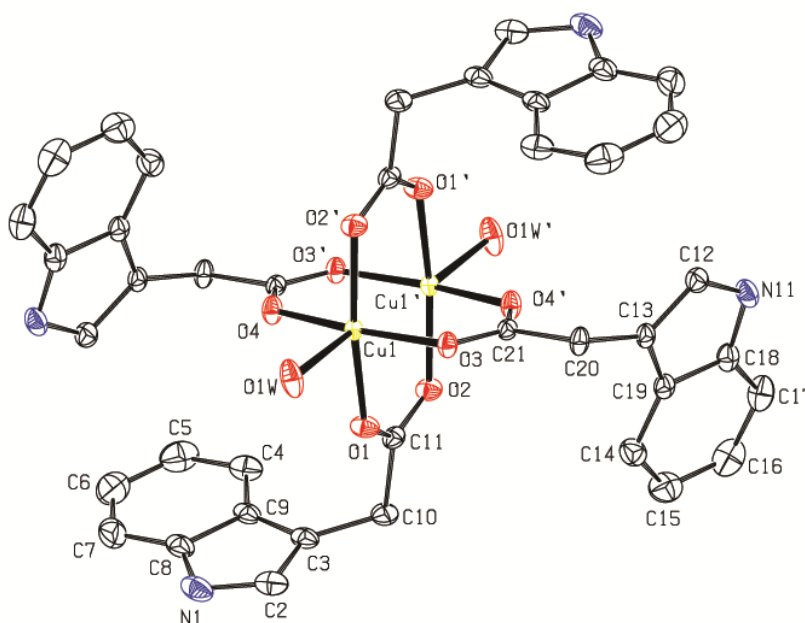


Figura 11. Gráfico ORTEP e esquema de rotulagem do complexo 1, gráfico elipsoide térmico com nível de probabilidade de 50%. Os outros átomos da unidade assimétrica foram gerados por simetria $-x + 1$, $-y + 1$, $-z + 1$.

3.5.2. Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio MTT

A triagem do efeito anti-proliferativo de novos compostos biologicamente ativos é essencial na pesquisa do câncer em relação ao desenvolvimento de novos medicamentos antitumorais. Aqui, a citotoxicidade dos complexos foi avaliada usando a linhagem celular de leucemia humana (THP-1), as linhagens celulares de melanoma (B16F10, B16F0) e as células não tumorais J774 (Macrófagos, usados como controle) por meio do ensaio colorimétrico MTT, que é baseado na conversão do sal tetrazólio amarelo MTT em cristais roxos de formazan por células metabolicamente ativas. Como controle positivo, a citotoxicidade da cisplatina para diferentes linhagens celulares também foi avaliada nas mesmas condições experimentais. Como mostrado na Tabela 2, o complexo IAA-cobre exerce um efeito inibidor potente na linha celular THP-1 com linhas $IC_{50} = 32$ (THP-1) e melanoma (B16F0, B16F10) com $IC_{50} = 123$ e 200, respectivamente. Vale ressaltar que esses valores são superiores aos obtidos para a cisplatina (18 e 32 $\mu\text{mol dm}^{-3}$, respectivamente). A atividade antitumoral da molécula IAA, o agente de ligação, foi inferior ao seu complexo de cobre (II) para todas as linhas celulares testadas.

IC50 (μM)	Cisplatina	IAA	$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$	JD07/16
Linhagem Celular				
J774	1.2 ± 3.4	> 800	> 200	12 ± 2.7
THP-1	$18 \pm 2,18$	> 800	> 200	32 ± 1.9
B16F0	$78 \pm 2,67$	> 800	> 200	123 ± 2.5
B16F10	$52 \pm 3,86$	> 800	> 200	> 200

Tabela 3: Valores de IC_{50} das diferentes linhagens celulares.

3.5.3. Teste de toxicidade aguda para o complexo IAA-cobre (1) - DL50

A fim de determinar a toxicidade aguda in vivo dos ratos machos BALB / c NUDE do complexo IAA-cobre, entre 22 g e 25 g foram separados em grupos de 4 animais. O complexo foi injetado na cavidade peritoneal, de modo que

cada grupo recebeu as respectivas concentrações do composto (15,62, 31,25, 62,5, 125 mg.kg⁻¹). Para inoculação foram utilizadas uma seringa de 1 cm³ e uma agulha estéril hipodérmica SR 0,25 mm × 6 mm BD ultrafina. O veículo utilizado para a administração do complexo foi o DMSO. Os animais foram observados de perto por pelo menos 4 horas após a injeção e em intervalos de 24 horas por 15 dias depois. Após esse período, foi determinada a dose letal mediana (DL50). O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, sob o protocolo CEUA/2016. A sobrevivência dos animais foi monitorada por até 15 dias. A Figura 3 mostra a porcentagem de camundongos nus BALB/c vivos e o DL50 calculado foi de 72,61 mg/kg.

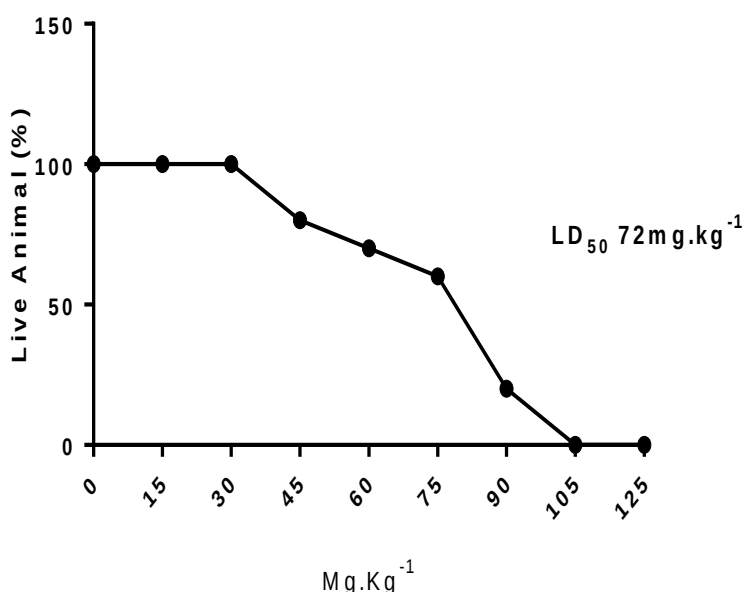


Figura 12: Avaliação da inibição do tumor THP-1 da leucemia humana pelo complexo de cobre (II) em um modelo de camundongo nu BALB / c. A- Determinação da dose letal. Camundongos nus BALB / c foram injetados via intraperitoneal com complexo em doses variando de 6 a 125 mgkg⁻¹ e foram observados por 15 dias. A DL50 foi calculada usando a análise Probit.

A Figura 14 mostra que o tratamento de camundongos BALB /C com o complexo IAA-cobre (II) suprimiu significativamente o crescimento de células de leucemia THP-1. Como mostrado na figura 4, observou-se inibição de 80% do crescimento do tumor nos grupos de camundongos tratados com 35 mg / kg-1 de complexo IAA-cobre (II), respectivamente, em comparação com o grupo controle não tratado. No Grupo 3 tratado com cisplatina foi observado inflamação além de não ter sido eficiente na contenção de seu crescimento.

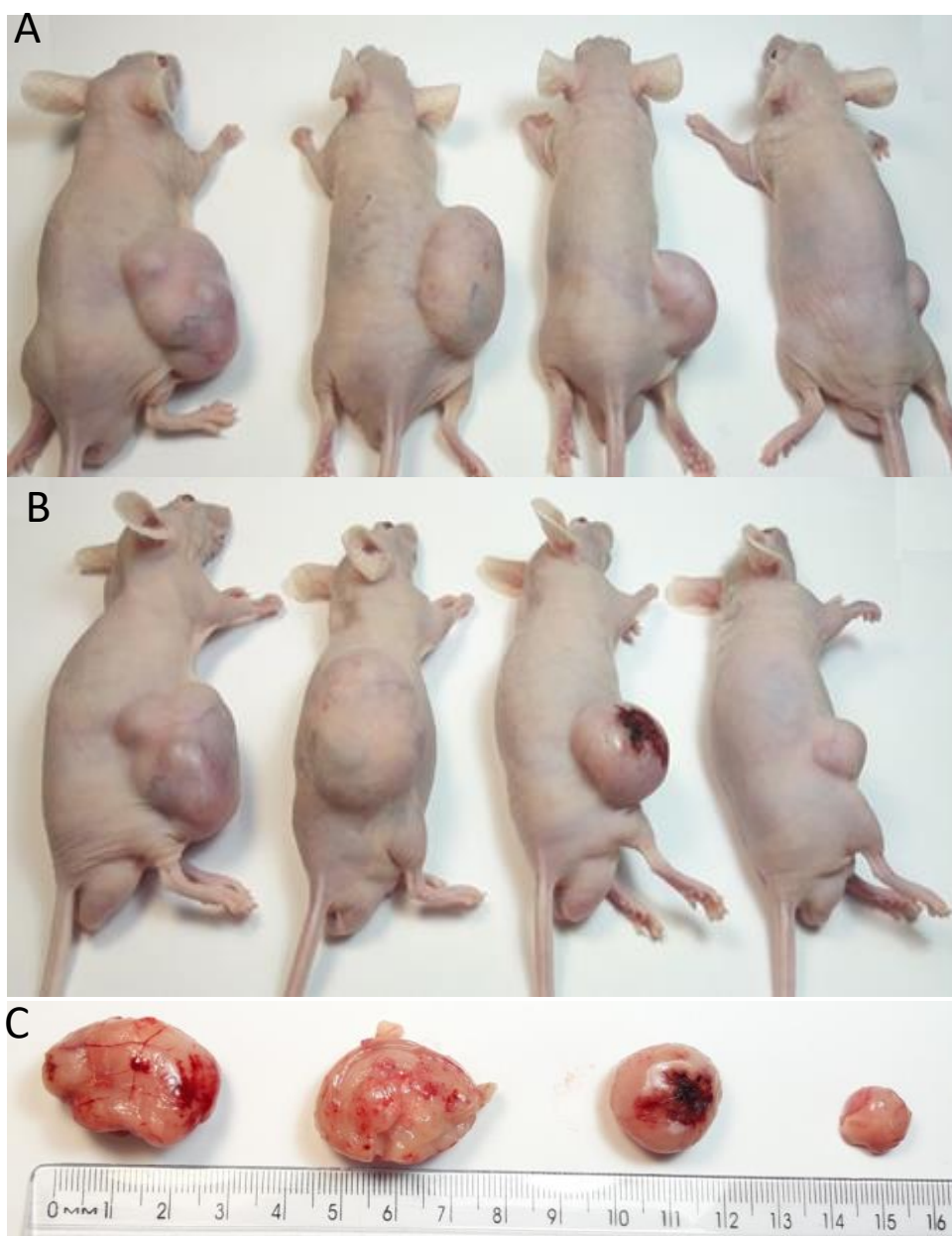


Figura 13: Avaliação da inibição do crescimento tumoral. Camundongos portadores de tumor THP-1 foram tratados com 35 mg / kg-1 de complexo de cobre (II) em dias alternados por 6 semanas. O grupo 1 é controle, o grupo 2 foi injetado 35 mg / kg-1 AIA; o grupo 3 foi injetado cisplatina e o grupo 4 foi injetado 35 mg / kg-1 do complexo cobre (II)

3.6. Discussão

O câncer representa um dos mais graves problemas de saúde em nível mundial, atingindo indiscriminadamente a todos os países, todas as etnias, e classes sociais. A quimioterapia ainda é o tratamento terapêutico mais utilizado contra a maior parte dos cânceres, sendo administrada sozinha ou em conjunto com outras técnicas. No entanto, a resistência a drogas antitumorais é o maior obstáculo para o seu sucesso (Almeida *et al*, 2005). Os efeitos tóxicos das drogas antitumorais se devem a baixa seletividade, ou seja, as drogas matam tanto as células cancerígenas quanto as células normais humanas. Dessa forma, substâncias que possam atuar diretamente sobre as células tumorais e poupar as células normais são um bom indicador para a continuidade dos testes de avaliação do potencial antitumoral.

A partir da interação do ligante AIA com diferentes sais, observou-se a formação de cristais quando em contato com Nitrato de Cobre II, os dados de cristalografia possibilitaram determinar a molécula formada, chegando-se a conformação de quatro AIA associadas a um núcleo com dois íons Cu. Após análises iniciais efetuadas com várias células e diferentes concentrações do composto chegou-se ao IC 50 de 32 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ para células THP-1, 123 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ para B16 F0 e > 200 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ para B16F10. Quando comparado ao ligante, observa-se nitidamente que a ligação com o cobre formou uma nova molécula capaz de ser mais tóxica para as células tumorais. As análises de DL 50 foram feitas de acordo com Yan e Gemeinhart (2005), e foi estabelecida em 72.42 mg/ kg⁻¹, para efeito de comparação o valor da cisplatina é de 14,5 mg kg⁻¹.

As células THP-1 são usadas como modelos de células cancerígenas *in vitro* (Chao *et al.*, 2018), bem como modelos para estudar alguns processos de diferenciação e fisiológicos relacionados a macrófagos, por exemplo, o efluxo de colesterol (Wang *et al.*, 2018). O efluxo de colesterol dos macrófagos é o primeiro e um dos mais importantes processos celulares que operam no sistema de controle do colesterol vascular. Interessantemente, nosso grupo descobriu que a depleção do colesterol afeta significativamente a atividade da V-ATPase e os processos metastáticos iniciais seguindo um perfil semelhante

ao observado na presença do inibidor específico da V-ATPase, a concanamicina (Costa et al., 2018). Neste contexto, é possível que a maior susceptibilidade das células THP-1 ao complexo de AIA com cobre (II) sintetizado neste trabalho. As células THP-1 são mais diferenciadas quando comparadas a células com maior potencial de malignidade; a expressão de diferentes proteínas na membrana plasmática está diretamente envolvida com a quimorresistência, abrindo uma linha para comparação das diferentes células e assim poder entender essa maior susceptibilidade das células THP-1, ao nosso composto, quando comparada a outras linhagens. Outra possibilidade que merece futura investigação, trata-se do mecanismo de ação de AIA e outras auxinas em células vegetais, onde tais moléculas podem modular bombas de prótons ao ligar em receptores de membrana. Apesar das significativas diferenças entre as membranas celulares de plantas e animais, é relevante destacar que nas células tumorais ocorre um enriquecimento de H^+ -ATPases na membrana plasmática, o que gera gradientes eletroquímicos de H^+ semelhante ao que ocorre nas membranas plasmáticas de plantas, as quais naturalmente são energizadas por H^+ -ATPases. Mesmo sendo bombas de H^+ de classes diferentes, sendo V-ATPases as de células tumorais e as de plantas P-ATPases, ambas têm sido descritas colocalizar com outras proteínas funcionais em 'rafts', microdomínios de membrana enriquecidos com colesterol ou fitoesteróides, respectivamente. Ou seja, pode-se especular que este complexo de AIA e Cu (II) possa vir a promover seus efeitos sobre as bombas de H^+ ao ligar em receptores auxínicos e/ou purinérgicos e desestabilizar os rafts onde estas proteínas estão funcionalmente acopladas com as bombas iônicas e outros transceptores que participam do controle da energização e sinalização transmembranares. Tal mecanismo seria análogo ao previamente descrito para o efeito antimetastático do monoterpene mirtrenal em melanoma (Martins et al., 2019), porém de forma mais específica por possivelmente envolver ligação direta a proteínas dos sistemas de transdução de energia e sinalização associados aos rafts de membranas.

O complexo sintetizado foi farmacologicamente mais eficaz *in vivo* do que *in vitro* e exibiu valores mais altos de IC₅₀. Este é um caso bastante interessante em que os resultados *in vitro* não refletem a atividade *in vivo* de

um composto, sendo mais comum o contrário, ou seja, atividades biológicas de novos compostos descritas *in vitro* não apresentarem o mesmo desempenho quando testadas *in vivo*. Um composto de rutênio chamado NAMI-A é um bom exemplo desse tipo de situação. O NAMI-A e alguns de seus derivados mostraram pouca ou nenhuma citotoxicidade em células cultivadas *in vitro*, mas exibiram clara atividade anti-metastática *in vivo*.

Numerosos derivados sintéticos foram sintetizados e avaliados quanto à atividade antitumoral. Várias moléculas à base de compostos indólicos têm sido testadas e algumas já foram aprovadas e já se encontram em uso no tratamento de tumores cancerígenos. Alguns alcaloides indólicos de ocorrência natural obtiveram aprovação da FDA, incluindo a vincristina, vinblastina, vinorelbina e vindesina para atividade antitumoral. Além da ocorrência natural, os compostos indólicos são bons ligantes, possuem um grupo amina e carboxila, o que constitui fator importante na produção de novos compostos metálicos anticancerígenos, como o complexo de cobre (II) descrito neste trabalho.

4. Conclusões

Os resultados do presente trabalho sugerem que o mirtenal e possivelmente outros monoterpenos com estruturas e propriedades análogas, possuem capacidade de atenuar o processo de metástase, com especial relevância para a medicina veterinária como tratamento de baixo custo, apresentando elevada eficiência no tratamento de camundongos com metástase induzida por células de melanoma murinho B16F10.

Camundongos com metástase induzida no pulmão apresentaram drástica redução no número de nódulos metastáticos quando tratados com mirtenal; camundongos com metástase nos linfonodos apresentaram redução no tamanho da metástase. Observou-se que além dos resultados macroscópicos, o mirtenal foi capaz de reduzir a invasão dos tecidos, e as bombas de H^+ isoladas de tumores retirados dos camundongos foram inibidas por mirtenal em cerca de 80 %.

Os testes de toxicidade com mirtenal *in vivo* demonstraram sua baixa toxicidade. Camundongos quando tratados com mirtenal apresentaram quadro clínico normal, com manutenção do peso, não se observando quedas de pelos e nem inatividade dos animais tratados.

Resultados das análises termométricas demonstram que determinados locais do tumor possuem uma liberação de calor maior quando comparadas com outros campos, esse trabalho demonstrou que as diferenças de temperatura locais se correlacionam com as mudanças das atividades catalíticas e de transporte, e de eficiência no acoplamento funcional das bombas de H^+ .

Um novo composto de cobre II foi sintetizado a partir do ligante AIA, e este foi caracterizado quimicamente e sua estrutura resolvida e patenteada. A atividade antitumoral do composto AIA-Cobre II foi verificada se mostrando mais eficiente que o da cisplatina na linhagem de células leucêmica THP-1. Devido à elevada citotoxicidade observada contra as células tumorais testadas, baixa toxidez *in vivo* e baixo custo quando comparado a compostos de platina, este novo composto de Cobre II se mostrou um candidato em potencial para

realização de estudos pré-clínicos (farmacológicos, farmacocinéticos, toxicológicos).

5. Referências

ALMEIDA, V. L. Cancer and cell cycle-specific and cell cycle nonspecific anticancer DNA-interactive agents: an introduction. *Quím. Nova* [online]. 2005, vol.28, n.1, pp.118-129. ISSN 1678-7064.

ANDRADE FILHO, A. C. - Teletermografia: princípios físicos, fisiológicos e fisiopatológicos da produção da imagem e suas indicações na ... *Acta Fisiátrica* 6(2): 55-59, **1999**

BACAC, M., STAMENKOVIC, I. Metastatic Cancer Cell. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. v.3, p.221-247, 2008.

BARTEL, B. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 1997 Jun;48:51-66

BRUIJNINCX P. C. A , PETER J. SADLER, New Trends for Metal Complexes with Anticancer Activity 2008.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, A. P.; DAVID, J. Química e farmacologia de quimioterápicos derivados de plantas. *Química Nova*, v.33, n.6, p. 1359-1369, 2010.

BROWN, K.L., JING LI, AND, XIANG ZOU. NMR Observations of ¹³C-Enriched Coenzyme B12 Bound to the Ribonucleotide Reductase from *Lactobacillus Leichmannii*. *Inorganic Chemistry* **2005**, 45 (23) , 9172-9174

CIPRIANO DJ, WANG Y, BOND S, HINTON A, JEFFERIES KC, QI J, FORGAC M. Structure and regulation of the vacuolar ATPases. *BiochimBiophys Acta* 1777(7-8), 599, 2008.

CHAO, T.L., WANG, T.Y., LEE, C.H., YIIN, S.J., HO, C.T., WU, S.H., YOU, H.L., CHERN, C.L. Anti-Cancerous Effect of *Inonotus taiwanensis* Polysaccharide Extract on Human Acute Monocytic Leukemia Cells through ROS-Independent Intrinsic Mitochondrial Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*. 19 (2): 393. 2018.

COSTA, G.A., DE SOUZA, S.B., DA SILVA TEIXEIRA, L.R., OKOROKOV, L.A., ARNHOLDT, A.C.V., OKOROKOVA-FAÇANHA, A.L., FAÇANHA, A.R. Tumor cell cholesterol depletion and V-ATPase inhibition as an inhibitory mechanism to prevent cell migration and invasiveness in melanoma. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.*;1862(3):684-691. 2018.

CHRISTIANSEN, J., GEROW, G., "Thermography", Williams and Wilkins. Baltimore. 1990.

DE MILITO, A., FAIS, S. Tumor acidity, chemoresistance and proton pump inhibitors. *Future Oncol.*1:779–86, 2005.

DESCHLER, B., DE WITTE, T., MERTELSMANN, R., LÜBBERT, M. Treatment decision-making for older patients with high-risk MDS and AML: Problems and approaches *Haematologica*. 2006;91(11):1515–1524.

DIEPHOLZ, M., BÖRSCH, M., BÖTTCHER, B., Structural organization of the V-ATPase and its implications for regulatory assembly and disassembly. *Biochemical Society Transactions*. 36(5), 1027, 2008.

DOMINGO, S. T., BAGÁN, J. V., JIMÉNEZ, Y., POVEDA R., MURILLO J., DÍAZ J. M., SANCHIS J. M., GAVALDÁ C., CARBONELL E, - Benign tumors of the oral mucosa: A study of 300 patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* , V.13, n.1, p.161-166, 2008.

DOMINGUES, B, LOPES, J.M., SOARES, P, PÓPULO, H. Melanoma Treatment and review, *Immunotargets and Therapy*, 2018.

D. NIELSEN, T. SKOVSGAARD, P-glycoprotein as multidrug transporter: a critical review of current multidrug resistant cell lines, *Biochim. Biophys. Acta*. 1139: 169–183, 1992.

FORGAC, M., Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **8** (11), 917 2007.

FUTAI, M., NAKANISH., NAKANISHI-ATSUI, M., OKAMOTO, H., SEKIYA, M., NAKAMOTO, R. K. Rotational catalysis in proton pumping ATPases: From *E. coli* F-ATPase to mammalian, *Biochim Biophys Acta (BBA) - Bioenergetics*. Vol 1817, cap 10, 1711–1721, 2012.

GATENBY, R. A. & GILLIES, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Rev. Cancer* **4**, 891–899 2004.

GOLAN, D.E.; TASHJIAN, A.H.; ARMSTRONG, E.J., ARMSTRONG, A.W. Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacologia. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2014.

HAFERLACH T, KERN W, SCHNITTGER S, SCHOCH C. Modern diagnostics in acute leukemias. *Crit Rev Oncol Hematol*. ; 56: 223–234, 2005.

HINTON, A., BOND, S., FORGAC, M., V-ATPase functions in normal and disease processes. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. 457(3), 589, 2009.

IMELOUANE, B., ELBACHIRI, A., WATHELET, J., DUBOIS, J., AMHAMDI, H. Chemical composition, cytotoxic and antioxidant activity of the essential oil of *Lavandula dentate*. World Journal of Chemistry. 103-110, 2010.

INCA. Estimativa 2019. Incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional do Câncer, 2019. <http://www.inca.gov.br>

JANG, H., KO, H., SONG, K., KIM, Y.S. A Sesquiterpenoid from Farfarae Flos Induces Apoptosis of MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells through Inhibition of JAK-STAT3. Signaling Biomolecules. 13;9(7): 278. 2019.

KAMPEN, K.R. The Discovery and early understanding of leukemia. Leukemia Research. v.36, n.1, p.6-13, Jan.2012

KIERAN, S., ROBERT, A., GATEMBY, R.A., MAINI, P.A. Mathematical modelling of tumour acidity 106-12. In Journal of theoretical biology 255 (1),2008.

KUMAR, V., ABBAS, A. K., FAUSTO, N. - Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7. ed. Philadelphia. Elsevier Saunders, 2005.

LIS-BALCHIN, M.; DEANS, S.G. Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes* (School of Applied Science, South Bank University, London SE1 0AA (USA))

MARTINEZ-ZAGUILAN, R. LYNCH, R.M., MARTINEZ, G.M., E GILLIES, R.J. Vacuolar-type H⁺-ATPase are functionally expressed in plasma membranes of human tumor cells. American Journal Physiology. 93, 1015-1029, 1993.

MARTINS, B.X.; ARRUDA, R.F.; COSTA, G.A.; JERDY, H.; DE SOUZA, S.B.; SANTOS, J.M.; DE FREITAS, W.R.; KANASHIRO, M.M.; DE CARVALHO, E.C.Q.; SANT'ANNA, N.F.; FACANHA, A.R. Myrtenal-induced V-ATPase inhibition—A toxicity mechanism behind tumor cell death and suppressed migration and invasion in melanoma. Biochim. Biophys. Acta Gen Subj., 1863, 1–12, 2019.

MATSUO, A.I., FIGUEIREDO, C.R., ARRUDA, D.C., SCUTTI, J. 2011. α -Pinene isolated from Schinus terebinthifolius Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model Biochemical and biophysical research communications 411 (2), 449-454

MCGUIRE, C., STRANSKY, L., COTTER, K., FORGAC, M. (). Regulation of V-ATPase activity. *Frontiers in Bioscience*, 22(4), 609–622, 2017.

MEENAGHAN, T., DOWLING, M., KELLY, M. (2012) 'Acute Leukaemia: Making sense of a complex blood cancer'. *Br J. Nurs.*, 20 (2):76-83.

Mills, D. (1991) Fill, a G-protein alpha-subunit that acts upstream of cAMP and is essential for dimorphic switching in haploid cells of *Ustilago hordei*. *Mol Gen Genet.* 256:426–435.

MISHRA, A.K. AND DUBEY, N.K. (1994) Evaluation of Essential Oils for Their Toxicity against Fungi Causing Deterioration of Stored Food Commodities. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 1101-1105

MURAD, A. M.; KATZ, A. *Oncologia bases clínicas do tratamento*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 121-125.

NAKAMURA, K.; YOSHIKAWA, N.; YAMAGUCHI, Y.; KAGOTA, S.; SHINOZUKA, K.; KUNITOMO, M. Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. *Life Sciences*, v. 70, n. 7, p.791–798, 2002.

NYGREN J, THORELL A, Ljungqvist O. Preoperative oral carbohydrate nutrition: an update. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2001; 4(4):255-9.

PÉREZ-SAYÁNS, M, SOMOZA-MARTÍN, J.S., BARROS-ANGUEIRA, F., GAYOSO, P., GÁNDARA REY, J.S., GARCÍA-GARCÍA, A. Multidrug resistance in oral squamous cell carcinoma: The role of vacuolar ATPases *Cancer Letters* 295 135–143, 2010.

SENNOUNE SR, BAKUNTS K, MARTÍNEZ GM. Vacuolar H⁺-ATPase in human breast cancer cells with distinct metastatic potential: distribution and functional activity. *Am J Physiol. Cell Physiol*;286: 1443–52, 2004.

SANTOS, J.M.C.O. Ativação diferencial de V-ATPases na membrana plasmática em linhagens de melanoma. Tese de Mestrado. Centro de Biociências e Biotecnologia. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. 2009. 70p

SEIF, A. Pediatric leukemia predisposition syndromes: clues to understanding leukemogenesis, *Cancer Genet.* 204(5):227-44, 2011.

SENNOUNE SR, LUO D, MARTINEZ-ZAGUILAN R. Plasmalemmal vacuolar-type H⁺-ATPase in cancer biology. *Cell Biochem Biophys* 40:185–206, 2004.

SLEIRE L, FØRDE HE, NETLAND IA, LEISS L, SKEIE BS, ENGER PØ. Drug repurposing in cancer. *Pharmacol Res.* 124:74-91. 2017. doi: 10.1016/j.phrs.2017.07.013.

SOBER AJ, CHUANG TY, DUVIC M. Guidelines of care for primary cutaneous melanoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 45:579-586, 2001.

SONDAK VK, TAYLOR JM, SABEL MS. Mitotic rate and younger age are predictors of sentinela lymph node positivity: lessons learned from the generation of a probabilistic model. *Ann. Surg. Oncol.* 11:247-258, 2004.

STONE, D.K., XIE, X-S., WU, L-T., E RACKER, E. Proton translocating ATPases of clathrin coated vesicles, renal medulla and Ehrlich In: Forte, J.G., e Rector, F.C. *Hydrogen Ion Transport in Epithelia.* New York. Wiley, 1989.

SWALLOW, C.J., GRINSTEIN, S., E ROTSTEIN O.D. A vacuolar type H⁺-ATPase regulates cytoplasmic pH in murine macrophages. *The Journal of Biological Chemistry.* 265, 7645-7654, 1990.

VÄÄNÄNEN, H.K., KARHUKORPI, E.K., SUNDQUIST, K., WALLMARK, B., ROINEN, I., HENTUNEN, T., TUUKKANEN, J, E LAKKAKORPI, P. Evidence for the presence of a proton pump of the vacuolar H⁺-ATPase type in the ruffled borders of osteoclasts. *The Journal of Cell Biology.* 111, 1305-1311, 1990.

VANDER HEIDEN, M.G., CANTLEY, L.C., THOMPSON, C.B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science (New York, N.Y.),* 324(5930), 1029–1033, 2009.

VANTYGHEM, S.A., POSTENKA, C.O., CHAMBERS, A.F. Estrous cycle influences organ-specific metastasis of B16F10 melanoma cells. *Cancer Res.* 15;63(16):4763-5, 2003.

WANG, D., HIEBL, V., LADURNER, A., LATKOLIK, S.L., BUCAR, F., HEIß, E.H., DIRSCH, V.M., ATANASOV, A.G. 6-Dihydroparadol, a Ginger Constituent, Enhances Cholesterol Efflux from THP-1-derived Macrophages. *Molecular Nutrition & Food Research.* 62 (14): e1800011. 2018.

WARBURG, O., POSENER, K., NEGELEIN, E. The metabolism of cancer cells. *Biochem Z.*;152: 319, 1924.

WARBURG, O. On the origin of cancer cells. *Science.*;123: 309, 1956.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Câncer*. Publicação *online* disponível em https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1 - 2020