

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ

Programa de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**NOVAS ABORDAGENS SOBRE O POTENCIAL ANTITUMORAL
DE PRODUTOS NATURAIS E SEMI-SINTÉTICOS EM
MELANOMA *IN VITRO***

SHEILA SUAREZ FONTES

**SALVADOR - BAHIA
2017**

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ

Programa de Pós-Graduação em Patologia

**NOVAS ABORDAGENS SOBRE O POTENCIAL ANTITUMORAL
DE PRODUTOS NATURAIS E SEMI-SINTÉTICOS EM
MELANOMA *IN VITRO***

SHEILA SUAREZ FONTES

Orientador: Dr. Marcos André Vannier dos Santos

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Patologia Humana
para obtenção do grau de Mestre.

SALVADOR - BAHIA
2017

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Fontes, Sheila Suarez

F683n Novas abordagens sobre o potencial antitumoral de produtos naturais e semi
sintéticos em melanoma *in vitro* / Sheila Suarez Fontes. - 2017.
65 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Marcos André Vannier dos Santos, Laboratório
de Biologia Parasitária.

Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia.
Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, 2017.

1. Melanoma. 2. Cloroquina. 3. Estresse oxidativo. 4. Autofagia. I. Título.

CDU 616-006.8

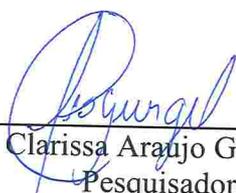
“NOVAS ABORDAGENS SOBRE O POTENCIAL ANTINTUMORAL DE PRODUTOS NATURAIS E SEMI-SINTETICOS EM MELANOMA IN VITRO”

SHEILA SUAREZ FONTES

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 17 de agosto de 2017

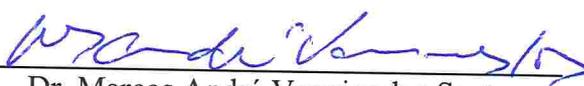
COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Clarissa Araujo Gurgel Rocha
Pesquisadora
IGM / Fiocruz - Ba



Dr. Daniel Pereira Bezerra
Pesquisador
IGM / Fiocruz - Ba



Dr. Marcos André Vannier dos Santos
Pesquisador
IOC/ Fiocruz - RJ

*Malignant melanoma writes its message in the skin
with its own ink and it is there for all us too see.
Some see but do not comprehend.*

Neville Davis

AGRADECIMENTOS

Ao final deste trabalho, não poderia deixar de lembrar o tempo e esforços empregados durante todo este período. Foram dois anos e meio de intensa atividade física e intelectual. Agradeço, neste momento, a todos que contribuíram para a realização desta pesquisa e, de forma especial:

- Ao Dr. Marcos Vannier, meu orientador e amigo, por acreditar em mim, muitas vezes mais que eu mesma. Pelas sugestões e orientações durante o desenvolvimento da pesquisa.
- A Ana Marcia Vannier, minha amiga e irmã, pelas palavras de apoio, ainda que duras algumas vezes, mas que muito me fizeram crescer.
- A Mateus Nogueira, estudante de iniciação científica e grande parceiro de todas as horas. Dedico grande parte deste trabalho ao apoio que você me deu durante todo período desta pesquisa. Sem sua colaboração, tudo teria sido muito mais difícil de executar.
- Aos demais colegas do Laboratório de Biologia Parasitária:
 - A Aline, pelo apoio essencial no experimento *in vivo*, assim como também a Paula Schons, que deixou um pouco suas atividades diárias para me auxiliar neste experimento;
 - A Eliete, por ser sempre tão solícita ao ajudar a todos;
 - E a Jessica pelas discussões e trocas de experiências, que elucidaram muitas dúvidas.
- Um agradecimento especial a Arlene e Claudio do serviço de microscopia eletrônica, por todo auxílio prestado nessa etapa da execução do projeto.
- Aos integrantes do LETI, em especial a colega Cinara Oliveira, pela colaboração e apoio prestados em diversos momentos.
- A biblioteca da Fiocruz, em especial a Ana Maria Fiscina e a Martha Silvia Martínez Silveira pela revisão da dissertação e auxílio com as referências.

A FIOCRUZ, a FAPESB, CNPq e Capes por fornecerem os subsídios o desenvolvimento deste projeto.

ETERNA GRATIDÃO!

FONTES, Sheila Suarez. Novas abordagens sobre o potencial antitumoral de produtos naturais e semi-sintéticos em melanoma *in vitro*. 63 f. il. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, 2017.

RESUMO

INTRODUÇÃO: O câncer constitui importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo e seus números continuam a aumentar demonstrando o impacto dessa doença para saúde pública. Em relação ao melanoma, apesar de sua baixa incidência em relação as demais neoplasias de pele, sua taxa de mortalidade é elevada, considerando seu risco aumentado para o desenvolvimento de metástases. Tem-se observado significativo progresso no desenvolvimento de novas terapias para o câncer. Entretanto, problemas relacionados à toxicidade para células normais e o desenvolvimento de resistência permanecem como limitação ao sucesso dos tratamentos. Assim as terapias em combinação apresentam papel promissor devido às inúmeras vantagens como o aumento da eficácia por efeitos sinérgicos e a superação da resistência aos medicamentos em comparação com a monoterapia. **OBJETIVO:** Avaliar os efeitos da combinação de CQ:DETC e β -Lap:DETC sobre células de melanoma murino, linhagem B16F10. **METODOLOGIA:** Células B16F10 e células Vero foram utilizadas para ensaios de inibição, com diferentes concentrações dos fármacos isolados e combinados. As avaliações de sinergismo e seletividade foram realizadas através de cálculo da FIC e da razão entre a IC_{50} dos fármacos na linhagem Vero e B16F10. Para as análises em MET e MEV as células foram tratadas por 24h com a IC_{50} dos fármacos isolados e combinados. Para avaliação de morte celular e estresse oxidativo, utilizamos as sondas Anexina V, PI e DHE, respectivamente. Para avaliação da toxicidade sistêmica, tratamos camundongos C57BL/6 com os fármacos isolados e combinados e avaliamos marcadores hepáticos, renais e histopatologia. **RESULTADOS:** A ação da combinação de CQ:DETC sobre células B16F10 na proporção 1:2 resultou em ação citotóxica, com IC_{50} de 13,40 μ M:26,81 μ M, respectivamente e para a combinação β -Lap:DETC na proporção 1:20 apresentou IC_{50} 0,32 μ M:6,4 μ M, respectivamente. A ação combinada, avaliada em isoblograma, demonstrou perfil sinérgico para os efeitos de 75% de inibição para a combinação CQ:DETC e 50% e 75% de inibição para a combinação β -Lap:DETC. Esta combinação, seguindo a mesma proporção, gerou CC_{50} para a combinação CQ:DETC de 58,49 μ M:40,94 μ M, respectivamente, enquanto para a combinação β -Lap:DETC foi 0,356 μ M:6,71 μ M, respectivamente em células VERO, resultando em seletividade *in vitro*. As combinações promoveram acúmulo de espécies reativas de oxigênio sobre a forma de radicais superóxido, observados por DHE e isso resultou em morte celular por via apoptótica, preferencialmente. Esse achado foi corroborado por alterações morfológicas das células observados por microscopia eletrônica de varredura, bem como por alterações ultraestruturais verificadas por microscopia eletrônica de transmissão. A segurança dos tratamentos isolados e em combinação foi avaliada em camundongos C57BL/6, que resultou em discreta alteração nas concentrações AST e ALT para os tratamentos isolados, o que não se observou nos tratamentos em combinação. Não houve alteração nos níveis de ureia em nenhum dos tratamentos. Os tratamentos também não promoveram lesões no tecido cerebral ou cardíaco, mas foram observados danos hepáticos quando ministrados em monoterapia mas não nas combinações; e renais em ambos tratamentos. **CONCLUSÃO:** As substâncias testadas demonstraram ação citotóxica em melanoma murino *in vitro*, com baixa toxicidade sistêmica *in vivo*, o que sugere que, quando utilizados em combinação são candidatos promissores à se tornar um novo método terapêutico para o tratamento do melanoma. Contudo, mais experimentos são necessários para elucidar outros mecanismos de ação.

Palavras-chave: DETC, Beta-lapachona, Cloroquina, estresse oxidativo, autofagia, melanoma.

FONTES, Sheila Suarez. New approaches on the antitumor potential of natural and semi-synthetic products in melanoma *in vitro*. 63 f. il. Masters (Dissertation in Pathology) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, 2017.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Cancer is an important cause of morbidity and mortality worldwide and its numbers continue to increase showing the impact of this disease on public health. Regarding melanoma, despite its low incidence in relation to other skin neoplasms, its mortality rate is high, considering its increased risk for the development of metastases. Significant progress has been observed in the development of new therapies for cancer. However, problems related to toxicity to normal cells and the development of resistance remain as a limitation to the success of treatments. Thus combination therapies play a promising role because of the numerous advantages such as increased efficacy by synergistic effects and overcoming drug resistance compared to monotherapy. **OBJECTIVE:** To evaluate the effects of the combination of CQ:DETC and β -Lap:DETC on murine melanoma cells, lineage B16F10. **METHODOLOGY:** B16F10 cells and Vero cells were used for inhibition assays, with different concentrations of the drugs isolated and combined. Synergism and selectivity evaluations were performed by calculating the FIC and the ratio of the IC_{50} of the drugs in the Vero and B16F10 lineages. For the MET and MEV analyzes the cells were treated for 24 hours with the IC_{50} of the drugs isolated and combined. For evaluation of cell death and oxidative stress, we used the Annexin V, PI and DHE probes, respectively. To assess systemic toxicity, we treated C57BL/6 mice with the drugs alone and combined and evaluated hepatic, renal and histopathology markers. **RESULTS:** The action of the combination of CQ:DETC on B16F10 cells in the ratio 1:2 resulted in cytotoxic action, with IC_{50} of 13.40 μ M:26.81 μ M, respectively and for the combination β -Lap:DETC in 1:20 ratio presented IC_{50} 0.32 μ M:6.4 μ M, respectively. The combined action, evaluated in isobologram, showed synergistic profile for the effects of 75% inhibition for the CQ:DETC combination and 50% and 75% inhibition for the β -Lap:DETC combination. This combination, following the same ratio, generated CC_{50} for the CQ:DETC combination of 58.49 μ M:40.94 μ M, respectively, while for the combination β -Lap:DETC was 0.356 μ M:6.71 μ M, respectively in VERO cells, resulting *in vitro* selectivity. The combinations promoted accumulation of reactive oxygen species on the form of superoxide radicals, observed by DHE and this resulted in apoptotic cell death, preferably. This finding was corroborated by the morphological alterations of the cells observed by scanning electron microscopy, as well as by ultrastructural alterations verified by transmission electron microscopy. The safety of the isolated and combination treatments was evaluated in C57BL/6 mice, which resulted in a slight change in AST and ALT concentrations for the isolated treatments, which was not observed in the combination treatments. There was no change in urea levels in either treatment. Treatments also did not promote damage to brain or cardiac tissue, but hepatic damage was observed when given as monotherapy but not in combinations; and renal function in both treatments. **CONCLUSION:** The substances tested demonstrated cytotoxic action in murine melanoma *in vitro* with low systemic toxicity *in vivo*, suggesting that when used in combination they are promising candidates to become a novel therapeutic method for the treatment of melanoma. However, further experiments are needed to elucidate other mechanisms of action.

Key words: DETC, Beta-lapachone, Chloroquine, oxidative stress, autophagy, melanoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Avaliação do efeito inibitório do DETC (A), da CQ (B) e da β -Lap (C) sobre células B16F10.	30
Figura 2	Avaliação da toxicidade <i>in vitro</i> das substâncias combinadas sobre B16F10	31
Figura 3	Avaliação do efeito inibitório do DETC (A), da CQ (B) e da β -Lap (C) sobre células Vero	32
Figura 4	Avaliação da toxicidade das substâncias combinadas sobre B16F10	33
Figura 5	Isobolograma representativo das interações <i>in vitro</i> da combinação de CQ:DETC e β -Lap:DETC em células B16F10	34
Figura 6	Efeitos do tratamento com DETC na morfologia de células B16F10 avaliadas por MEV	36
Figura 7	Efeitos do tratamento com CQ e β -Lap na morfologia de células B16F10 avaliadas por MEV	37
Figura 8	Efeitos do tratamento com as combinações CQ:DETC e β -Lap:DETC na morfologia de células B16F10 avaliadas por MEV	38
Figura 9	Microscopia eletrônica de transmissão de células B16F10 antes e após incubação com DETC	39
Figura 10	Microscopia eletrônica de transmissão células B16F10 após tratamento com CQ e β -Lap	40
Figura 11	Alterações ultraestruturais em células B16F10 após tratamento com as combinações de CQ:DETC e β -Lap:DETC avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão	41
Figura 12	Avaliação da exposição de fosfatidilserina e descontinuidade da membrana plasmática em células B16F10 após o tratamento com CQ, β -Lap, DETC e suas combinações	42

Figura 13	Quantificação de fluorescência por sonda DHE após o tratamento de células B16F10 com CQ, β -Lap.	43
Figura 14	Efeito dos tratamentos ministrados de forma isolada e combinada obtidas pelas médias de sangue total de camundongos de linhagem C57Bl/6	44
Figura 15	Fotomicrografias do cérebro de camundongos linhagem C57Bl/6	45
Figura 16	Fotomicrografias do coração de camundongos linhagem C57Bl/6	47
Figura 17	Fotomicrografias do fígado de camundongos linhagem C57Bl/6	48
Figura 18	Fotomicrografias do coração de camundongos linhagem C57Bl/6	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição do tratamento nos grupos experimentais <i>in vivo</i>	28
Tabela 2	Concentrações inibitórias das substâncias isoladas e combinadas	34
Tabela 3	Índices de seletividade das substâncias isoladas e combinadas	35

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina Trifosfato
β-Lap	β-Lapachona
C57BL/6	Linhagem <i>inbred</i> de camundongos
CC ₅₀	Concentração citotóxica
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CO ₂	Dióxido de carbono
CQ	Cloroquina
Cu ²⁺	Cobre
DETC	Dietilditiocarbamato de sódio, do inglês ‘sodium diethyldithiocarbamate’
DHE	Dihidroetidio, do inglês ‘dihydroethidium’
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOX	Cloridrato de doxorubicina, do inglês ‘doxorubicin hydrochloride’
DSS	Disulfiram
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FIC	Concentração inibitória fracionada
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
h	Hora
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H&E	Hematoxilina e eosina
IC ₅₀	Concentração Inibitória de 50%
INCA	Instituto Nacional de Câncer
i.p.	Intraperitoneal
IS	Índice de seletividade
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
nm	Nanometro
NQO1	Quinona oxireductase
O ₂ ^{•-}	Radical superóxido
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
pH	Potencial de hidrogênio
PI	Iodeto de propídio
TPA/PMA	12- <i>O</i> -tetradecanoilforbol-13-acetato, também conhecido como 13-acetato de forbol-12-miristato
RE	Retículo endoplasmático
SBF	Soro Bovino Fetal
SOD	Superóxido dismutase
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	PAPEL DO ESTRESSE OXIDATIVO EM MELANOMA	17
2.2	AUTOFAGIA EM MELANOMA	20
3	OBJETIVOS	22
3.1	GERAL.....	22
3.2	ESPECÍFICOS	22
4	METODOLOGIA	23
4.1	CULTURA DE CÉLULAS B16F10 E CÉLULAS VERO.....	23
4.2	ENSAIOS DE INIBIÇÃO E CITOTOXICIDADE.....	23
4.3	TESTE COLORIMÉTRICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E APLICAÇÃO EM BIOENSAIOS	24
4.4	AVALIAÇÃO DE SINERGISMO DA COMBINAÇÃO	24
4.5	ÍNDICE DE SELETIVIDADE.....	24
4.6	MICROSCOPIA ELETRÔNICA (ME)	25
4.6.1	<i>MEV</i>	25
4.6.2	<i>MET</i>	25
4.7	MARCADORES DE MORTE CELULAR.....	25
4.8	MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO	26
4.9	TOXICIDADE SISTÊMICA	26
4.10	HISTOPATOLOGIA	28
4.11	ANÁLISES BIOQUÍMICAS DO SANGUE TOTAL.....	28
4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
5	RESULTADOS	29
5.1	DETERMINAÇÃO DAS IC ₅₀ DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS EM CÉLULAS B16F10	29
5.2	A COMBINAÇÃO POTENCIALIZA O EFEITO CITOTÓXICO DAS SUBSTÂNCIAS SOBRE CÉLULAS B16-F10.....	30
5.3	EFEITO CITOTÓXICO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS SOBRE CÉLULAS VERO	30
5.4	EFEITO CITOTÓXICO DAS SUBSTÂNCIAS COMBINADAS SOBRE CÉLULAS VERO	32

5.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DAS COMBINAÇÕES CQ:DETC E B-LAP:DETC EM CÉLULAS B16F10.....	33
5.6	ÍNDICES DE SELETIVIDADE	34
5.7	ALTERAÇÃO ESTRUTURAL EM MEV APÓS TRATAMENTO COM AS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS E COMBINADAS	35
5.6	ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS EM MET APÓS TRATAMENTO COM AS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS E COMBINADAS	38
5.8	AVALIAÇÃO DA MORTE EM CÉLULAS B16F10 TRATADAS COM AS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS E EM COMBINAÇÃO	41
5.9	OS TRATAMENTOS AUMENTARAM A PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	42
5.10	ANÁLISES BIOQUÍMICAS	43
5.11	HISTOPATOLOGIA	44
6	DISCUSSÃO	48
7	CONCLUSÕES	56
	REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

O câncer constitui a segunda maior causa de morte em países ocidentais, sendo considerado uma doença que provoca mais óbitos anualmente que a soma daquelas provocadas em guerras como Vietnã, Coreia e as Grandes Guerras Mundiais (RUDDON, 2007). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, 8,8 milhões de pessoas morreram de câncer no mundo em 2015. Isso corresponde a uma em cada seis das mortes globais, com um custo estimado de US \$ 1,16 trilhão por ano (OMS, 2016).

Dentre os diferentes tipos de câncer, um dos que apresenta maior taxa de letalidade é o melanoma, um tumor melanocítico, cuja incidência e mortalidade vêm se elevando em todo o mundo. Nas últimas duas décadas, observou-se um aumento na incidência do melanoma na população caucasiana, enquanto as taxas de mortalidade global permaneceram estáveis. Tem-se verificado uma incidência maior na faixa etária entre os 40 e 60 anos, porém as lesões podem ser observadas em qualquer idade, sendo muito raro em crianças, no entanto as mortes geralmente ocorrem mais precocemente que a observada em outras malignidades. Geralmente, verifica-se que a sobrevida média é de 8 (oito) a 18 (dezoito) meses. O prognóstico dos pacientes depende do estágio do tumor a época do diagnóstico, se metastático, torna-se mais grave (FINN; MARKOVIC; JOSEPH, 2012; HAN et al., 2017).

A incidência global do melanoma cutâneo é de 132.000 casos por ano (OMS, 2016). No Brasil, para 2017 são esperados 80.850 casos novos de câncer de pele não melanoma nos homens e 94.910 nas mulheres no Brasil. Quanto ao melanoma, apesar da sua baixa incidência, sua letalidade é alta, e vem aumentando o número de casos. Segundo o INCA estima-se, aproximadamente 5.670 casos novos/ano sendo 3.000 homens e 2.670 mulheres para o ano de 2017 com melanoma cutâneo no Brasil (INCA, 2016). De acordo com a última atualização do Datasus, em 2014 foram confirmados 1.609 óbitos, sendo 916 homens e 693 mulheres (DATASUS, 2014).

O melanoma maligno, embora muito menos prevalente do que o câncer de pele não melanoma, constitui a principal causa de morte entre as neoplasias cutâneas. Desde o início dos anos 1970, a incidência de melanoma maligno tem aumentado significativamente. Estima-se que represente cerca de 4% da incidência das neoplasias dérmicas, sendo responsável por 75%

de todos os óbitos ocasionados por estas, devido à alta possibilidade de metástases (INCA, 2016).

Durante o desenvolvimento embrionário, os melanócitos, que são originados de progenitores na crista neural, migram para a pele e ao chegar ao seu destino, produzem melanina, um pigmento peptídico encontrado em grânulos denominados melanosomos, que são transferidos por emissão de processos de superfície, do tipo filopódios, levando esses grânulos para queratinócitos nas imediações destes, internalizando parte dos prolongamentos e direcionam os grânulos para a região perinuclear, onde, efetivamente, poderão proteger a cromatina dos danos ocasionados por diferentes radiações. O melanócito na pele é alvo de uma variedade de sinais emitidos por seu microambiente (HEARING; LEONG, 2006). Neste cenário, os queratinócitos desempenham um papel relevante, pois expressam e secretam fatores parácrinos específicos que atuam modulando a fisiologia do melanócito (HAMBRIGHT; GHOSH, 2017).

O precursor normal do melanoma é o melanócito, que pode se acumular anormalmente formando os nevos, encontrados no estrato inferior do epitélio logo acima do nível da derme, e ocasionalmente na derme (HEARING; LEONG, 2006; HAMBRIGHT; GHOSH, 2017). É da mutação e transformação destes melanócitos que são derivadas as células de melanoma. Aproximadamente 95% das vezes, o melanoma pode ser rastreado a partir de um nevo, mas nos outros 5%, não é possível determinar o local de origem quando o melanoma se apresenta metastático (ARMSTRONG, 2011).

Pode se desenvolver em qualquer área da pele e, ocasionalmente, mucosas, leptomeninges e globo ocular (ARMSTRONG, 2011; HAMBRIGHT; GHOSH, 2017). É uma doença clinicamente heterogênea que apresenta uma variedade de fenótipos com diferentes capacidades de migrar para locais distantes da pele, como gânglios linfáticos, órgãos viscerais, por induzir resposta angiogênica do hospedeiro e para resistência a medicamentos específicos e/ou imunomoduladores. Esta heterogeneidade clínica reflete a variedade molecular, que determina a resposta dos pacientes às terapias e a sobrevivência (BORDEN, ERNEST C., 2002).

Estudos indicam que os fatores de risco para melanoma maligno correlacionam-se com as características genéticas e pessoais, e com o comportamento à exposição aos raios UV (OMS, 2017). Na ativação por UV, os queratinócitos expressam e secretam uma série de fatores agindo

sinérgicamente para um grupo de melanócitos, funcionando assim como mitógenos. Uma vez que a estimulação UV desencadeia a diferenciação terminal dos melanócitos, faz-se necessário determinar os mecanismos que regulam a diferenciação terminal destes na pele, os quais podem deflagar o início do ciclo celular e proliferar. Uma explicação para a resposta mitogênica dos melanócitos baseia-se na ideia de que existe um reservatório de melanócitos precursores na pele (BORDEN, E.C., 2002; HEARING; LEONG, 2006; ARMSTRONG, 2011).

Para o melanoma, quando detectado em fase inicial, o tratamento através de excisão cirúrgica adequada e terapia adjuvante com IFN- α -2b, geralmente permite a cura. Com isso, a taxa de sobrevivência costuma elevar-se por 5 anos. Para os pacientes em estágios avançados, que não são candidatos à cirurgia, um agente alquilante, a dacarbazina é o principal tratamento, no entanto, além dos efeitos colaterais graves, a taxa de resposta terapêutica fica em torno de 10 a 36% com sobrevida de 1 ano, e os pacientes têm apresentado resistência à essa terapia (HAO et al., 2015).

Fármacos inibidores de BRAF, como o vemurafenib tem demonstrado benefício clínico significativo em pacientes com melanoma que apresentam mutação neste gene. Porém muitos pacientes têm apresentado tumores com resistência e, portanto, refratários a estes tratamentos. A maioria dos doentes que respondem inicialmente, adquire resistência à droga e apresentam recidivas em 6 a 12 meses (YADAV et al., 2015).

Apesar de se observar significativo progresso no desenvolvimento de novas terapias para o tratamento do câncer, problemas relacionados à administração de medicamentos como toxicidade para células normais e o desenvolvimento de resistência permanecem como limitação ao sucesso dos tratamentos. Um tratamento antineoplásico ideal deve atingir seletivamente células tumorais, com efeitos colaterais limitados em células normais e baixa resistência aos medicamentos (ISHAQ et al., 2014).

Então, verifica-se que a terapia citotóxica administrada em pacientes com melanoma metastático, quando utilizada de maneira isolada, apresenta baixa taxa de resposta e curta duração. Assim, um estudo realizado por Hao et al. (2015), sugere que terapias combinadas, que apresentem diferentes mecanismos de ação, devam produzir efeito supressor sinérgico, melhorando a eficácia dos tratamentos, apresentando melhores resultados e aumentando a taxa de sobrevida.

Portanto, a falta de terapias que promovam a cura para o melanoma metastático, a baixa atividade antitumoral das quimioterapias e agentes biológicos disponíveis até o momento, assim como a resistência frequentemente apresentada pelos pacientes, tem levado muitos pesquisadores a explorar várias combinações de substâncias (BORDEN, ERNEST, 2002; HEARING; LEONG, 2006). Nesse sentido, os produtos naturais são uma fonte inesgotável para descoberta de novos compostos e são reconhecidos pela indústria farmacêutica por sua notável diversidade estrutural e ampla gama de propriedades. A conscientização crescente do potencial destes compostos pode levar ao desenvolvimento de novos fármacos (DE CASTRO; EMERY; DA SILVA JUNIOR, 2013).

Nesse contexto, a terapia combinada contra o câncer possui um papel bastante promissor devido às inúmeras vantagens que pode apresentar, como o aumento da eficácia por efeitos sinérgicos e a superação da resistência aos medicamentos em comparação com a monoterapia (GAJEWSKI; HODI, 2010). Seguindo neste princípio, combinamos compostos já em uso para outras doenças, assim como para o câncer, como o dietilditiocarbamato de sódio (DETC) (YANG et al., 2015), a cloroquina (AGOSTINELLI et al., 2014) e a β -lapachona (BANG et al., 2016).

Amplamente conhecida por suas atividades antimaláricas, a cloroquina (CQ) vem sendo empregada no tratamento de diferentes agravos, incluindo neoplasias (SOLOMON; LEE, 2009). Compostos quinolínicos podem exercer ação antitumoral de forma dependente (AMARAVADI et al., 2007) ou independente de autofagia (MAYCOTTE et al., 2012; MAES et al., 2014), podendo levar a célula cancerosa à morte por apoptose.

A CQ, uma amina terciária, é uma base fraca que se acumula em organelas ácidas, como endossomas e lisossomas, onde afeta a fusão e perturba a degradação por alcalinização desses compartimentos, comprometendo o autofagossoma. O uso da CQ tanto isolada quanto em combinação com outros quimioterápicos, tem sido demonstrada por ser potencialmente útil no tratamento do câncer (CHOI et al., 2016).

Grande parte dos fármacos considerados de base pela OMS (2016) são produtos naturais ou derivados/análogos destes. Diferentes derivados de naftoquinonas, incluindo as lapachonas, têm demonstrado atividade contra *T. cruzi* (DOS ANJOS et al., 2016), *Leishmania* spp. (DE CASTRO; EMERY; DA SILVA JUNIOR, 2013) e células cancerosas (ZHOU et al., 2016). Dentro desse contexto, a β -lapachona (β -Lap), uma naftoquinona isolada a partir da casca do

ipê roxo (*Tabebuia avellanedae* Lor, Bignoniaceae) (CASTRO; EMERY; DA SILVA JUNIOR, 2013; BERMEJO et al., 2016), mostrou ser altamente eficaz no tratamento de vários tipos de câncer em modelos experimentais, incluindo câncer de fígado e melanoma (LI et al., 2014; BANG et al., 2016).

Embora a β -Lap seja um agente anticancerígeno promissor, seu mecanismo de ação ainda não está completamente elucidado. A teoria principal sustenta que β -Lap reage com a enzima celular NAD(P)H: quinona oxidoreductase 1 (NQO1), que é sobre-expressa em muitos cânceres, levando à ciclagem entre suas formas de quinona e hidroquinona, consumindo NADPH e gerando ERO. Sugere-se que o esgotamento NADPH pode desencadear a apoptose de células cancerígenas (LI et al., 2014).

O disulfiram (DSS), um fármaco que encontra-se em uso clínico há décadas para o tratamento do etilismo por inibição irreversível da enzima aldeído desidrogenase, tem demonstrado possuir atividade anticancerígena (CHIBA et al., 2014; BEGIC et al., 2017). O DSS, amplamente conhecido sob os nomes comerciais, Antabuse[®] e Antietanol[®], é um dissulfeto simétrico que pode ser reduzido a duas moléculas de tioconjugado que, em pH fisiológico, é ionizado para DETC. A redução do DSS em DETC ocorre prontamente *in vivo* (GESSNER; GESSNER, 2012). Estudos recentes sobre DSS demonstraram que seu metabolito, o DETC, tem papel antitumoral com importante efeito terapêutico, em uma ampla gama de tumores, como glioblastoma e câncer de mama (CHIBA et al., 2014).

O DETC tem perfil de segurança bem estabelecido e apresenta uma propriedade muito relevante pois, é capaz de reverter o fenótipo de resistência, inibindo a atividade de P-glicoproteínas (Pgp), (SAUNA; SHUKLA; AMBUDKAR, 2005; FISHER; SWAAN; EDDINGTON, 2010), que é responsável pela extrusão de drogas no fenótipo MDR (múltipla resistência a drogas). O DETC exerce efeito inibitório sobre Pgp (LOO; BARTLETT; CLARKE, 2004), interagindo com duas cisteínas localizadas no sítio ligante de ATP da proteína. Quando os sítios de ATP estão acessíveis, o DETC interage com as cisteínas inibindo assim, a hidrólise do ATP e inativando a proteína. Por tal propriedade DETC pode ser usado em combinações para o tratamento de câncer (SAUNA; SHUKLA; AMBUDKAR, 2005), entre outras entidades nosológicas.

Estima-se que o desenvolvimento de um único medicamento contra o câncer leva uma média de 15 anos além do custo muito elevado. Uma abordagem para superar esse problema

pode ser o desenvolvimento de novo uso para fármacos já existentes, conforme afirmado por James Black, farmacêutico de renome e prêmio Nobel, que disse: "A base mais proveitosa para a descoberta de uma nova droga é começar com uma antiga droga" (SOLOMON; LEE, 2009).

Devido à elevada resistência a medicamentos padrão, tais como nitrosoureas (carmustinas), alcaloides da *Vinca* (vimblastina, vincristina), fármacos platina-associados e antibióticos antraciclina, como a doxorubicina (DOX) (AGOSTINELLI et al., 2014), encontra-se a relevância de se estender os estudos em quimioterapia para o melanoma, uma vez que o tratamento antineoplásico, além de alta toxicidade, apresenta essas limitações associadas aos casos de resistência tanto intrínseca como adquirida, justificando-se assim a necessidade do desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas na tentativa de diminuir a letalidade desta neoplasia (WELSH et al., 2004; COLETTA et al., 2008; SELIMOVIC et al., 2013).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PAPEL DO ESTRESSE OXIDATIVO EM MELANOMA

As células de melanoma, são propensas ao desequilíbrio redox, onde o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) é atribuível ao desacoplamento mitocondrial. Como os melanócitos absorvem luminosidade UV, gerando resposta inflamatória nos queratinócitos isso promove alto estado pró-oxidante para os melanócitos (HAMBRIGHT; GHOSH, 2017). Nesse sentido, a melanina *per se*, pode atuar como antioxidante ou pró-oxidante a depender do seu estado redox. Assim, os melanossomos são modificados e mais pró-oxidantes nas células de melanoma (FRUEHAUF; TRAPP, 2008).

Otto Warburg descreveu na década de 20 um efeito, denominado em sua homenagem, no qual células tumorais tendem a produzir trifosfato de adenosina (ATP) pela via glicolítica ou glicólise aeróbica ao invés de realizar fosforilação oxidativa, devido à disfunção mitocondrial. Esse processo, tornou-se um princípio básico do metabolismo energético para células tumorais (FU et al., 2017).

O sistema de defesa antioxidante que mantém a homeostase redox em melanócitos, é muito peculiar. No entanto, pode ocorrer desequilíbrio de ERO e prejuízos ao sistema antioxidante, resultando em estresse oxidativo. Então, a elevação de ERO e a atividade antioxidante prejudicada resultam, além de estresse oxidativo, a melanogênese. Assim,

denominou-se o melanoma, com um conceito bastante apropriado de "tumor dirigido por ERO" (HAMBRIGHT; GHOSH, 2017).

Estudos pré-clínicos demonstraram que as células de melanoma são particularmente suscetíveis ao aumento de ERO em comparação com melanócitos. Essa sensibilidade redox observada, é provavelmente atribuída a elevada capacidade antioxidante em melanócitos, que neutraliza de maneira eficaz o estresse oxidativo em comparação com células de melanoma, detectando níveis cronicamente elevados de ERO (HAMBRIGHT; GHOSH, 2017).

Nesse contexto, a β -Lap demonstrou ser um agente citostático eficaz para uma variedade de células tumorais, que são tipicamente mais susceptíveis ao dano oxidativo, como o melanoma. β -Lap sofre ciclos redox levando a níveis aumentados de ERO catalisados por NADPH:quinona oxidoreductase 1 (NQO1), uma enzima redox especificamente sobre-expressa em alguns tipos de tumores sólidos (BERMEJO et al., 2016).

Uma vez que a β -Lap medeia a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), as células-alvo sofrem considerável estresse oxidativo. O estresse oxidativo em células tumorais pode constituir uma estratégia seletiva de intervenção farmacológica, pois além de apresentar níveis mais altos de ERO (KAWANISHI et al., 2006), as células neoplásicas geralmente apresentam disfunção de mecanismos de defesas antioxidantes (TRUEBA; SANCHEZ; GIULIANI, 2004). A produção de ERO, simultaneamente, modula e é modulada pelo processo autofágico, de forma complexa, em diferentes etapas deste (KONGARA; KARANTZA, 2012).

O ciclo redox das quinonas pode ser iniciado através da redução de um ou dois elétrons. O mecanismo de citotoxicidade da quinona envolve a estimulação de estresse oxidativo e/ou alquilação de biomoléculas. Essas ERO podem reagir diretamente com o DNA, lipídios e proteínas, levando a danos celulares e shunting de elétrons para o oxigênio. O dano celular também ocorre através da alquilação de proteínas e ácidos nucleicos (CASTRO; EMERY; SILVA JUNIOR, 2013).

Como as ERO aumentam o estresse oxidativo, as células neoplásicas tendem a neutralizá-lo utilizando sistemas antioxidantes endógenos. Dentro desses agentes antioxidantes, encontra-se a glutathiona, o ácido ascórbico e enzimas tais como superperóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase e catalase. Caso não consiga equilibrar, esse estresse oxidativo, tende a ativar a morte celular utilizando diferentes vias de execução, sendo a apoptose ou a

necrose. Níveis elevados de estresse oxidativo estão associados a necrose enquanto os mais baixos, promovem a apoptose (SALIDO; ROSADO, 2009).

Os níveis de glutathione influenciam as vias de síntese da melanina, e seu metabolismo protege os melanócitos dos efeitos tóxicos de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) formados durante essa síntese e, portanto, a glutathione parece ser extremamente importante para a manutenção de viabilidade celular tanto de melanócitos quanto do melanoma (MEYSKENS; FARMER; FRUEHAUF, 2001). Um dos mecanismos de ação descritos na literatura sobre o DETC, é que o mesmo atua inibindo o sistema anti-oxidante celular, especialmente a atividade SOD e a glutathione (CEN et al., 2004), sendo assim, a interrupção do metabolismo destas enzimas deve afetar, negativamente, a viabilidade celular do melanoma e aumentar a resposta a terapia anti-neoplásica.

O caráter nucleofílico do DETC permite formar um complexo lipofílico estável com metais (BEGIC et al., 2017), aumentando a citotoxicidade em células de melanoma, câncer de mama e de cólon (XU et al., 2011). Isso permite que o DETC apresente efeitos antitumorais bastante versáteis, como por exemplo, quelar íons metálicos, bloquear a atividade de enzimas dependentes de zinco ou cobre, tais como SOD e metaloproteinasas, inibir a atividade do sistema proteossoma, levando ao impedimento da angiogênese tumoral e impedindo a invasão de células tumorais e metástases (JIAO et al., 2017).

Assim, níveis cronicamente elevados de ERO em células tumorais promovem instabilidade genômica e proliferação descontrolada. O conceito limiar de ERO como um alvo terapêutico emergiu como uma estratégia viável antitumoral, que utiliza seletivamente a vulnerabilidade das células cancerosas à interrupção da homeostase redox e resulta seletivamente em apoptose de células de melanoma (HAMBRIGHT; GHOSH, 2017).

Como as células de melanoma apresentam diminuição da capacidade de gerenciamento desse estresse oxidativo em comparação com melanócitos e também apresentam melanossomas estruturalmente anormais que geram radicais livres, agentes conhecidos que aumentem o estresse oxidativo podem justificar uma investigação terapêutica seletiva para o melanoma (MORRISON et al., 2010). Dessa forma, quimioterapias que visam à indução de ERO vêm recebendo grande destaque no meio científico.

2.2 AUTOFAGIA EM MELANOMA

A autofagia consiste em uma resposta adaptativa muito importante para a manutenção do conteúdo intracelular, que ocorre através da degradação ativa de seus próprios componentes, fornecendo nutrição e energia, garantindo o crescimento e a sobrevivência em condições de estresse metabólico. Este processo catabólico desempenha papel especialmente importante no desenvolvimento do melanoma (MARTIN; DUDEK-PERIC; GARG, 2017), por fornecer energia para células tumorais, que podem sobreviver em um ambiente desfavorável para células normais (KIMURA et al., 2013).

Em relação à atividade autofágica, os melanomas comparados aos melanócitos, apresentam aumento dessa atividade, que auxiliam a sobrevivência das células tumorais através de sinalização proliferativa, evasão de apoptose e resistência à quimioterapia (LUO et al., 2011). Assim a autofagia proporciona condições de sobrevivência para estas células, exercendo um papel fundamental na progressão do câncer

Estudos demonstram que células tumorais sob estresse terapêutico, utilizam a autofagia, para sobreviver aos tratamentos, bloqueando a apoptose (DIVAC RANKOV et al., 2017). Então a atividade autofágica aumenta quando as células são expostas a substâncias que promovem estresse oxidativo. Sendo um evento comum em células tumorais, atuando como um mecanismo de proteção nestas células, pode se observar que a morte celular induzida pelos tratamentos antineoplásicos pode ser melhorada após a inibição da autofagia (ZHOU et al., 2017).

Nesse contexto, o uso da CQ pode ser de grande relevância, uma vez que, dentro dos seus mecanismos de ação, ela apresenta efeito pleiotrópico, incluindo a inibição da autofagia por bloqueio da fusão do autofagossoma com o lisossoma, desestabilização lisossomal letal e a normalização da vasculatura tumoral (BURIKHANOV et al., 2017). Este efeito de normalização do vaso promovido pela CQ, reduz a hipóxia tumoral, invasão de células cancerígenas e metástases, melhorando a resposta à quimioterapia (MAES et al., 2014).

Como a CQ bloqueia o último estágio da autofagia, impedindo a degradação do fagolisossoma, por protonar essa organela, levando a diminuição da acidez inibindo a sua atividade, isso resulta na falta de energia para as células tumorais, sensibilizando-as assim, através da inibição desta atividade (KIMURA et al., 2013).

Já que as células tumorais estão permanentemente expostas a condições de estresse, seja por hipóxia ou por falta de nutrientes, as alterações na forma como as células respondem a esse estresse metabólico foi proposto como fator-chave na tumorigênese. Conforme visto no ‘efeito Warburg’ no qual o metabolismo tumoral, nestas condições, depende totalmente do metabolismo anaeróbio através da glicólise ao invés da fosforilação oxidativa, a inibição da autofagia pode levar as células tumorais a apoptose limitando a progressão do tumor (JANKU et al., 2011).

A apoptose em células de mamífero, pode ser deflagrada por duas vias: a via mitocondrial intrínseca que é ativada em resposta ao estresse celular, e a via do receptor de morte extrínseca, que é ativada na superfície celular pela ligação do fator de necrose tumoral aos seus receptores de morte (TNFR1, Fas/CD95, DR4/5) (ISHAQ et al., 2014). Assim, sob estresse oxidativo e via autofágica impedida, as células de melanoma podem deflagrar a apoptose pela via intrínseca.

O reconhecimento do papel citoprotetivo inerente a autofagia em condições do estresse celular demonstrou que o bloqueio da autofagia em células cancerígenas pode reduzir a resistência à quimioterapia, melhorando assim o resultado da terapia (MAES et al., 2016). Sendo assim, a CQ desempenha um importante papel neste cenário e por apresentar perfil de segurança aceitável e eficácia reconhecida no tratamento da malária, poderia estar prontamente disponível para uso clínico uma vez que seu efeito antitumoral seja melhor compreendido.

Estudar a autofagia em células cancerosas revela-se relevante em muitos modelos (HAYAT, 2014), uma vez que a autofagia está relacionada à biogênese tumoral (QIAO et al., 2013), e como essa via é mais ativa em células mais susceptíveis a estresse oxidativo, pode expressar seletividade no câncer (ICHIMURA et al., 2013), bem como constituir promissora estratégia terapêutica (YONEKAWA; THORBURN, 2013).

Portanto, as ERO desencadeadas por diversas condições de estresse, foram consideradas como mediadores da autofagia e da apoptose (HU; SHI; WANG, 2017). Assim, tanto a sinalização redox como a autofagia têm se tornado alvos terapêuticos interessantes na tentativa de levar a senescência células de melanoma (HAMBRIGHT; GHOSH, 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar os efeitos da combinação de CQ:DETC e β -Lap:DETC sobre células de melanoma murino.

3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a citotoxicidade das combinações, determinando possíveis efeitos aditivos ou sinérgicos;
- Avaliar a citotoxicidade das combinações sobre células não tumorais de mamíferos e verificar a seletividade do tratamento;
- Analisar alterações ultraestruturais nas células B16F10 geradas pelos tratamentos;
- Determinar os mecanismos de morte celular induzido pelos tratamentos;
- Mensurar o estresse oxidativo através detecção de espécies reativas de oxigênio;
- Verificar a toxicidade sistêmica da ação combinada das substâncias *in vivo*.

4 METODOLOGIA

4.1 CULTURA DE CÉLULAS B16F10 E CÉLULAS VERO

As células de melanoma murino da linhagem B16F10 usadas neste estudo foram cedidas pelo Laboratório de Inflamação, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro IBCCF – UFRJ e células da linhagem Vero cedidas pela Universidade Federal da Bahia – UFBA foram mantidas em meio RPMI 1640 contendo 10% de SBF, 100µg/mL de Estreptomicina e 100 U/mL de Penicilina, à 37 °C e atmosfera a 5% de CO₂ e trispsinizadas quando atingiam confluência para manutenção constante ou quando utilizadas em experimentos.

4.2 ENSAIOS DE INIBIÇÃO E CITOTOXICIDADE

Os testes de inibição e citotoxicidade foram realizados em placas de 96 poços e as células foram incubadas na concentração de 1×10^5 /poço, por 24h para promover a aderência. Após esse período, as células foram lavadas com PBS e incubadas com diferentes concentrações das substâncias isoladas e em combinação, por 24h a 37 °C e 5% de CO₂. A leitura da viabilidade celular foi realizada seguindo o teste colorimétrico descrito no tópico 4.3 da metodologia.

O percentual de inibição gerado por cada concentração dos tratamentos foi obtido comparando-o com o controle negativo. As concentrações inibitórias (IC), em B16F10, e citotóxica (CC), em Vero, para diferentes impactos na proliferação celular foram determinadas através de uma regressão não linear utilizando o percentual do efeito inibitório em relação ao Log₁₀ da concentração para este efeito. Utilizou-se o software GraphPad Prism, versão 5.0, para tratamento dos resultados e criação das curvas concentração-efeito.

Utilizamos a DOX como controle positivo, empregando a menor concentração para a inibição de 100% das células. Para isso, foram realizados testes prévios com cinco concentrações da DOX tanto em células B16F10, quanto em células Vero. Assim a concentração selecionada foi incorporada em triplicata, em cada experimento para comparação dos tratamentos. Para controle negativo foi utilizado dimetilsulfóxido (DMSO).

4.3 TESTE COLORIMÉTRICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E APLICAÇÃO EM BIOENSAIOS

Para o teste colorimétrico foi avaliada a relação entre o número de células e a absorbância, onde as células incubadas após o tratamento foram processadas seguindo o método descrito por Ishai-Michaeli e colaboradores (1990). Após o tratamento as células foram fixadas com metanol para análise por 15 minutos e, em seguida, adicionado o corante azul de metileno 0,1% diluído em tampão borato pH 8,7. Após 10 minutos foram realizadas três lavagens com tampão borato para retirar o excesso de azul de metileno, e finalizadas com adição de 100 µL ácido clorídrico a 0,1M e em seguida foi realizada a leitura em VersaMax™ Tunable Microplate Reader no comprimento de onda de 655 nm.

4.4 AVALIAÇÃO DE SINERGISMO DA COMBINAÇÃO

Após os ensaios de inibição da proliferação celular e a determinação das concentrações inibitórias, a concentração inibitória fracionada (FIC) para um determinado efeito foi calculada seguindo a fórmula:

$$\text{Concentração Inibitória Fracionada (y)} = \frac{\text{CI(y) do composto na combinação}}{\text{CI(y) do composto isolado}}$$

Em que o (y) foram os efeitos de 25%, 50% e 75% de inibição resultando na FIC₂₅, FIC₅₀ e FIC₇₅.

Utilizando as coordenadas formadas pelas FIC (CQ:DETC) e da FIC (β-Lap:DETC) dos efeitos de 25%, 50% e 75% foram construídos os isobogramas. A linha de referência para a aditividade liga o número 1 nos dois eixos. Pontos que se encontrarem abaixo desta linha tendem a expressar resultados sinérgicos da combinação e pontos acima da linha sugerem antagonismo (CHOU, 2006).

4.5 ÍNDICE DE SELETIVIDADE

Após a determinação da IC₅₀ e da CC₅₀ dos compostos isolados e da combinação, o índice de seletividade foi determinado com a seguinte fórmula:

$$\text{Índice de Seletividade} = \frac{\text{CC}_{50}}{\text{IC}_{50}}$$

4.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA (ME)

4.6.1 MEV

As células B16F10 foram incubadas com inoculo de 2×10^5 , em placa de 24 poços com lamínulas redondas no fundo de cada poço para adesão das células. Após 24h, foram tratadas com a IC₅₀ da CQ, do DETC, da β -Lap e das combinações nas mesmas condições em que estas foram determinadas. As amostras foram fixadas nos períodos de 3, 6, 12 e 24h após a incubação com as substâncias isoladas e com as combinações. A fixação foi realizada com glutaraldeído a 2,5%, paraformaldeído 4% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2, em seguida as amostras foram lavadas em tampão cacodilato 0,1 M. Então, as células foram pós-fixadas com solução de tetróxido de ósmio 1%, contendo 0,8% de ferrocianeto de potássio. Posteriormente desidratadas em concentrações crescentes de etanol (30-100%) por 10 minutos em cada concentração. As amostras foram processadas e secas em sistema de ponto crítico de CO₂, montadas em suportes metálicos, revestidas com ouro e observadas ao microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 6390LV a 15 kV.

4.6.2 MET

As células B16F10 foram incubadas em placa de 24 poços com a IC₅₀ da CQ, do DETC, da β -Lap e das combinações nas mesmas condições em que estas foram determinadas. As amostras foram fixadas nos períodos de 3, 6, 12 e 24h após a incubação com as substâncias isoladas e com as combinações. A fixação foi realizada com glutaraldeído a 2,5%, paraformaldeído 4% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2, em seguida as amostras foram lavadas em tampão cacodilato 0,1 M, pós-fixadas com tetróxido de ósmio 2% e ferricianeto 0,8%, e desidratadas com séries crescentes de acetona. As células foram então incluídas em resina Polybed, cortadas em ultramicrótomo, contrastadas com tetróxido de ósmio e analisadas em microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1230.

4.7 MARCADORES DE MORTE CELULAR

Para avaliação da morte celular por apoptose e/ou necrose, as células B1F10 foram incubadas em placas de 6 poços (4×10^6 /mL) com a IC₅₀ das substâncias isoladas e da combinação por 24h. Após este período a anexinaV-FITC e o iodeto de propídio (PI) foram utilizados para detecção da exposição de fosfatidilserina na parte externa da membrana plasmática e descontinuidade da mesma respectivamente.

O controle positivo se deu pela exposição prévia das células por 30 min sob luz UV para apoptose e Triton X100 a 01% por 10 min para indução de necrose. O DMSO foi usado como controle negativo.

Para este ensaio foi utilizado a Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Sigma) seguindo as recomendações do fabricante. As células foram analisadas em citômetro BD LRSFortessa™ com excitação/emissão de 488/530nm para a anexinaV-FITC e 532/575nm para o PI.

Os resultados foram obtidos através do software BD FACSDiva (BD Biosciences). Os *debris* celulares foram omitidos e dez mil eventos foram avaliados por amostra.

4.8 MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

A detecção intracelular da produção de ERO foi obtida através da utilização da sonda fluorescente DHE. Em virtude da sua capacidade de permear livremente as membranas celulares, é amplamente utilizada para monitorar a produção de superóxido ($O_2^{\cdot-}$). O DHE, após a reação com ânions $O_2^{\cdot-}$, forma um produto fluorescente vermelho (etídio) que intercala com o DNA. É um corante muito específico, uma vez que detecta essencialmente radical $O_2^{\cdot-}$, sendo bem retido pelas células e pode tolerar até fixação mais suave.

A cultura foi realizada em placas de 06 poços com inóculo de 4×10^6 por 24h e realizamos o tratamento com a IC_{50} das substâncias isoladas e combinadas por mais 24h. Após o tempo de tratamento, incubamos as células com $10 \mu M$ de DHE por 30 min, a $37^\circ C$ na ausência de luz. Como controle negativo, utilizamos DMSO e para controle positivo, as células foram estimuladas com PMA $2 \mu M$.

As células foram analisadas em citômetro BD LRSFortessa™ com excitação/emissão de 535/610 nm. Os resultados foram obtidos através do software BD FACSDiva (BD Biosciences). Os *debris* celulares foram omitidos e dez mil eventos foram avaliados por amostra.

4.9 TOXICIDADE SISTÊMICA

Foram utilizados 35 camundongos machos da espécie *Mus musculus*, linhagem C57BL/6 isentos de patógenos com 6 semanas de idade, pesando entre 17 e 21g, provenientes do Biotério do Instituto de Pesquisa Gonçalo Muniz FIOCRUZ/Salvador e mantidos em

instalações apropriadas com temperatura (23-25°C) e ciclo claro/escuro, com comida e água *ad libitum*.

Os animais foram divididos em seis grupos, designados como grupo A, B, C, D, E e F.

Grupo A: 5 animais, injeções controle

Grupo D: 3 animais, injeções β -Lap

Grupo B: 8 animais, injeções de DSS

Grupo E: 8 animais, injeções de CQ:DSS

Grupo C: 8 animais, injeções de CQ

Grupo F: 3 animais, injeções β -Lap:DSS

Todos os animais foram submetidos a injeções intra-peritoneal (i.p.) uma vez ao dia por cinco dias, conforme tabela 1 abaixo.

Tabela 1. Descrição do tratamento nos grupos experimentais *in vivo*

Grupos	Concentração	Diluyente	Veículo	Volume injetado
A	Cremophor 5% + DMSO 2%	Cremophor e DMSO	PBS	500 μ L
B	60 mg/kg	Cremophor	PBS	500 μ L
C	60 mg/kg	Cremophor	PBS	500 μ L
D	10 mg/kg	DMSO	PBS	500 μ L
E	60 mg/kg (DSS) + 60mg/kg (CQ)	Cremophor	PBS	500 μ L
F	60 mg/kg (DSS) + 10 mg/kg β -Lap	Cremophor e DMSO	PBS	500 μ L

Todas as diretrizes operacionais na habitação, rotina manuseio e procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Oswaldo Cruz sob o n° 24/2015.

Para os testes em animais utilizamos DSS, fármaco precursor do DETC (Farmanguinhos - Lote: 20141112); a CQ (Farmanguinhos - Lote: 28331) e a β -Lap (Sigma - Lote: MKBX6362V).

Todas as substâncias foram preparadas no dia da aplicação e dissolvidas em Cremophor (Sigma – Lote: BCBP4773V). O grupo controle foi tratado com veículo composto de Cremophor e DMSO (Panreac – Lote: 0000339164) e dissolvida em PBS.

Os animais foram sedados com tiopental por via i.p., fornecido pelo Biotério da FIOCRUZ, seis dias após o início do tratamento, para retirada do sangue para dosagens bioquímicas e realizado deslocamento de cervical para retirada de órgãos para análises histopatológicas.

Para os animais dos grupos A, B, E e F foi removido o cérebro, coração, fígado e rim. Para os animais dos grupos C e D foram retirados o fígado e o rim para análises histopatológicas.

4.10 HISTOPATOLOGIA

A preparação das peças para histopatologia foi feita pela abertura do abdome com a retirada do coração, fígado e do rim, e da caixa craniana para retirada do cérebro. Assim, imersos em formol em 10%, durante 24 horas e colocados em grades para processamento histológico e corados com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram escaneadas pelo escâner de lâminas Olympus VS120 e observadas pelo programa OlyVIA (Olympus).

4.11 ANÁLISES BIOQUÍMICAS DO SANGUE TOTAL

As enzimas Aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT), bem como o composto orgânico ureia foram mensurados a partir do sangue total dos animais a fim de realizar uma avaliação bioquímica hepática e renal, respectivamente. Para isso, 30 μ L do homogeneizado sanguíneo foram depositados, imediatamente após a coleta, em tiras magnéticas específicas para cada parâmetro e seu conteúdo analisado através do analisador automático Reflotron® Plus (Roche).

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram realizados em triplicatas e representados em média \pm desvio padrão. Para verificar as diferenças entre os grupos analisados utilizou-se o teste paramétrico da análise de variância (ANOVA) com pós-teste Tukey, quando os valores testados seguiam uma distribuição gaussiana, e o teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn, para os casos de não ocorrer distribuição normal. A normalidade dos valores foi testada pelo teste D'Agostino-Pearson. A diferença entre os grupos foi considerada significativa quando $p \leq 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o GraphPad Prism, versão 5.0 (Intuitive Software for Science, San Diego, CA, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 DETERMINAÇÃO DAS IC_{50} DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS EM CÉLULAS B16F10

A avaliação da inibição celular para as substâncias isoladas sobre células B16F10 apresentou efeito concentração dependente após 24h de tratamento. Os valores das IC_{50} encontrados foram $31,97\mu\text{M}$ para o DETC, $63,21\mu\text{M}$ para a CQ e $1,55\mu\text{M}$ para a β -Lap (Fig. 1A, 1B e 1C, respectivamente). Sendo assim a continuidade dos ensaios para a combinação, foi realizada utilizando esses valores.

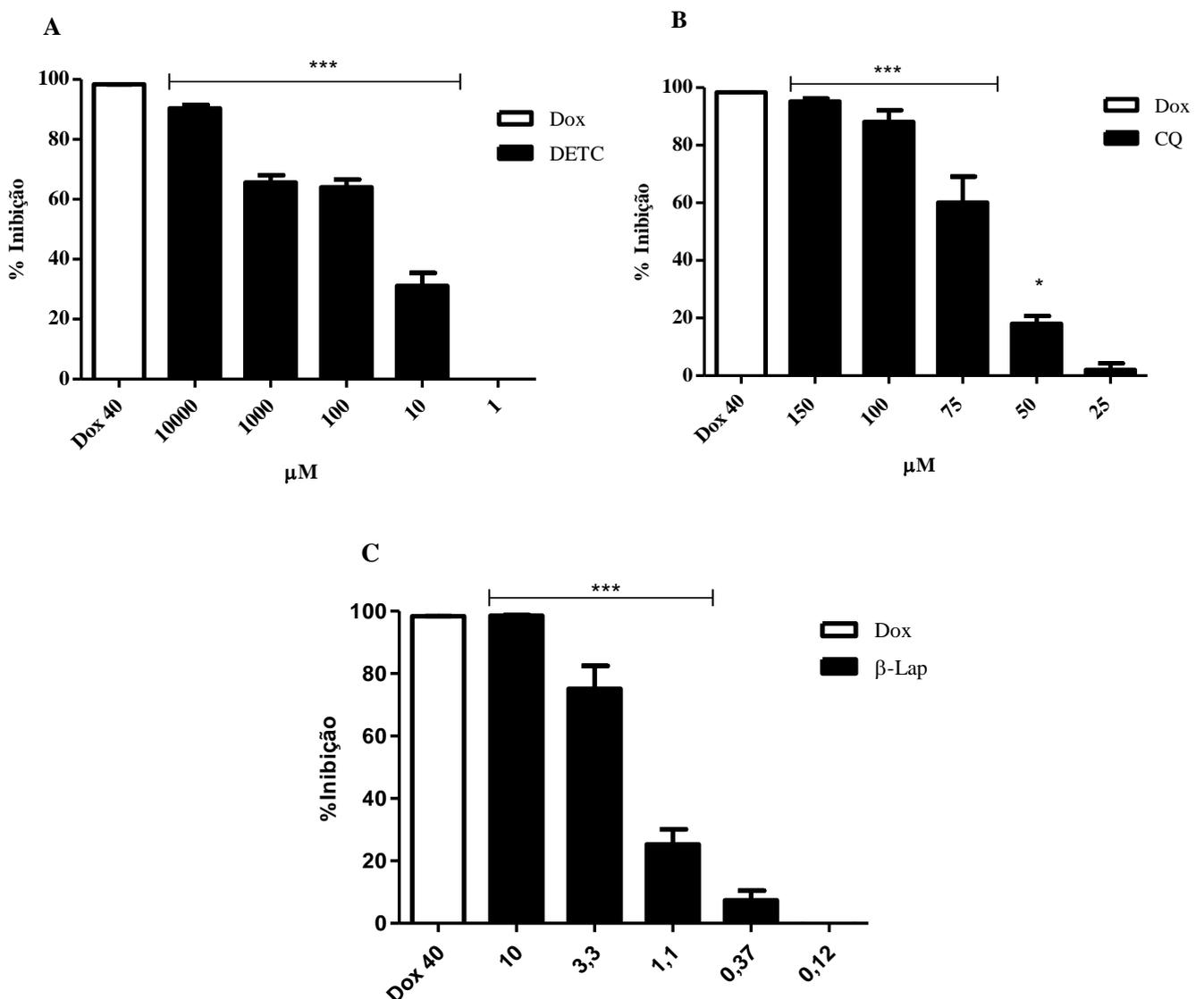


Figura 1. Avaliação do efeito inibitório do DETC (A), da CQ (B) e da β -Lap (C) sobre células B16F10. 1×10^5 células foram incubadas com diferentes concentrações das substâncias, em um período de 24 horas. Após esse período a densidade celular foi quantificada pelo método colorimétrico com azul de metileno 0,1%. Barras representam as médias \pm desvios padrões. Para o DETC, a CQ e a β -Lap, foram obtidos os valores de IC_{50} de $31,86\mu\text{M}$, $63,1\mu\text{M}$ e $1,55\mu\text{M}$, respectivamente. Dados representativos de cinco experimentos independentes e em triplicata. (***) $p < 0,0001$ - One-way ANOVA, pós-teste Tukey).

5.2 A COMBINAÇÃO POTENCIALIZA O EFEITO CITOTÓXICO DAS SUBSTÂNCIAS SOBRE CÉLULAS B16-F10

Para avaliar a ação inibitória da combinação, calculamos a razão entre as IC_{50} para CQ:DETC (13,40 μ M/26,81 μ M) obtendo um valor aproximadamente igual a 2 e β -Lap:DETC (0,32 μ M/6,41 μ M), obtendo um valor aproximadamente igual a 20. Desta forma, podemos afirmar que na combinação CQ:DETC, a CQ se apresenta cerca de duas vezes mais potente em inibir a proliferação de células B16F10 que o DETC. Já na combinação β -Lap:DETC, esse valor é aumentado vinte vezes para a β -Lap em relação ao DETC.

Ao observar a IC_{50} da combinação CQ:DETC, verifica-se que há uma diminuição de cerca de cinco vezes para a CQ quando comparada a IC_{50} dessa substância isolada e de cerca de duas vezes para o DETC nas mesmas condições. Enquanto a mesma análise da combinação de e β -Lap:DETC, permite-nos afirmar que há uma diminuição de cerca de cinco vezes quando comparado as IC_{50} das substâncias isoladas.

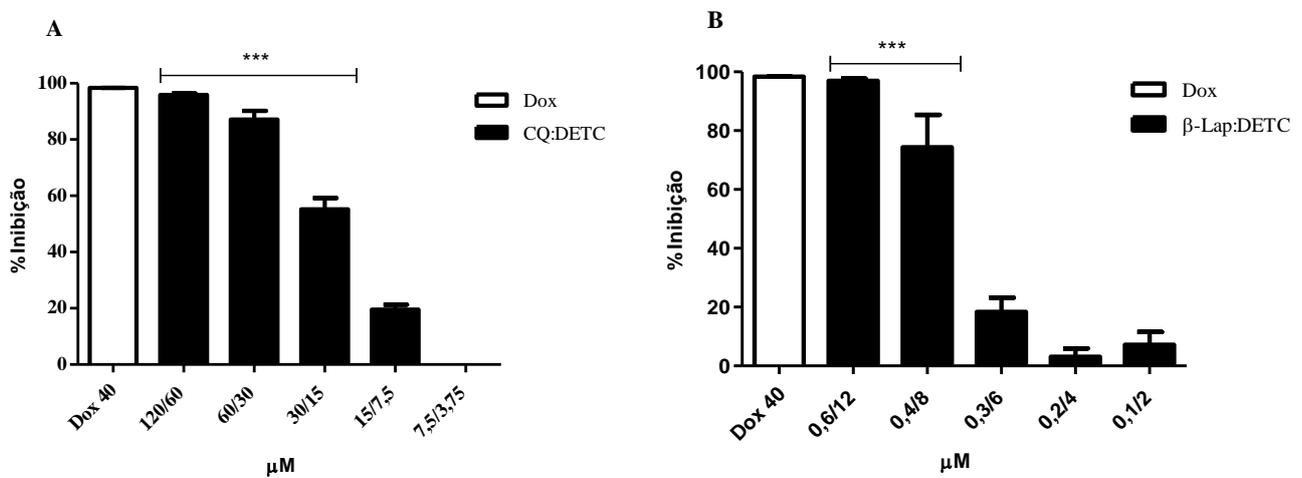


Figura 2. Avaliação da toxicidade *in vitro* das substâncias combinadas sobre B16F10. Verifica-se que as substâncias em combinação apresentam perfil concentração-dependente. Barras representam as médias \pm desvios padrões. Para a combinação CQ:DETC, foram obtidos os valores de IC_{50} 13,40 μ M CQ e 26,81 μ M DETC (A). Os valores da IC_{50} da combinação CQ:DETC (proporção 1:2) é 3x menor que quando testadas isoladamente. Para a combinação β -Lap:DETC, foram obtidos os valores de IC_{50} 0,32 μ M β -Lap e 6,4 μ M DETC (B). Os valores da IC_{50} da combinação β -Lap:DETC (proporção 1:20) é aproximadamente 5x menor que quando testadas isoladamente. Resultado representativo de cinco experimentos independentes e em triplicata. (***) $p < 0,0001$ - One-way ANOVA, pós-teste Tukey).

Para avaliar a toxicidade sobre células de mamíferos, suspensões de células Vero foram incubadas com diferentes concentrações das substâncias. A CC_{50} apresentada pelo DETC, pela CQ e pela β -Lap quando testados de forma isolada foram, respectivamente, $87,37\mu\text{M}$, $190,5\mu\text{M}$ e $5,21\mu\text{M}$ (Figura 3A, 3B e 3C).

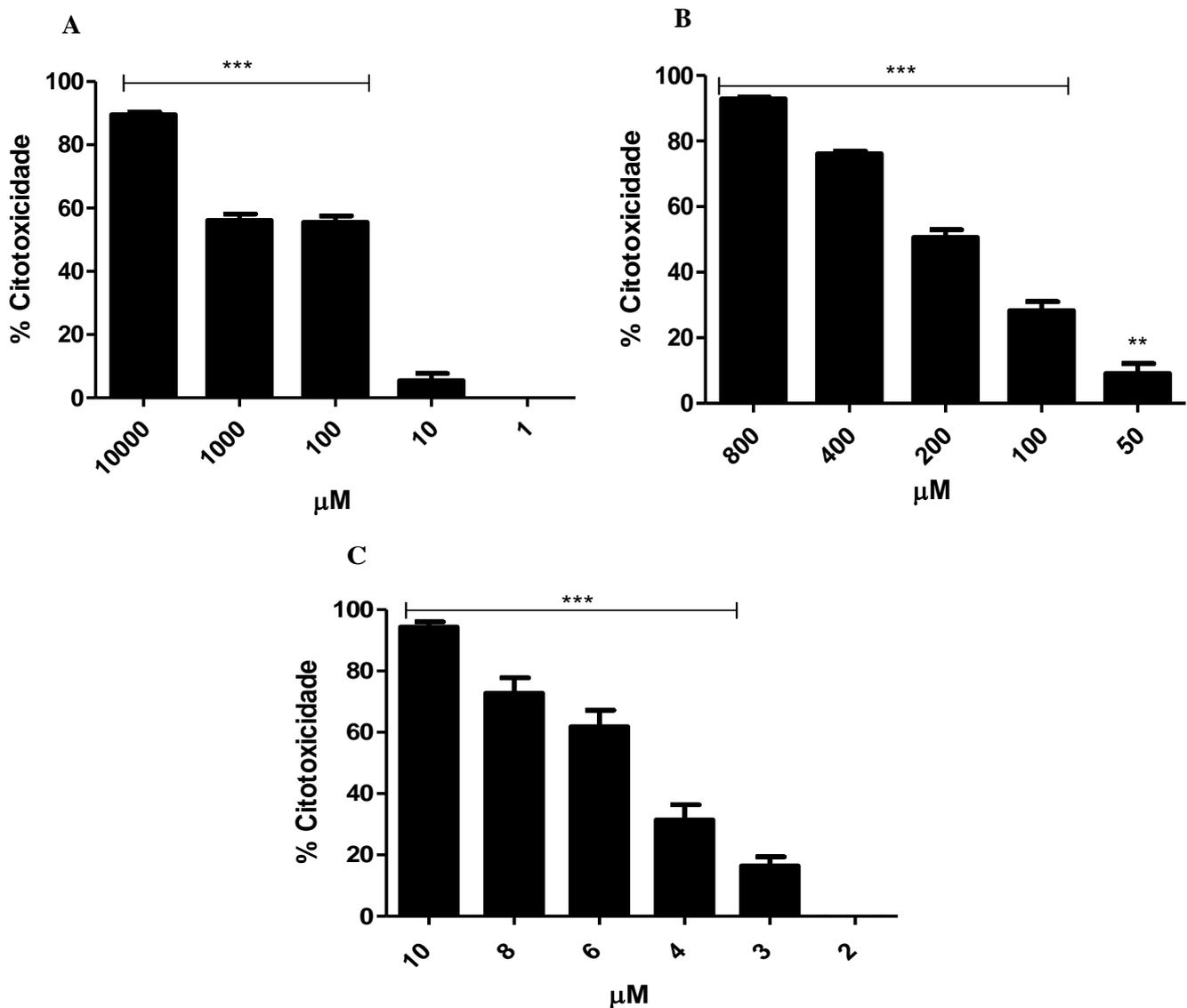


Figura 3. Avaliação do efeito inibitório do DETC (A), da CQ (B) e da β -Lap (C) sobre células Vero. 1×10^5 células foram incubadas com diferentes concentrações das substâncias, em um período de 24 horas. Após esse período a densidade celular foi quantificada pelo método colorimétrico com azul de metileno 0,1%. Barras representam as médias \pm desvios padrões. Foram obtidos os valores de CC_{50} de $87,37\mu\text{M}$, $190,5\mu\text{M}$ e $5,21\mu\text{M}$, respectivamente. Dados representativos de cinco experimentos independentes e em triplicata. (***) $p < 0,0001$ - One-way ANOVA, pós-teste Tukey).

5.4 EFEITO CITOTÓXICO DAS SUBSTÂNCIAS COMBINADAS SOBRE CÉLULAS VERO

Para avaliar a toxicidade sobre células de mamíferos, suspensões de células Vero foram incubadas com diferentes concentrações da combinação na proporção de 1:2 de CQ:DETC e de 1:40 de β -Lap:DETC respectivamente. A proliferação destas células foi quantificada através de teste colorimétrico, conforme descrito no item 4.3 desta metodologia e a CC_{50} foi determinada. Assim a combinação de CQ:DETC apresentou CC_{50} de 58,49 μ M para a CQ e 40,94 μ M para o DETC (Fig. 4A), e a combinação β -Lap:DETC apresentou CC_{50} de 0,35 μ M para a β -Lap e 16,7 μ M para o DETC (Fig. 4B).

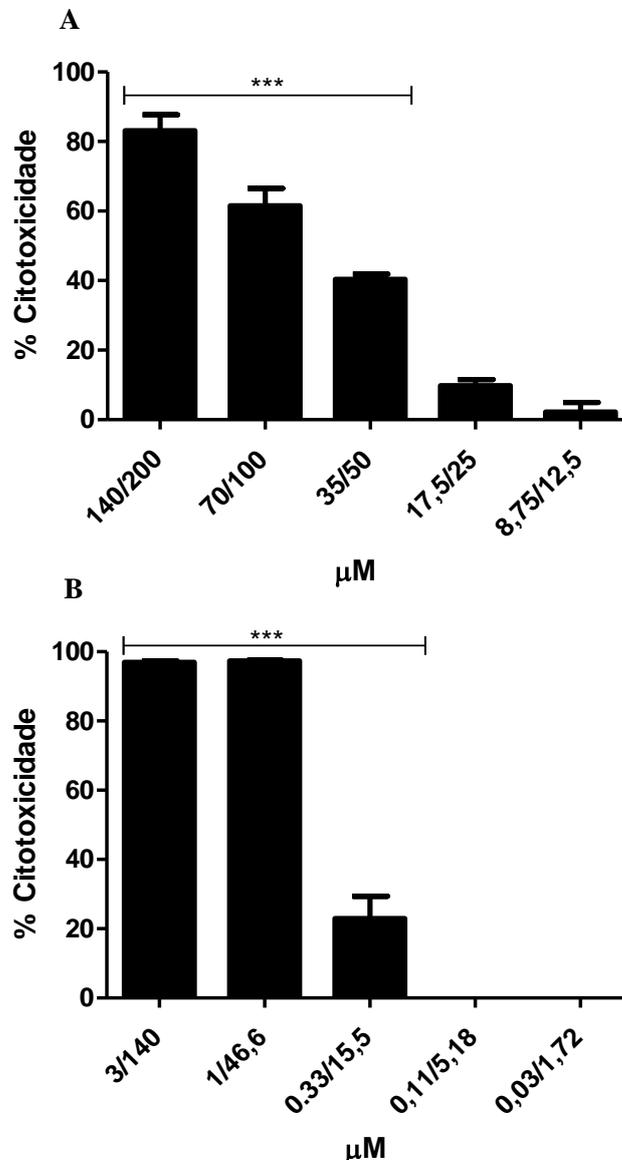


Figura 4. Avaliação da toxicidade das substâncias combinadas sobre células Vero. Barras representam as médias \pm desvios padrões. Para a combinação CQ:DETC foram obtidos os valores de CC_{50} de 58,49 μ M, 40,94 μ M, respectivamente (A); e para a combinação β -Lap:DETC foram obtidos os valores de CC_{50} de 0,356 μ M e 16,71 μ M, respectivamente (B). Dados representativos de cinco experimentos independentes e em triplicata. (***) $p < 0,0001$ - One-way ANOVA, pós-teste Tukey).

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DAS COMBINAÇÕES CQ:DETC E β -LAP:DETC EM CÉLULAS B16F10

Foi avaliado o efeito do tratamento em células B16F10 utilizando a FIC_{75} , FIC_{50} e FIC_{25} . Esta, revela a magnitude da variação da concentração das substâncias na combinação em relação as substâncias isoladas para obtenção de um mesmo efeito.

Tabela 2. Concentrações inibitórias das substâncias isoladas e combinadas

Efeito Inibitório	25%	50%	75%	Efeito Inibitório	25%	50%	75%
CQ COMBINAÇÃO (μM)	8,61	13,40	20,86	β-Lap COMBINAÇÃO (μM)	0,30	0,32	0,34
CQ ISOLADA (μM)	51,73	63,21	77,25	β-Lap ISOLADA (μM)	0,94	1,55	2,55
FIC da CQ	0,166441	0,211992	0,270032	FIC da β-Lap	0,319149	0,206452	0,133333
DETC COMBINAÇÃO (μM)	17,22	26,81	41,73	DETC COMBINAÇÃO (μM)	6,00	6,41	6,84
DETC ISOLADO (μM)	5,82	31,86	174,3	DETC ISOLADO (μM)	5,82	31,86	174,30
FIC do DETC	2,958763	0,841494	0,239415	FIC do DETC	1,030928	0,201193	0,039243

Esses dados podem ser melhor visualizados nos isobogramas representados na figura 5, que é a representação gráfica do efeito das combinações. Pode ser observado que para a combinação CQ:DETC (Fig. 5A) a FIC_{75} apresenta sinergismo, enquanto a FIC_{50} apresenta aditividade e a FIC_{25} antagonismo. Para a combinação β -Lap:DETC (Fig. 5B), tanto a FIC_{75} quanto a FIC_{50} apresentam sinergismo e a FIC_{25} sugere antagonismo.

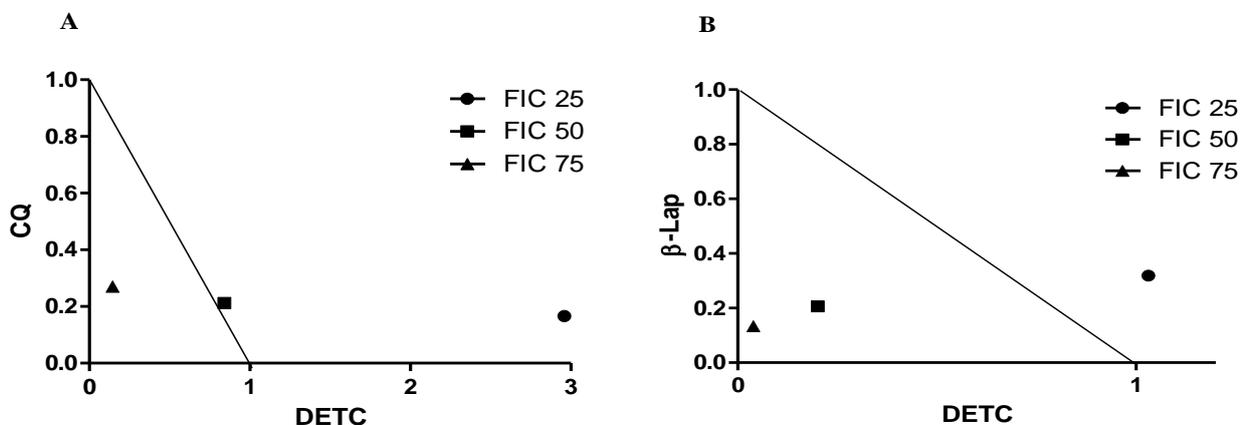


Figura 5. Isobogramas representativos das interações *in vitro* da combinação de CQ:DETC e β -Lap:DETC em células B16F10. Os números na abcissa representam os índices de combinação do DETC e os da ordenada, da CQ (A) e da β -Lap (B) respectivamente, calculados a partir das FIC das monoterapias e das combinações. Os dados representam a média de três experimentos independentes.

5.6 ÍNDICES DE SELETIVIDADE

Um importante critério na pesquisa de compostos ativos com potencial terapêutico para o câncer é determinar a ausência de efeitos tóxicos nas células do hospedeiro. A citotoxicidade para células Vero e para células B16F10 foi comparada utilizando o índice de seletividade (IS), que consiste na razão entre a concentração citotóxica 50% (CC₅₀) para células Vero e IC₅₀ para células B16F10. Os resultados do IS apresentados na tabela 3 mostram que nas combinações os compostos não apresentaram seletividade muito divergente que quando comparados as substâncias isoladas. Entretanto, pode-se verificar nos testes de toxicidade sistêmica (Fig. 13), que as combinações apresentaram baixa toxicidade, além dos testes *in vitro* mostrarem que são necessárias concentrações menores das substâncias em combinação comparadas com as isoladas para se alcançar o mesmo efeito.

Tabela 3. Índices de seletividade das substâncias isoladas e combinadas

Tratamento	CC₅₀	IC₅₀	IS
CQ ISOLADA (μM)	190,50	63,21	3,03
β-Lap ISOLADA (μM)	5,21	1,55	3,36
DETC ISOLADO (μM)	87,37	31,86	2,74
CQ COMBINAÇÃO DETC (μM)	58,49	13,40	4,36
DETC COMBINAÇÃO CQ (μM)	40,94	26,81	1,52
β-Lap COMBINAÇÃO DETC (μM)	0,35	0,32	1,11
DETC COMBINAÇÃO β-Lap (μM)	16,71	6,41	2,60

5.7 ALTERAÇÃO ESTRUTURAL EM MEV APÓS TRATAMENTO COM AS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS E COMBINADAS

Utilizando MEV, observamos no controle (Fig. 6A e 6B) morfologia alongada e superfície coberta por protrusões de superfície esferoidais, conhecidas como “blebs” (MANAKOVA et al., 2016) bem distribuídos. No tratamento com DETC, verificamos nos tempos avaliados 3h e 6h (Fig. 6C-D), que as células mantêm o padrão de espraiamento, porém apresentam dispersão dos blebs. Em 12h (Fig. 6E), as células se mostram arredondadas e parecem se desprender do substrato e em 24h (Fig. 6F), observa-se deformações na membrana celular.

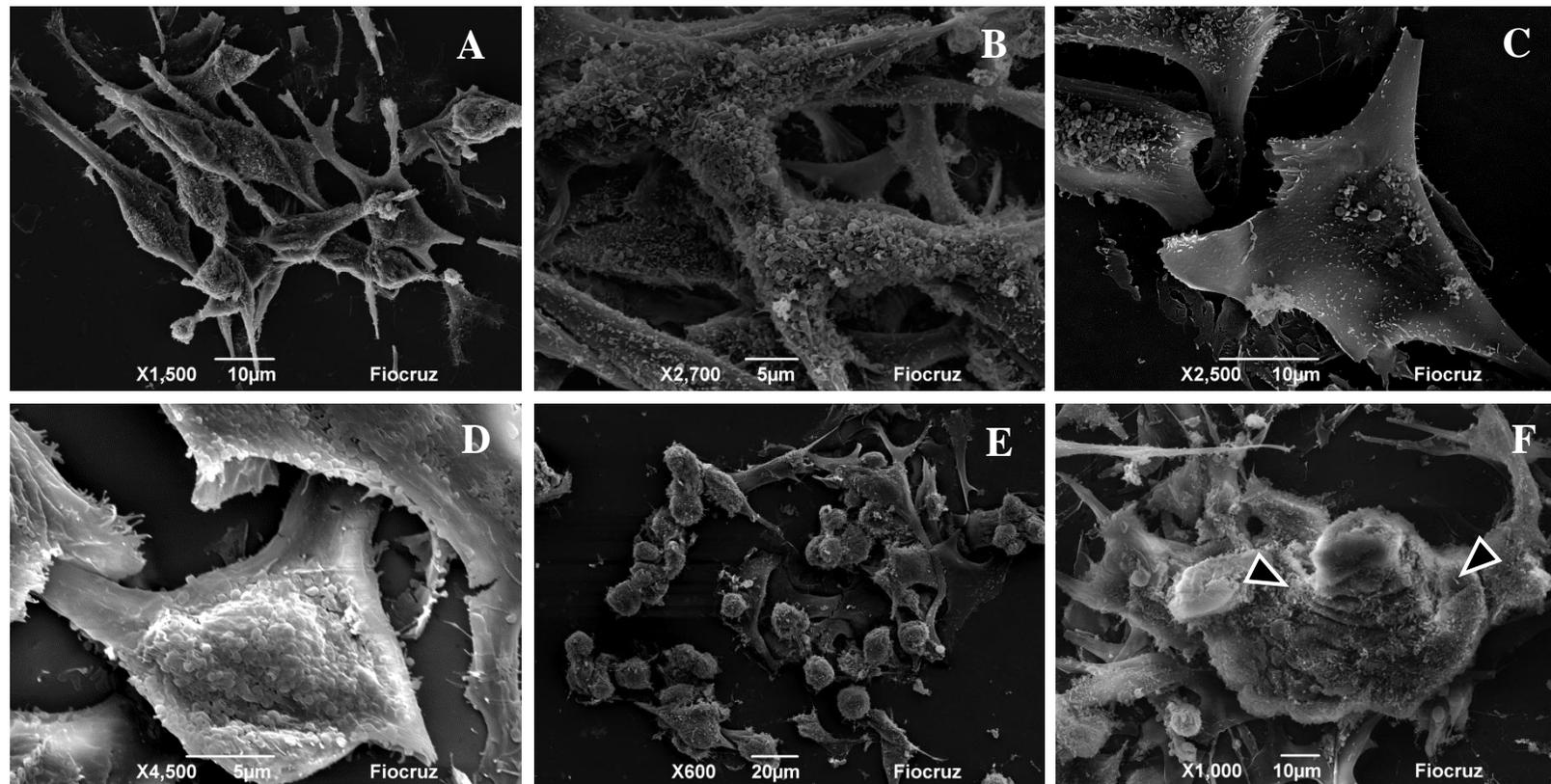


Figura 6. Efeitos do tratamento com DETC na morfologia de células B16F10 avaliadas por MEV. Células do controle mostrando padrão usual de espraiamento celular (A e B); após 3h apresentando menos protrusões de superfície (C) e 6h tratamento com DETC, apresentando formação de ‘blebs’ (D); após tratamento por 12h com DETC, ocorre redução do espraiamento com consequente redução da relação superfície/volume das células que passam a apresentar aspecto globoso (E); células tratadas com DETC por 24h apresentam retração de processos periféricos aparentemente ocasionando deformações na forma de ondulações (pontas de seta) (F).

Ao avaliarmos os efeitos da CQ nos tempos de tratamento 3h (Fig. 7A), 6h (Fig. 7B), 12h (Fig. 7C) e 24h (Fig. 7D), observamos que as células começam a mudar o padrão de espriamento a partir de 6h de tratamento. No tratamento realizado com β -Lap observamos comportamento semelhante a partir de 6h de tratamento e verificamos que com 24h de tratamento as células se apresentam arredondadas, sugerindo efeitos citotóxicos desses compostos.

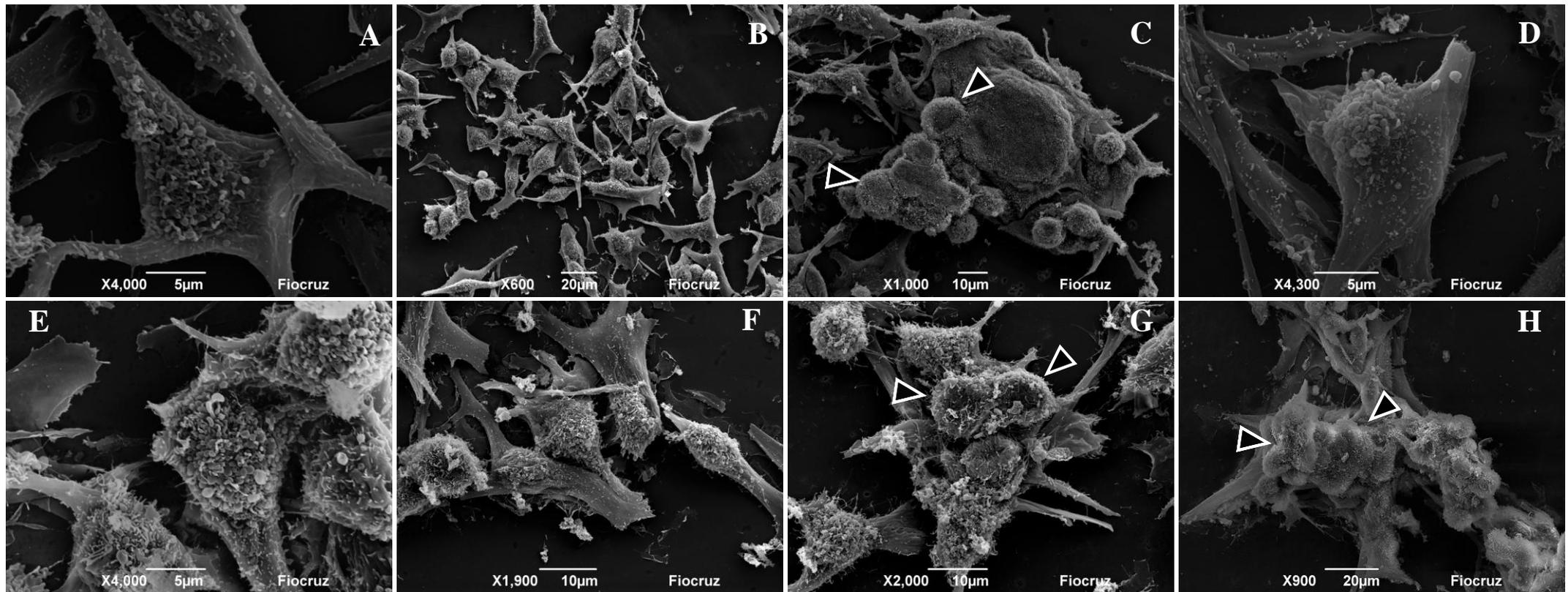


Figura 7. Efeitos do tratamento com CQ e β -Lap na morfologia de células B16F10 avaliadas por MEV. Células tratadas com CQ nos tempos 3, 6, 12 e 24h (A-D) e tratadas com β -Lap nos mesmos intervalos de tempo (E-H). Observa-se redução de processos de superfície, principalmente na periferia das células submetidas a ambos os tratamentos. Nos tempos de incubação de 12 e 24h foi verificada a perda de espriamento e numerosas células esferoidais não apresentam conexão com o substrato (lamínulas – pontas de seta)

Ao avaliarmos os efeitos da combinação de CQ:DETC nos tempos 3h (Fig. 8A), 6h (Fig. 8B), 12h (Fig. 8C) e 24h (Fig. 8D), observamos que as células mudam o padrão de espraiamento a partir de 3h de tratamento. No tratamento realizado com a combinação de β -Lap:DETC observamos comportamento semelhante a partir de 3h de tratamento e verificamos que com 6h de tratamento as células apresentam rugosidades em sua superfície, sugerindo efeitos citotóxicos desses compostos.

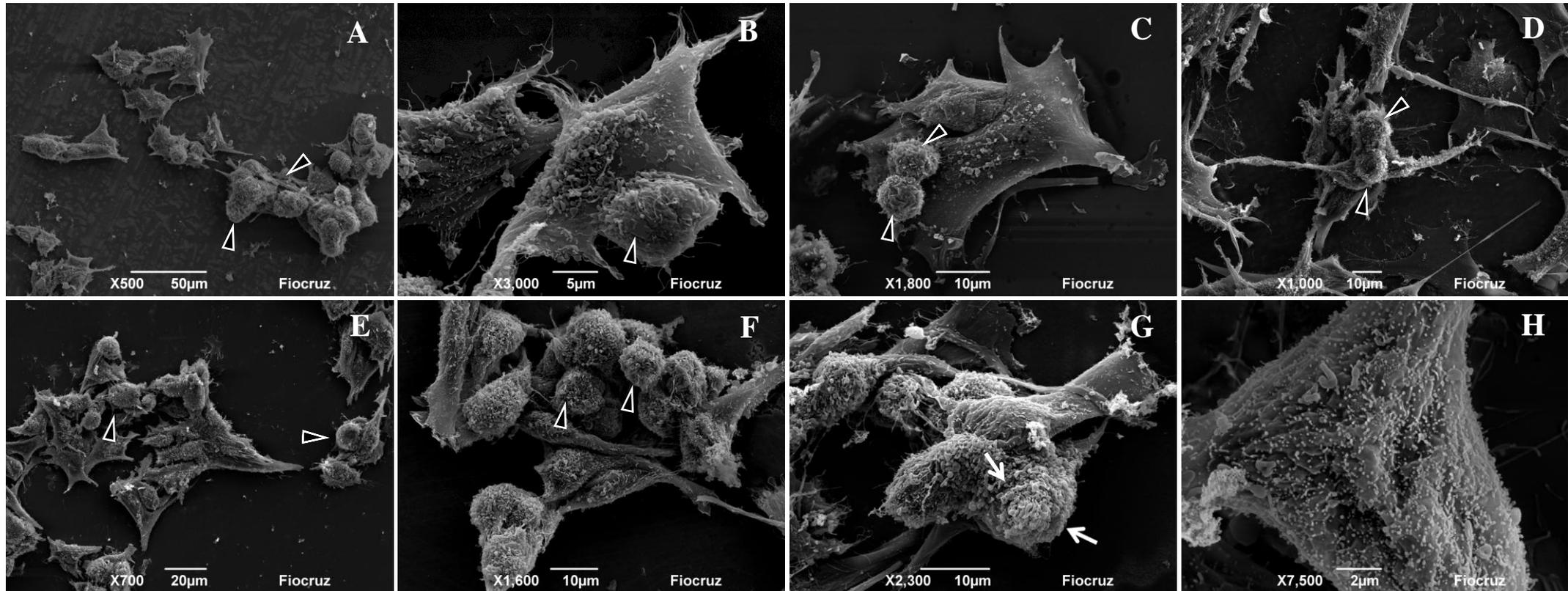


Figura 8. Efeitos do tratamento com as combinações CQ:DETC e β -Lap:DETC na morfologia de células B16F10 avaliadas por MEV. Células incubadas com CQ:DETC nos tempos 3, 6, 12 e 24h (A-D), mostraram alterações tais como células esferoidais (pontas de seta) desde o início das incubações e, em geral, as células mais espraiadas tendem a apresentar menos protrusões de superfície e estas, quando existentes, mostram-se concentradas na região perinuclear. As células incubadas com β -Lap:DETC nos mesmos intervalos de tempo (E-H) também apresentaram células esferoides (pontas de seta) e deformações decorrentes da retração citoplasmática (G, seta) e células parcialmente espraiadas demonstram aumento do volume celular (H).

5.8 ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS EM MET APÓS TRATAMENTO COM AS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS E COMBINADAS

Para a Microscopia Eletrônica de Transmissão as células foram tratadas com a IC₅₀ das substâncias isoladas e em combinação durante 24h. As células seccionadas ultrafinas demonstram no controle (Fig. 9A), ultraestrutura inalterada, com preservação da eletrondensidade. Após 24h de tratamento com DETC (Fig. 9B) é possível observar fragmentação nuclear e vacuolização do citoplasma, assim como sugerir danos mitocondriais (Figura 9C), indicação de picnose e descontinuidade de membrana (Fig. 9D).

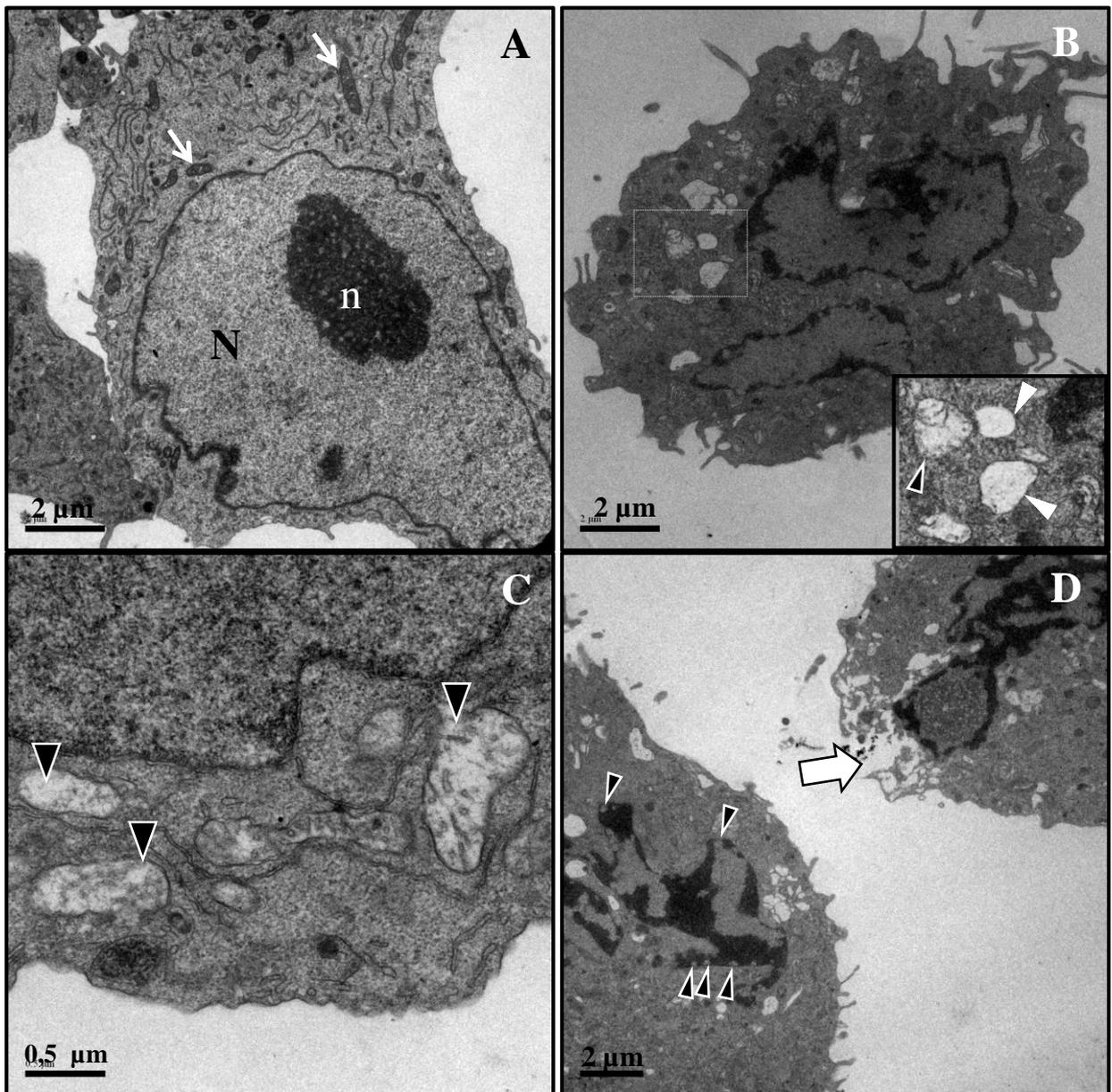


Figura 9. Microscopia eletrônica de transmissão de células B16F10 antes e após incubação com DETC. Células do controle mostrando eletrondensidade preservada, particularmente do citoplasma, núcleo (N), nucléolos (n) e das mitocôndrias (setas). Notar a regularidade da morfologia nuclear e da cromatina periférica (A). Células incubadas com 31,86 µM de DETC por 24h mostraram-se vacuolizadas (ponta de seta branca, in set) (B) com algumas mitocôndrias danificadas (ponta de seta preta, in set) e com extensa redução da eletrondensidade da matriz mitocondrial (C, pontas de seta). As células incubadas apresentaram tanto indicações de picnose nas áreas de poro nucleares (D, pontas de seta), como soluções de descontinuidade de membrana (D, seta).

Quando as células foram tratadas com CQ por 24h, observamos intensa vacuolização do citoplasma e perda de eletondensidade (Fig. 10A) assim como estruturas membranares multilameres (Fig. 10B).

No tratamento com a β -Lap por 24h, verificamos perda da integridade das mitocondriais, assim como alongamento das cristas (Fig. 10C-D).

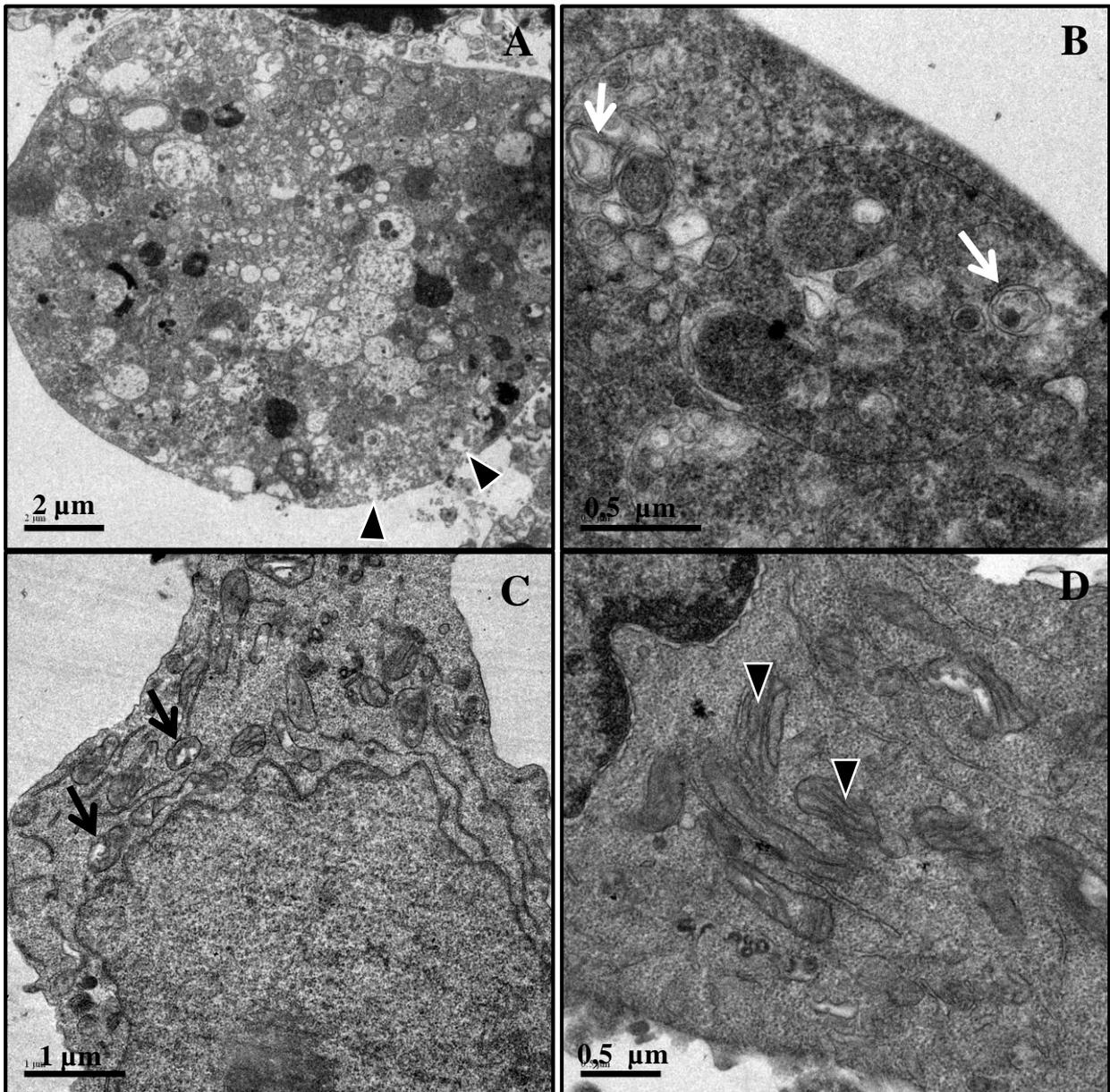


Figura 10. Microscopia eletrônica de transmissão células B16F10 após tratamento com CQ e β -Lap. Células incubadas com 63,21 μ M de CQ 24h (A e B) apresentaram extensa vacuolização citoplasmática e descontinuidade de membrana (A, **pontas de seta**) e em maiores aumentos são evidenciados grandes autofagossomos contendo estruturas membranares multilamelares (B, **setas**); Células após 24h de tratamento com 1,55 μ M de β -Lap demonstraram danos mitocondriais (C, **setas**), bem como cristas mitocondriais alongadas e frequentemente com disposição longitudinal (D, **pontas de seta**).

Quando as células foram tratadas com a combinação CQ:DETC por 24h, observamos formação de vacúolos e mudanças na estrutura mitocondrial, como dilatação das cristas e a interrupção das membranas (Figura 11 A e 11B).

No tratamento com a combinação β -Lap:DETC por 24h, verificamos acúmulos lipídicos luminiais em cisternas de retículo endoplasmático (RE) com a formação de gotículas ou inclusões lipídicas no citoplasma (Fig. 11C-D).

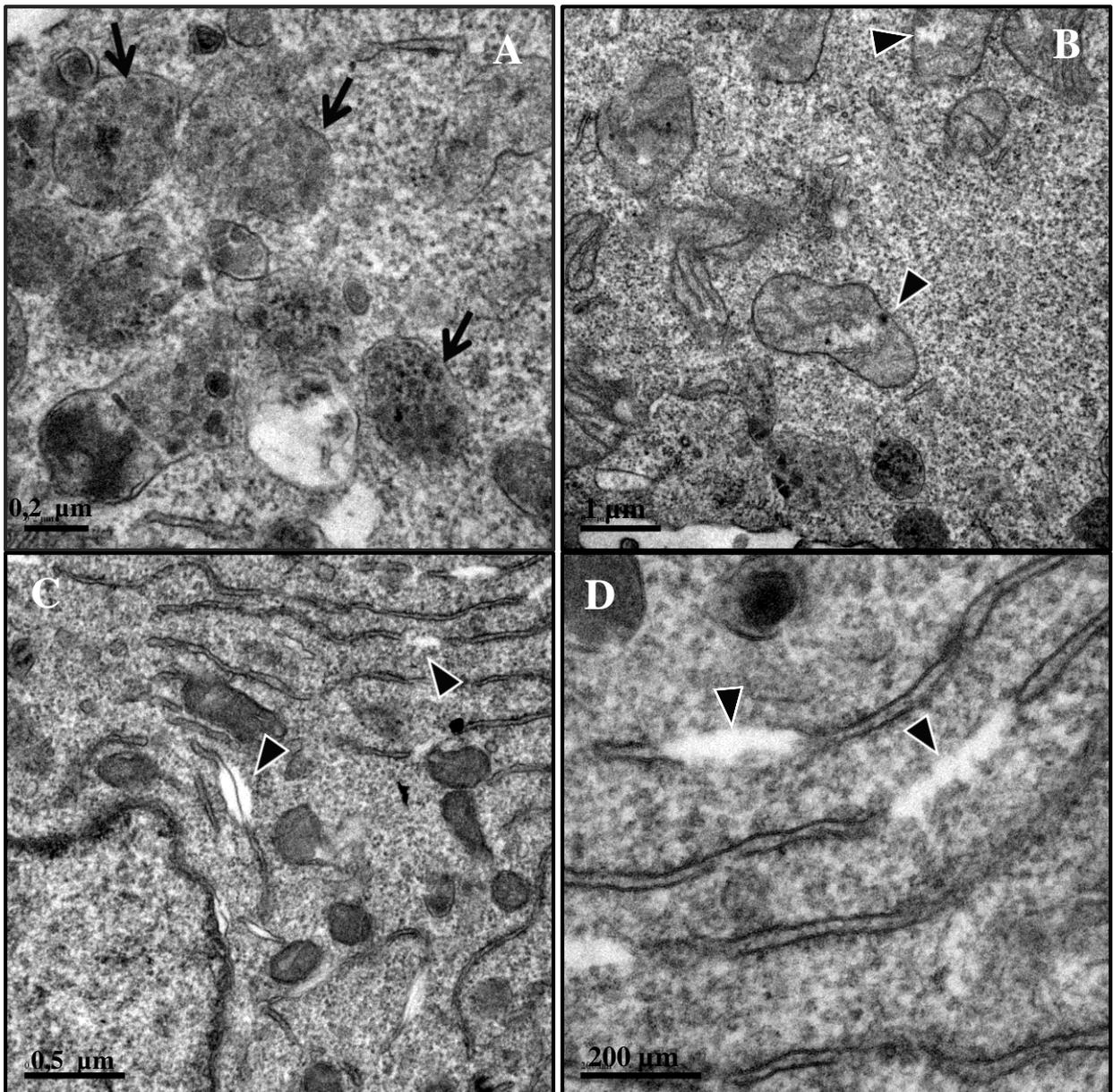


Figura 11 Alterações ultraestruturais em células B16F10 após tratamento com as combinações de CQ:DETC e β -Lap:DETC avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão. Células após 24h de tratamento com a combinação CQ:DETC, formação dos vacúolos (A, setas), dilatação das cristas e interrupção das membranas (B, pontas de seta). Células após 24h de tratamento com a combinação β -Lap:DETC (C e D). Notar acúmulos lipídicos em cisternas de retículo endoplasmático (pontas de seta).

5.9 AVALIAÇÃO DA MORTE EM CÉLULAS B16F10 TRATADAS COM AS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS E EM COMBINAÇÃO

Para avaliar quais os mecanismos de morte celular envolvidos, utilizamos a sonda Anexina V-FITC que quantifica a exposição de fosfatidilserina. Utilizamos também a sonda iodeto de propídio (PI), que indica descontinuidade de membrana. Para isto, células B16F10 foram incubadas, por 24h com a IC₅₀ dos tratamentos tanto para as substâncias isoladas quanto para as combinadas. Após o tratamento as células foram incubadas com as sondas e submetidas a análise de citometria de fluxo. O tratamento com a IC₅₀ do DETC, da CQ, da β -Lap, assim como suas combinações resultaram em marcações positivas para ambas as sondas, porém demonstram um efeito maior para Anexina V-FITC (Fig. 11). Isto pode indicar que o mecanismo de morte envolvido seja preferencialmente por apoptose.

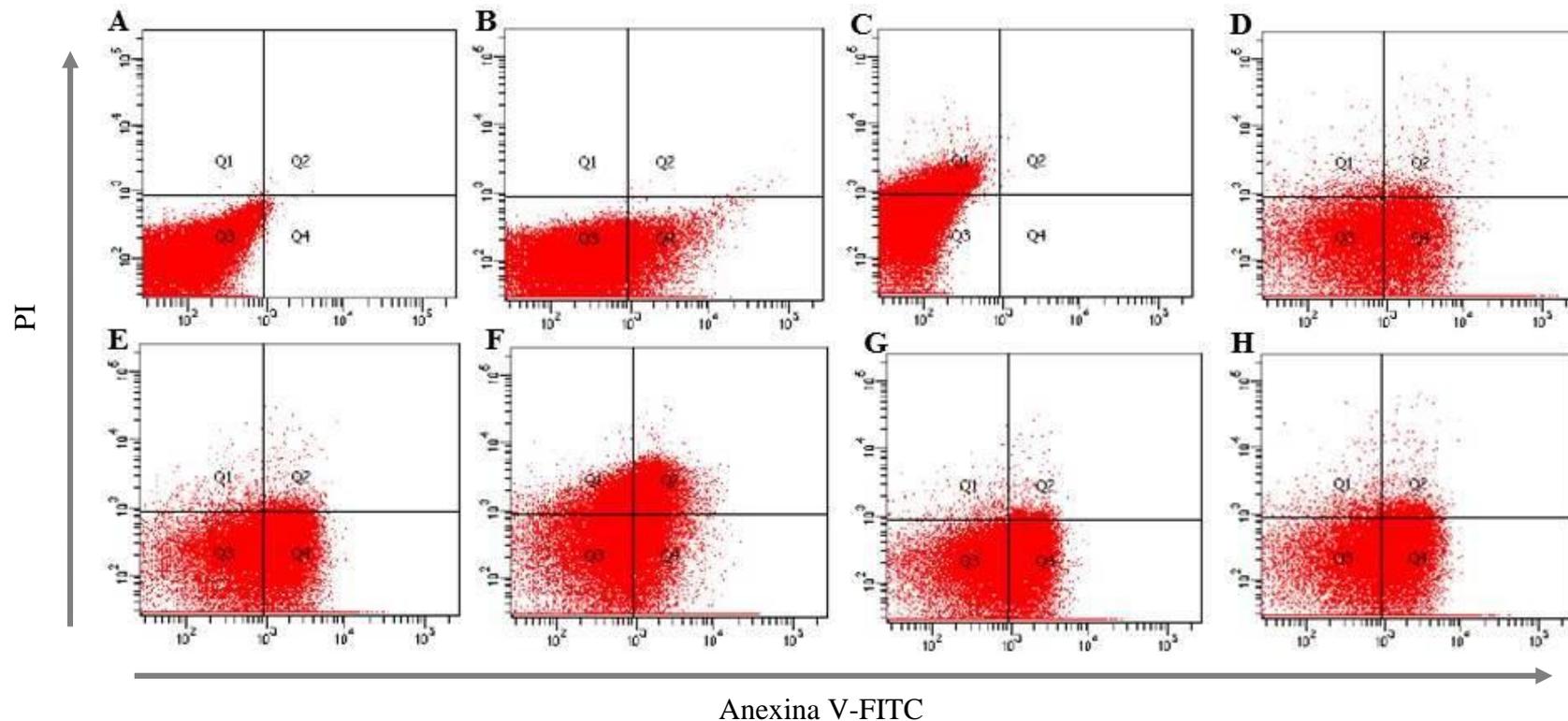


Figura 12. Quantificação de células B16F10 marcada com anexina V-FITC e Iodeto de Propídio após o tratamento com DETC, CQ, β -Lap, e suas combinações. As células foram incubadas na concentração de 4×10^6 /mL, Controle negativo (DMSO)(A); Controle positivo Anexina V-FITC e PI (B e C); IC₅₀ DETC (D); IC₅₀ CQ (E); IC₅₀ β -Lap (F); Combinação CQ:DETC (G) e Combinação β -Lap:DETC (H). A co-marcação com Anexina V-FITC e PI foi analisada por citometria de fluxo.

5.10 OS TRATAMENTOS AUMENTARAM A PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

A utilização da sonda DHE apontou marcações expressivas para todos os tratamentos com as IC_{50} . Para os ensaios com as substâncias isoladas, verificou-se marcação positiva das células analisadas, respectivamente de 44,6% para o DETC (Fig. 13C), 51,9% para a CQ (Fig. 13D) e 33,5% para a β -Lap (Fig. 13E). Para as combinações, verificamos 45,3% de marcação positiva para CQ:DETC (Fig. 13F) enquanto para β -Lap:DETC verificamos 50,4% (Fig. 13G) de detecção de radicais superóxidos. O controle negativo não apresentou marcação (Fig. 13A), enquanto que o controle positivo PMA detectou em 44,2% das células (Fig. 13B).

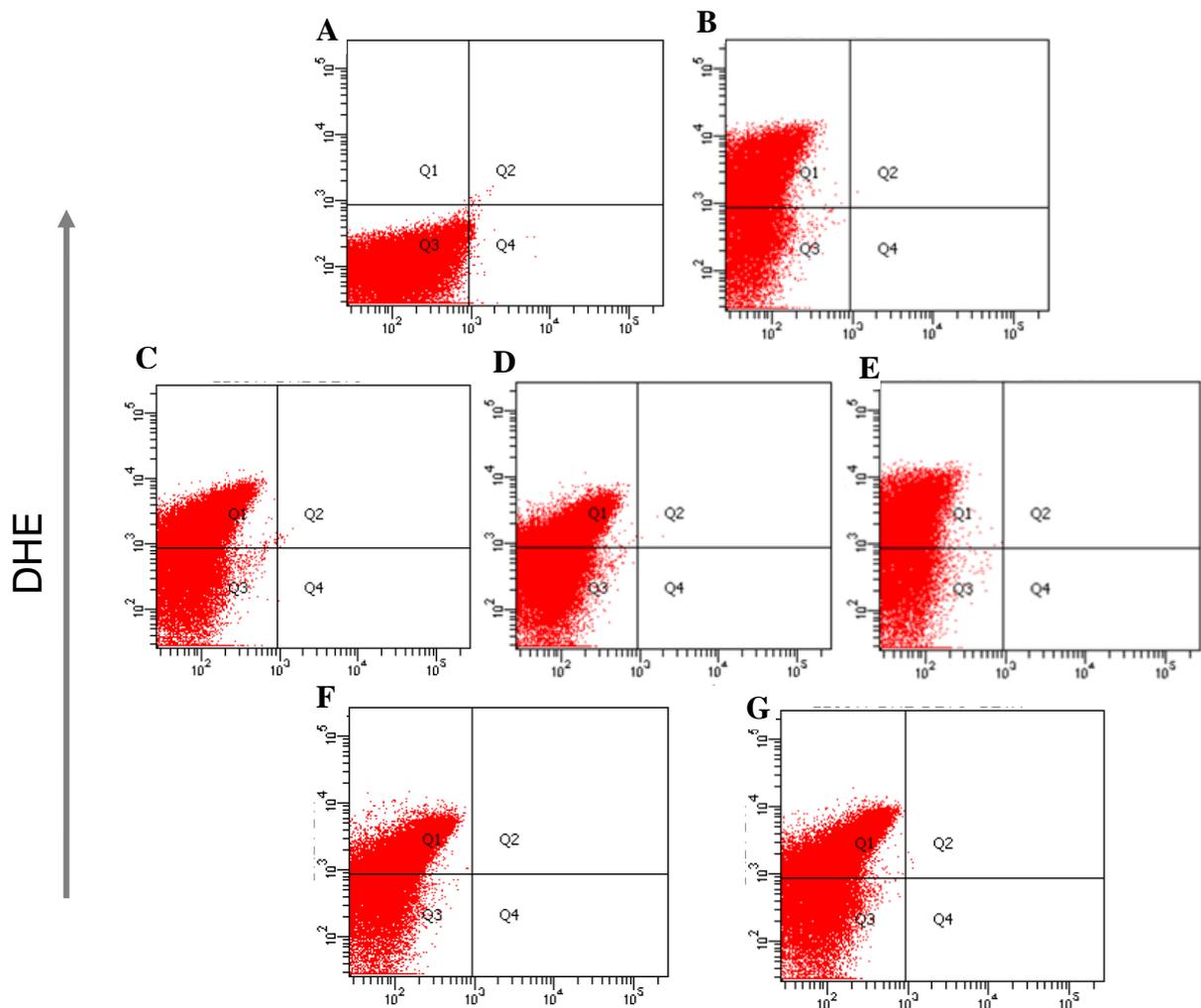


Figura 13. Quantificação de fluorescência por sonda DHE após o tratamento de células B16F10 com DETC, CQ, β -Lap, e suas combinações. A avaliação da produção de radicais superóxidos foi realizada após os tratamentos por 24h. 4×10^6 /mL células foram incubadas. Controle negativo (DMSO) (A); Controle positivo PMA (B); IC_{50} DETC (C); IC_{50} CQ (D); IC_{50} β -Lap (E); Combinação CQ:DETC (F) e Combinação β -Lap:DETC (G). A marcação com DHE foi analisada por citometria de fluxo.

5.11 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

As análises sanguíneas dos animais foram realizadas no LBP-Fiocruz, e a coleta do sangue foi realizada pela sangria do plexo braquial em tubos contendo anticoagulante heparina.

As análises bioquímicas foram realizadas em amostras de sangue total usando um analisador bioquímico Reflotron (Cobas Mira Roche®). As concentrações de enzimas hepáticas e marcador renal foram determinadas usando kits de diagnóstico padronizados (Reflotron®), segundo informações do fabricante.

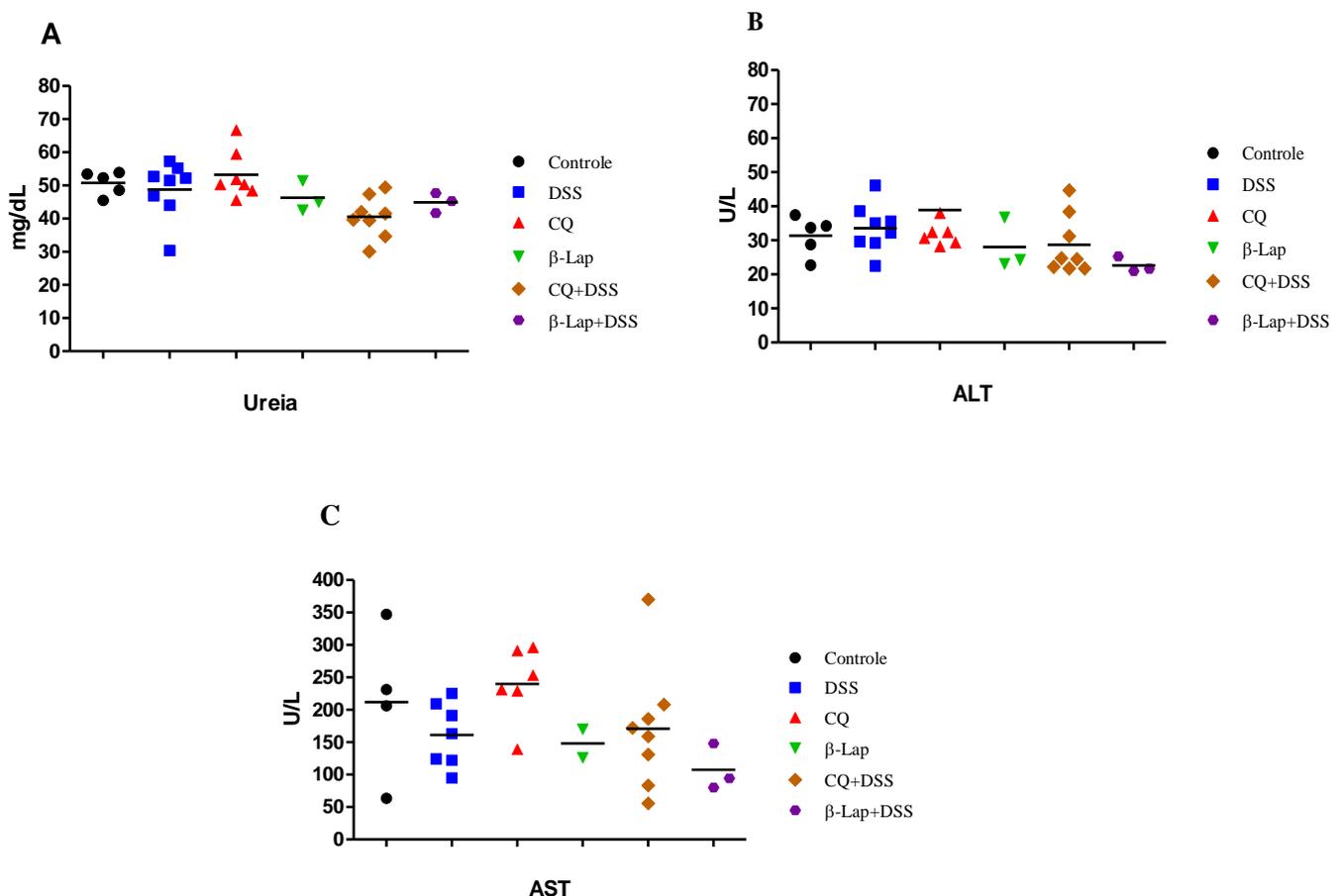


Figura 14. Efeito dos tratamentos ministrados de forma isolada e combinada obtidas pelas médias de sangue total de camundongos linhagem C57Bl/6. Marcadores hepáticos e renais após administração intraperitoneal, durante cinco dias, de DETC (60 mg/kg), CQ (60 mg/kg), β-Lap (10 mg/kg) e combinações CQ:DETC (60:60 mg/kg) e β-Lap:DETC (10:60 mg/kg) em camundongos da linhagem C57BL/6. Solução com PBS contendo Cremofor 5% e DMSO 2% foi usado como controle. Resultado representativo de um experimento. Cada barra representa a média. Não houve diferença significativa entre os grupos de tratamento e o controle ($p < 0,05$ - Kruskal-Wallis, pós-teste Dunns.). Ureia (A). ALT (B). AST (C).

5.12 HISTOPATOLOGIA

O estudo de toxicidade aguda revelou a natureza não tóxica das substâncias testadas, tanto das isoladas quanto das combinadas. Não houve letalidade nem quaisquer reações tóxicas

Nas avaliações realizadas no tecido nervoso, observa-se que tanto no controle quanto nos tratamentos, o córtex cerebral apresenta-se dentro dos limites histológicos normais. Os neurônios destacam-se pelo maior volume celular, citoplasma distinto com limites nítidos, por vezes com corpúsculos de Nissl, núcleo vesiculoso com cromatina frouxa e nucléolo proeminente (Fig. 15A). Nos tratamentos com DSS (Fig. 15B) e CQ (Fig. 15C), a camada molecular encontra-se íntegra e na camada granulosa e piramidal externa verifica-se neurônios com formatos triangulares e neurópilo preservado. No tratamento com β -Lap:DSS (Fig. 15D) verifica-se predomínio de células gliais.

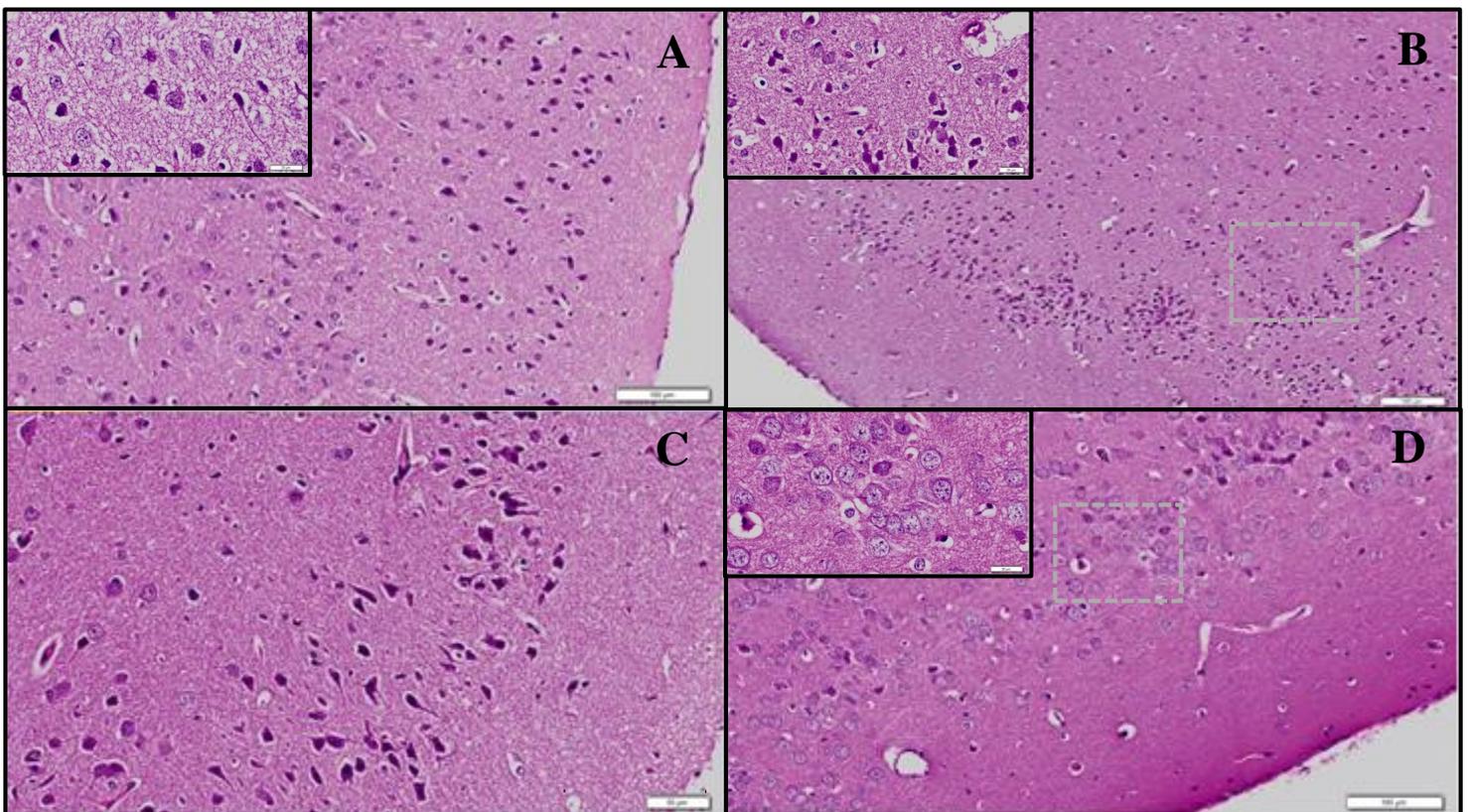


Figura 15. Fotomicrografias do cérebro de camundongos linhagem C57Bl/6. Tratamentos realizados por 5 dias, de DSS, CQ:DSS e β -Lap:DSS. Controle (Cremofor 5% e DMSO 2%) (A), verifica-se preservação do tecido nervoso. No in set, observa-se morfologia inalterada dos neurônios. DSS (60 mg/kg) (B) e CQ:DSS (60:60 mg/kg) (C), camadas molecular, granulosa e piramidal externa íntegras. No in set, observar preservação do neurópilo. β -Lap:DSS (60:60 mg/kg) (D), notar no in set grande quantidade de células da glia. Coloração H&E. Barras representam 100 μ M (A,B e D) e 50 μ M (C).

A histopatologia do coração também não apresentou anormalidades, tanto no controle (Fig. 16A) quanto nos tratamentos com as combinações de CQ:DSS (Fig. 16B) e β -Lap:DSS (Fig. 16C).

Observa-se cardiomiócitos com núcleos preservados, estriações transversais e discos intercalares sem nenhuma alteração, o que pode sugerir que as combinações não apresentam cardiotoxicidade.

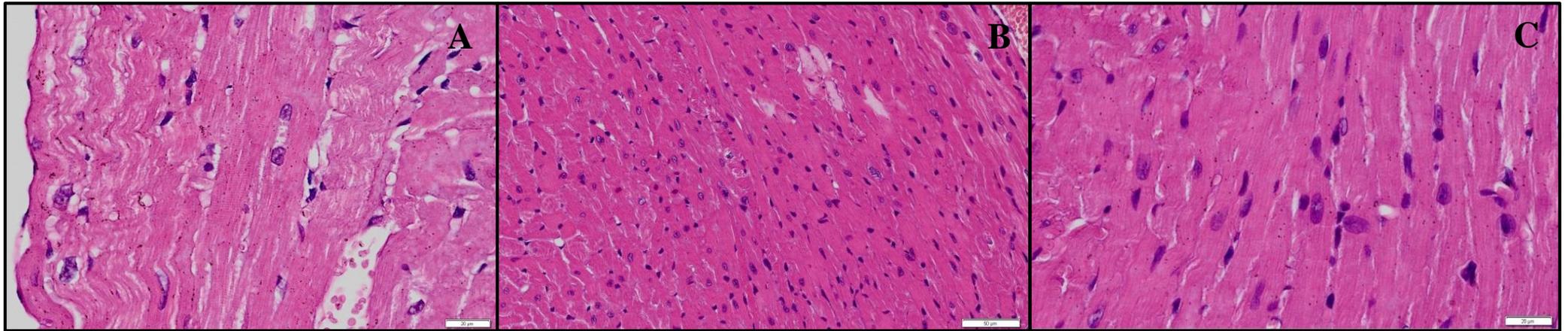


Figura 16. Fotomicrografias do coração de camundongos linhagem C57Bl/6. Tratamentos realizados por 5 dias, CQ:DSS e β -Lap:DSS. Controle (Cremofor 5% e DMSO 2%) (A), verifica-se cardiomiócitos íntegros, com preservação de núcleos e estrias transversais. CQ:DSS (60:60 mg/kg) (B) e β -Lap:DSS (60:60 mg/kg) (C), observado tanto em corte transversal quanto longitudinal, a preservação das fibras e dos núcleos. Coloração H&E. Barras representam 20 μ M (A e C) e 50 μ M (B).

O exame histológico do controle (Fig. 17A) revelou microarquitetura hepática preservada, com visualização da veia centro lobular e hepatócitos dispostos em cordões, separados por capilares sinusoides,

Nos tratamentos realizados com DSS (Fig. 17B), CQ (Fig. 17C) e β -Lap (Fig. 17D), verificou-se tumefação dos hepatócitos. Já nos tratamentos realizados com as combinações CQ:DSS (Fig. 17E) e β -Lap:DSS (Fig. 17F) verifica-se preservação dos hepatócitos, com discreta tumefação quando comparados aos tratamentos com as substâncias isoladas.

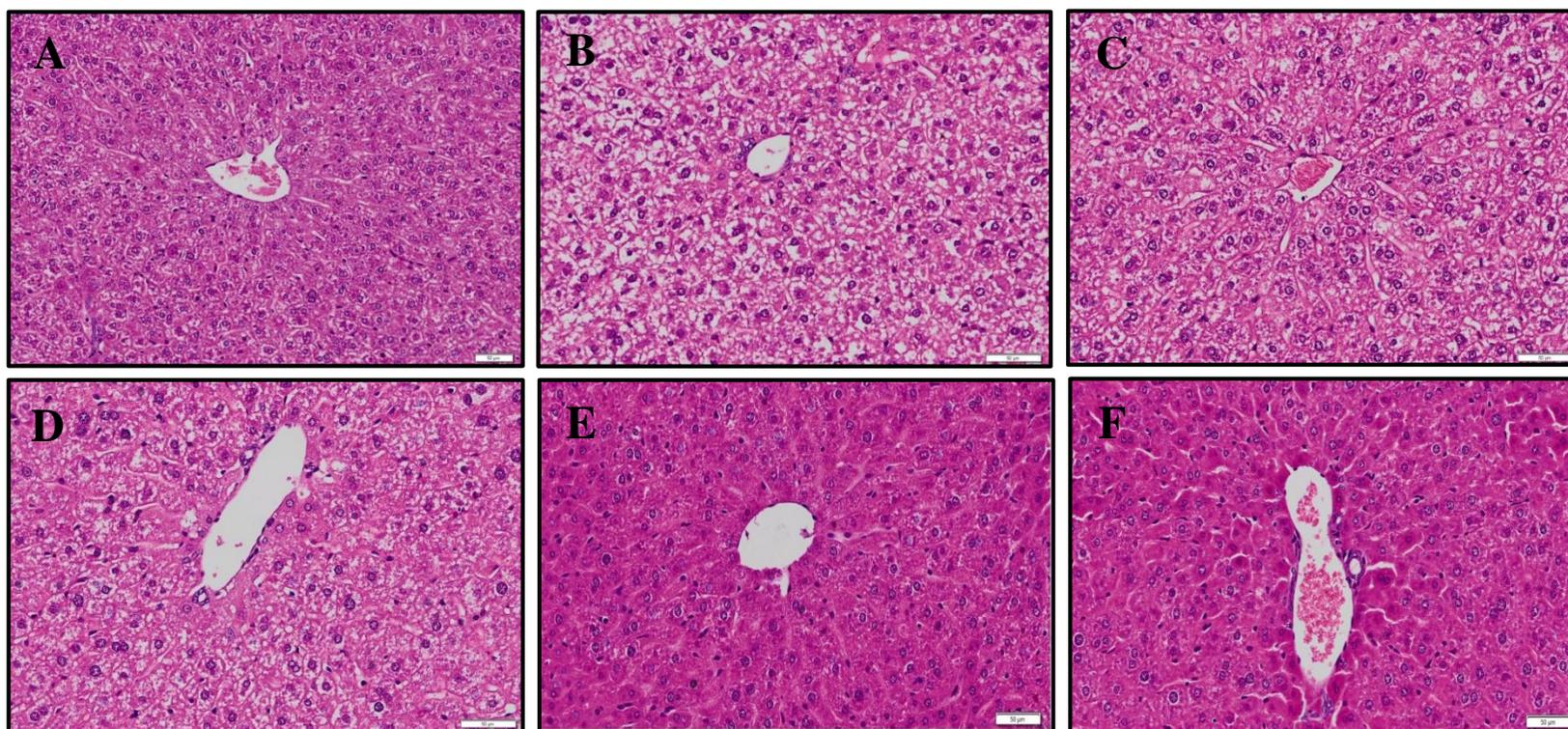


Figura 17. Fotomicrografias do fígado de camundongos linhagem C57Bl/6. Tratamentos realizados por 5 dias, de DSS, CQ, β -Lap, CQ:DSS e β -Lap:DSS. Controle (Cremofor 5% e DMSO 2%) (A), arquitetura hepática preservada. Veia centro lobular e hepatócitos íntegros. DSS (60 mg/kg) (B), CQ (60 mg/kg) (C) e β -Lap (10 mg/kg) (D), hepatócitos tumefeitos. CQ:DSS (60:60 mg/kg) (E) e β -Lap:DSS (60:60 mg/kg) (F), notar preservação dos hepatócitos em comparação com as substâncias isoladas. Coloração H&E. Barras representam 50 μ M.

Nas análises histológicas dos rins observa-se na região cortical, os corpúsculos renais constituídos pela cápsula de Bowman e os glomérulos de Malpighi, assim como túbulos contorcidos proximal e distal sem aparente alteração morfológica, exceto pela dilatação de alguns dos túbulos renais (pontas de seta).

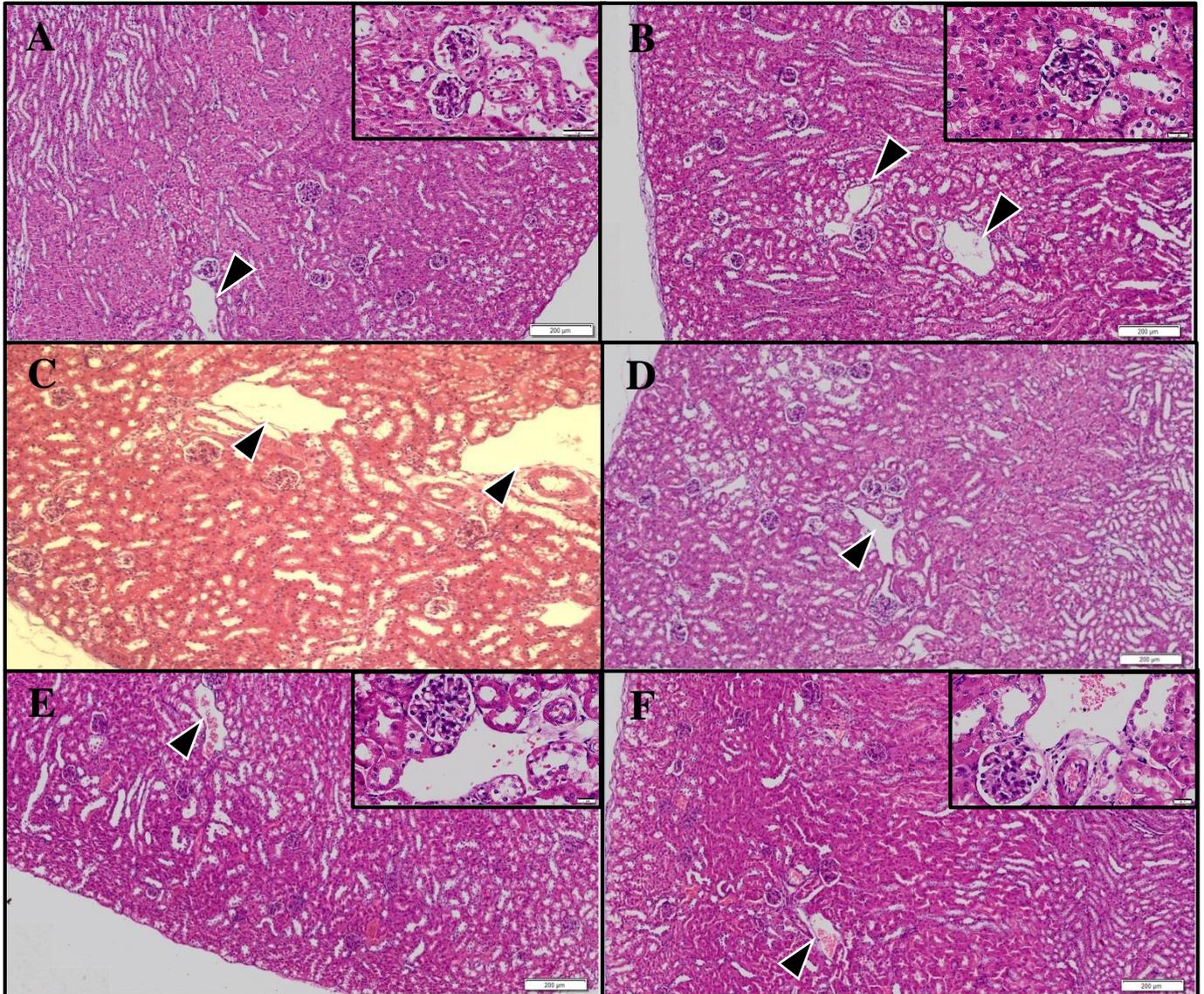


Figura 18. Fotomicrografias do rim de camundongos linhagem C57Bl/6. Tratamentos realizados por 5 dias, de DSS, CQ, β -Lap, CQ:DSS e β -Lap:DSS. Controle (Cremofor 5% e DMSO 2%) (A); DSS (60 mg/kg) (B), CQ (60 mg/kg) (C); β -Lap (10 mg/kg) (D); CQ:DSS (60:60 mg/kg) (E) e β -Lap:DSS (60:60 mg/kg) (F), notar nos tratamentos, dilatação de túbulos renais (pontas de seta) e preservação dos glomérulos (in set). Coloração H&E. Barras representam 200 μ M.

6 DISCUSSÃO

Apesar das novas terapias desenvolvidas nas últimas décadas, o melanoma ainda é uma doença que provoca a morte da grande maioria dos pacientes. Na tentativa de melhorar a resposta de terapias atuais procuramos abordar o emprego da combinação de produtos naturais e semi-sintéticos que desempenham papel importante no tratamento do câncer. Por se tratarem de produtos naturais bem tolerados e já em uso para outros agravos, espera-se que essas combinações resultem em diminuição dos efeitos colaterais e possam ainda reduzir a resistência aos tratamentos em monoterapia.

Assim, este estudo utiliza critérios muito importantes para a pesquisa de novos fármacos, como o uso de produtos naturais e o reposicionamento de fármacos. A literatura demonstra que as substâncias derivadas de produtos naturais tendem a apresentar baixa toxicidade e maior tolerância ainda que em altas concentrações, além de apresentar inúmeras vantagens tais como sua ampla diversidade de estruturas químicas e atividades biológicas (ABD EL-HADY et al., 2017), e o reposicionamento de fármacos que permite o conhecimento prévio de fatores de segurança, e dessa forma oferece vantagens como menor tempo para desenvolvimento e menor custo para pesquisa (GRAMMER; LIPSKY, 2017).

Uma vez que inúmeros fármacos existentes já foram amplamente estudados e seus perfis de farmacocinética e segurança, muitas vezes já foram aprovadas por agências regulatórias para uso humano, como observado no trabalho de Rangwala (2014) com a hidroxicloroquina em combinação com temozolomida, que se encontra em ensaio clínico de fase I em pacientes com tumores sólidos e melanoma, pode ser avaliado rapidamente e passar para ensaios de fase II.

Como o câncer é causado por uma complexa cadeia de eventos, os tratamentos em combinação podem fornecer uma resposta mais eficaz (HAO et al., 2015). Sendo assim, neste estudo demonstramos que as combinações CQ:DETC e β -Lap:DETC inibem a proliferação de células de melanoma murinho B16F10 e apesar de não apresentar elevada seletividade *in vitro*, verificou-se que são necessárias menores concentrações das substâncias combinadas que isoladas para se obter o mesmo efeito e que as mesmas se mostraram sinérgicas, além de se observar baixa toxicidade nos estudos *in vivo*.

As análises por citometria de fluxo revelaram que os efeitos citotóxicos do DETC envolvem a produção de ERO e indução da apoptose (MORRISON et al., 2010; CHIBA et al., 2014), tal qual observado após o tratamento com a CQ (SOLOMON; LEE, 2009) e a β -Lap

(BANG et al., 2016; BERMEJO et al., 2016), assim verificamos que esse efeito se potencializa quando as substâncias estão em combinação. Então, nossos resultados indicam que o estresse oxidativo celular é reforçado pela combinação de CQ:DETC assim como β -Lap:DETC, o que poderia levar à maior eficácia na morte de células tumorais.

O DSS não atua apenas como um inibidor de aldeído desidrogenase no tratamento de alcoolismo, mas também potencializa o efeito de muitos agentes quimioterapêuticos (HUANG et al., 2016), especialmente pela inibição da Pgp (SAUNA; SHUKLA; AMBUDKAR, 2005). Em nosso estudo, verificamos que o DETC (metabólito do DSS) potencializou o efeito das combinações supracitadas melhorando sinergicamente a citotoxicidade das substâncias, levando à morte celular *in vitro* por aumento da produção de ERO e consequentemente a indução da apoptose. Esse aumento da produção de ERO observado nos tratamentos com DETC, corrobora os achados na literatura que demonstram que esta molécula atua como complexador de Cu^{2+} com inativação da enzima SOD, impedindo sua capacidade antioxidante, e portanto, resultando em aumento do estresse oxidativo (BRAR et al., 2004; GESSNER; GESSNER, 2012).

Estudos têm demonstrado que os efeitos supressores tumorais da β -Lap podem ser modulados pela produção de ERO intracelular (BERMEJO et al., 2016). Assim, o DSS e seus metabólitos demonstram capacidade de promover um ambiente pró-oxidativo em células tumorais (JIAO et al., 2017). Desta forma, não é surpreendente que a combinação de DETC e β -Lap provoque estresse oxidativo significativamente maior.

O aumento da produção de ERO nas células incubadas com β -Lap pode atingir de forma mais conspícua as mitocôndrias, uma vez que esta apresenta função redox com ação pró-oxidante e cerca de 1-3% do oxigênio que ingressa na organela é convertido em $\text{O}_2^{\cdot-}$ (ORRENIUS; GOGVADZE; ZHIVOTOVSKY, 2007). Assim sendo, a geração de ERO mediada por β -Lap pode exaurir o 'pool' citoplasmático de glutathione reduzida em taxas superiores à ação de enzimas como a glutathione redutase. Desta forma as mitocôndrias podem sofrer lesões ocasionadas por ERO endógenas bem como derivados da β -Lap.

De forma análoga produtos de oxidação enzimática da espermina em combinação com a CQ, leva à redução da eletrondensidade da matriz mitocondrial (AGOSTINELLI et al., 2014). Um antagonista pró-oxidante de vias de poliaminas, que são moléculas importantíssimas na biologia dos parasitas (VANNIER-SANTOS; SUAREZ-FONTES, 2017), também produzem

danos em organelas de função redox de protozoários como *Trichomonas foetus* (REIS et al., 1999), *Leishmania amazonensis* (VANNIER-SANTOS et al., 2008) e *Trypanosoma cruzi* (REIGADA et al., 2017).

Nesse sentido, a detecção de radicais superóxidos nos grupos tratados com as substâncias isoladas ou em combinação podem estar elevando a produção das ERO, seja de forma direta pela ação da β -Lap, ou indireta, pelo bloqueio da autofagia promovido pela CQ e pela inibição do sistema antioxidante ocasionado pelo DETC. Vale salientar que a marcação pela sonda DHE indica a produção de superóxido (LEE; PARK; CHUN, 2017).

O aumento do estresse oxidativo, ocasionado pelas ERO em células tumorais, podem torná-las vulneráveis a estímulos apoptóticos e aumentar a citotoxicidade para fármacos antitumorais (SIMON; HAJ-YEHIA; LEVI-SCHAFFER, 2000; CIRCU; AW, 2010). Isso pode justificar os nossos achados, observados nas células tratadas tanto com as substâncias isoladas quanto combinadas, onde verificou-se que as células se mostraram mas expressivamente marcadas para de Anexina V-FITC, corroborando a evidência de que a via apoptótica é induzida após estímulo de ERO. Esse resultado também é demonstrado quando as ações dos compostos, analisados de forma individualizada, apresentam perfil pró-apoptótico em estudos com a β -Lap (BIAN et al., 2017), a CQ (WIEDMER et al., 2017) e o DETC, ou disulfiram (CEN et al., 2004).

Como as células tumorais podem evitar a morte através da autofagia, um mecanismo de sobrevivência utilizado por estas, sob situações de estresse metabólico (RYABAYA et al., 2016), então a CQ, um composto lisossomotrópico bem conhecido, acumula-se em lisossomas e endossomas, inibindo essa atividade (SOLOMON; LEE, 2009; DUFFY et al., 2015), levando à deflagração de morte celular por apoptose.

As propriedades lisossomotrópicas da CQ são provavelmente responsáveis por vários dos seus efeitos biológicos e entre estes, a de sensibilizar as células cancerosas para os efeitos citotóxicos de agentes quimioterapêuticos (AGOSTINELLI et al., 2014). Sugere-se que as variações no pH, produzidas pela CQ, possam ser exploradas por apresentar seletividade para tumores sólidos, já que esses tumores muitas vezes se desenvolvem em um ambiente extracelular ácido (SOLOMON; LEE, 2009). Analogamente, o DSS tem a capacidade de inibir a atividade de ATPase vacuolar em *Saccharomyces cerevisiae* (JOHNSON et al., 2010). Embora

a atividade não tenha sido relatada em células de mamíferos, sabe-se que são enzimas bem conservadas evolutivamente.

Assim, esse efeito proporcionado pela ação da CQ, que atua alcalinizando compartimentos acídicos como lisossomas e endossomas tardios, pode se tornar uma estratégia bastante promissora para melhorar a terapia antitumoral através da inibição da autofagia (MAES et al., 2014; TOWERS; THORBURN, 2016).

Nesse sentido, as alterações ultraestruturais observadas por microscopia eletrônica de transmissão no nosso estudo podem sugerir evidências das propriedades lisossomotrópicas da CQ. As modificações observadas após a exposição das células a CQ seja isolada ou em combinação com DETC, demonstram a formação de numerosos vacúolos com conteúdos membranares, presumivelmente de natureza autofágica. Trabalhos sugerem que a modalidade combinada de CQ com outros agentes, são muito promissores para o aumento da eficácia terapêutica e diminuição de efeitos colaterais indesejáveis (SOLOMON; LEE, 2009; ZHANG et al., 2017). Além disso, o DSS pode ser utilizado em associação com radioterapia, uma vez que o fármaco é radiosensibilizador (LEE et al., 2017).

Sabendo-se que a liberação de enzimas lisossomais causam estresse oxidativo (DEGTYAREV et al., 2008; WANG et al., 2011), o aumento deste estresse pela exposição subsequente das células a estes radicais livres, com a ação conjunta do DETC, que atua inibindo enzimas importantes do sistema antioxidante, poderia explicar o aumento da citotoxicidade observada em nossos experimentos.

Foram observadas por microscopia eletrônica de transmissão que células de melanoma tratadas com a IC_{50} da CQ, induziu alterações ultraestruturais com a formação de grandes autofagossomos contendo estruturas membranares multilamelares. Quando tratadas com a IC_{50} da combinação CQ:DETC, as mesmas células apresentaram, além da formação dos vacúolos, mudanças na estrutura mitocondrial, como dilatação das cristas e a interrupção das membranas. Essas observações confirmaram a susceptibilidade destas células à exposição com essa substância tanto isolada quanto combinada. Células tronco cancerígenas tratadas com CQ também apresentaram alterações ultraestruturais dilatação das cristas mitocondriais em modelo de células tumorais com mutações em BRCA-1 (LIANG et al., 2016).

A presença de acúmulos lipídicos luminiais em cisternas de retículo endoplasmático de células incubadas com a combinação β -Lap:DETC indica a formação de gotículas ou inclusões

lipídicas citoplasmáticas (FUJIMOTO; PARTON, 2011). No passado, estas estruturas eram interpretadas simplesmente como sítios de armazenamento energético, mas recentemente são reconhecidos papéis complexos, incluindo etapas da resposta imunológica (SAKA; VALDIVIA, 2012) e inflamatória (BOZZA et al., 2011; MELO et al., 2011; MELO; DVORAK, 2012; MELO; WELLER, 2016), podendo desempenhar papéis relevantes em diferentes infecções (SAKA; VALDIVIA, 2012) entre outras entidades nosológicas (GROSS; SILVER, 2014; ONAL et al., 2017).

Trabalhos recentes têm demonstrado a relação entre os níveis celulares de gotículas lipídicas e seu papel na oncogênese. Sugere-se que a inibição de enzimas lipogênicas tais como ácido graxo sintase e acetil-CoA carboxilase, são capazes de promover a diferenciação e inibir o crescimento de diferentes tumores (GIAMPIETRI et al., 2017), como se observa em células de câncer colorretal, que apresentam aumentados níveis de inclusões lipídicas e esse fato está associado à capacidade oncogênica (TIRINATO et al., 2015).

Gotículas lipídicas são organelas contendo triglicerídeos e a lipólise destas, contribui para o metabolismo celular. Esses triglicerídeos armazenados, podem ser hidrolisados por lipases citosólicas ou por lipases ácidas lisossomais através da via autofágica, um processo específico denominado lipofagia. Tal mecanismo pode explicar, ao menos em parte, regulação da via autofágica por inclusões lipídicas demonstrada previamente (VELAZQUEZ; GRAEF, 2016; VELAZQUEZ et al., 2016), podendo, inclusive prover lipídeos para a geração de membranas dos autofagosomos (DUPONT et al., 2014).

Os depósitos lipídicos formados em RE após o tratamento com a combinação β -Lap:DETC pode estar envolvido na formação e/ou regulação da biogênese dos vacúolos, bem como reciclar moléculas danificadas pelas ERO. Uma vez que DETC modula negativamente a enzima SOD (HOGARTH, 2012), o tratamento com este composto impede a detoxificação de $O_2^{\cdot-}$, presumivelmente ocasionando aumentados efeitos de estresse oxidativo, principalmente nas células cancerosas. Essas gotículas podem proteger as células tumorais dos efeitos tóxicos das ERO, além da sua participação na homeostase lipídica (GIAMPIETRI et al., 2017).

Apesar de estudos demonstrarem neurotoxicidade, associada a lesões cerebrais e dificuldades motoras, induzidas pelo uso crônico do disulfiram em altas concentrações (VIQUEZ et al., 2007; SANTOS; MARTINS CAMPOS; MORAIS, 2017), não foi verificado danos no tecido cerebral dos animais tratados com as combinações CQ:DSS e β -Lap:DSS. Em

uma pesquisa de fase I, realizada por Huang e colaboradores (2016), que combinou o DSS com temozolomida para o tratamento de glioblastoma, verificou-se que dentro das principais toxicidades neurológicas apresentadas em seu estudo (fadiga, delírio, ataxia, tonturas, e neuropatias periféricas motoras/sensoriais), foram resolvidas trinta dias após a descontinuação do DSS. Isso sugere que essa toxicidade pode ser revertida sem lesões permanentes, após a suspensão do tratamento.

A doxorrubicina é um fármaco que está entre os quimioterápicos utilizados no tratamento de diferentes neoplasias malignas, especialmente tumores sólidos, leucemias e linfomas. Entretanto, possui valor clínico limitado em função de sua cardiotoxicidade (LUDKE et al., 2017; PIOTROWSKA; ISALAN; MIELCAREK, 2017). Por essa razão, retiramos o coração dos camundongos tratados com as combinações a fim de verificar se esse era um efeito colateral associado a estas. Entretanto, verificamos que tanto a combinação CQ:DETC quanto β -Lap:DETC não alteraram morfológicamente os cardiomiócitos.

A toxicidade hepática causada pela β -Lap pode ser explicada pela deficiência de NQO1, já que os hepatócitos não sintetizam esta enzima, além da baixa solubilidade aquosa e lenta taxa de dissolução no peritônio (BERMEJO et al., 2016). Entretanto, podemos verificar que quando a β -Lap foi combinada com o DSS, apresentou efeito protetor quando comparado as substâncias ministradas isoladamente e o mesmo efeito foi observado quando o DSS foi combinado com a CQ.

No estudo realizado por Jamshidzadeh e colaboradores (2007), foi demonstrado dano hepatocelular em ratos tratados com CQ. A CQ é metabolizada em microssomas hepáticos pela enzima citocromo P450 e para tal, utiliza glutatona reduzida. Como a glutatona reduzida desempenha um papel importante de defesa nos hepatócitos, o esgotamento desta, deixaria as células mais vulneráveis ao dano oxidativo resultando em morte celular. Isso pode justificar os danos hepáticos observados no tratamento realizado com a CQ isolada.

Na literatura da década de 80 e 90 foi relatado que o uso do DSS estaria entre as causas mais comuns de lesão hepática aguda e insuficiência hepática (U.S. National Library of Medicine, 2011). Entretanto, esses danos sugeridos, foram verificados apenas quando o DSS foi ministrado de forma isolada mas não nas combinações. Isso pode sugerir que as combinações com o DSS estão exercendo efeito protetivo sobre os hepatócitos.

A terapia crônica com DSS está associada a discretas elevações de aminotransferases sérica em até 25% dos pacientes, mas elevações acima de 3 vezes o limite superior, normalmente ocorre em 4% dos pacientes (U.S. National Library of Medicine, 2011). Nossos resultados demonstram que não houve alterações significativas nas dosagens séricas de AST e ALT. Entretanto, na análise do tratamento com a CQ isolada, verificou-se discreta elevação de AST e ALT em relação ao controle, assim como para o tratamento com DSS isolado, no qual se verifica discreto aumento de ALT em relação ao controle.

Como as aminotransferases ALT e AST são dois dos marcadores confiáveis de lesão hepatocelular, seus níveis podem ser elevados em uma variedade de distúrbios hepáticos. O AST tem formas citossólicas e mitocondriais e está presente nos tecidos hepático, cardíaco, muscular esquelético, renal, cerebral, pancreático, pulmonar, nos eritrócitos e leucócitos. Acredita-se que ALT seja mais específico para lesões hepáticas, porque está presente principalmente no citossol de hepatócitos e, em baixas concentrações, em outros locais (SCHUMANN et al., 2011), isso pode explicar a discreta elevação deste marcador no tratamento com DSS e CQ isolados, já que pode se observar na histopatologia hepática desses tratamentos, que houve danos aos hepatócitos.

O rim é muito suscetível a danos provocados por fármacos ou toxinas devido à sua maior perfusão e ao aumento da concentração de compostos excretados que ocorrem em células tubulares renais durante a absorção e secreção (KIMURA et al., 2013). A determinação da ureia e da creatinina sérica é de grande valor para verificação da função renal. Sabe-se que a diminuição da filtração glomerular, de forma geral, leva ao aumento das concentrações plasmáticas de creatinina e ureia. No entanto, apesar de se observar dilatação de túbulos renais, não houve aumento da ureia em nenhum dos tratamentos ministrados isolados e nem combinados.

Nos tratamentos realizados com a CQ isolada e combinada com DSS, foi observado dilatação dos túbulos renais sem alteração dos glomérulos. Como a CQ geralmente se acumula em vários órgãos e sua eliminação é lenta, acredita-se que é possível que ela exerça ação direta ou indireta sobre o sistema antioxidante, tornando certos órgãos, como o rim, mais suscetíveis aos efeitos do estresse oxidativo (MURUGAVEL; PARI, 2004).

A mesma dilatação dos túbulos renais se observa no tratamento realizado com a β -Lap isolada e combinada com o DSS. Entretanto, em um estudo realizado pelo grupo do Almeida

(2009) sobre a toxicologia da Beta-Lapachona em órgãos, não foi observada nenhuma alteração, nem nas análises bioquímicas e nem nas análises histopatológicas dos rins dos animais testados, apesar de, neste estudo supracitado, o grupo tenha utilizado concentrações da β -Lap, maiores do que as utilizadas em nosso estudo. Como esta dilatação dos túbulos renais também foi observada no grupo controle, que foi tratado com DMSO e cremofor, isso pode sugerir que essa combinação esteja causando citotoxicidade e este efeito seja potencializado pelo uso das substâncias isoladas.

7 CONCLUSÕES

As substâncias testadas demonstraram ação citotóxica em melanoma murino *in vitro*, com baixa toxicidade sistêmica *in vivo*. Nosso estudo demonstrou que as substâncias, quando combinadas, se mostraram sinérgicas e seletivas em relação a célula de mamífero usada na pesquisa.

As alterações ultraestruturais observadas por microscopia eletrônica corroboram os mecanismos de ação encontrados em literatura recente sobre os efeitos pro-oxidativos e inibidor de autofagia dos compostos testados, que se confirmam pela presença de radicais superóxidos e pela predominante morte apoptótica das células testadas.

Originalmente utilizados nos tratamentos de outros agravos, tanto o DETC, quanto a CQ e a β -Lap vem sendo relatados com propriedades anti-tumorais e sendo assim, oferecem potencial estratégia para o tratamento de câncer uma vez que ambas substâncias já estão em uso clínico. Portanto, os resultados indicam que o DETC, a CQ e a β -Lap, quando utilizados em combinação são candidatos promissores à se tornar um novo método terapêutico para o tratamento do melanoma. Contudo, mais experimentos são necessários para elucidar outros mecanismos de ação.

REFERÊNCIAS

- ABD EL-HADY, F. K. et al. Comparative correlation between chemical composition and cytotoxic potential of the coral-associated fungus *aspergillus* sp. 2c1-egy against human colon cancer cells. **Curr. Microbiol.**, v., n., p., 2017.
- AGOSTINELLI, E. et al. The combined treatment with chloroquine and the enzymatic oxidation products of spermine overcomes multidrug resistance of melanoma m14 adr2 cells: A new therapeutic approach. **Int. J. Oncol.**, v. 45, n. 3, p. 1109-1122, 2014.
- ALMEIDA, E. R. de et al. Toxicological assessment of beta-lapachone on organs from pregnant and non-pregnant rats. **Phytother Res.**, v. 23, n. 9, p. 1276-1280, 2009.
- AMARAVADI, R. K. et al. Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a myc-induced model of lymphoma. **J. Clin. Invest.**, v. 117, n. 2, p. 326-336, 2007.
- ANJOS, D. O. dos et al. Effects of a novel beta-lapachone derivative on *trypanosoma cruzi*: Parasite death involving apoptosis, autophagy and necrosis. **Int. J. Parasitol. Drug Resist.**, v. 6, n. 3, p. 207-219, 2016.
- ARMSTRONG, A. W. **Advances in malignant melanoma – clinical and research perspectives**. Intech, 2011
- BANG, W. et al. Beta-lapachone suppresses the proliferation of human malignant melanoma cells by targeting specificity protein 1. **Oncol. Rep.**, v. 35, n. 2, p. 1109-1116, 2016.
- BEGIC, A. et al. Disulfiram moderately restores impaired hepatic redox status of rats subchronically exposed to cadmium. **J. Enzyme Inhib. Med. Chem.**, v. 32, n. 1, p. 478-489, 2017.
- BERMEJO, M. et al. Enhancing oral absorption of beta-lapachone: Progress till date. **Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet**, v., n., p., 2016.
- BIAN, J. et al. Discovery of quinone-directed antitumor agents selectively bioactivated by nqo1 over cpr with improved safety profile. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 129, n., p. 27-40, 2017.
- BORDEN, E. C. **Melanoma: Biologically targeted therapeutics**. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2002. 389 p.
- BOZZA, P. T. et al. Lipid body function in eicosanoid synthesis: An update. **Prostagl. Leukot Essent Fatty Acids**, v. 85, n. 5, p. 205-213, 2011.
- BRAR, S. S. et al. Disulfiram inhibits activating transcription factor/cyclic amp-responsive element binding protein and human melanoma growth in a metal-dependent manner in vitro, in mice and in a patient with metastatic disease. **Mol. Cancer Ther.**, v. 3, n. 9, p. 1049-1060, 2004.
- BRASIL, Ministério da Saúde. INCA. Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp?ID=2>. Acesso em: 26 fev 2017.

BRASIL, Ministério da Saúde. DATASUS. Disponível em <https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/pages/Modelo03/consultar.xhtml#panelResultado>. Acesso em: 27 jul 2017.

BURIKHANOV, R. et al. Chloroquine-inducible par-4 secretion is essential for tumor cell apoptosis and inhibition of metastasis. **Cell. Rep.**, v. 18, n. 2, p. 508-519, 2017.

CASTRO, S. L. de; EMERY, F. S.; SILVA JUNIOR, E. N. da. Synthesis of quinoidal molecules: Strategies towards bioactive compounds with an emphasis on lapachones. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 69, n., p. 678-700, 2013.

CEN, D. et al. Disulfiram facilitates intracellular cu uptake and induces apoptosis in human melanoma cells. **J. Med. Chem.**, v. 47, n. 27, p. 6914-6920, 2004.

CHIBA, T. et al. Disulfiram eradicates tumor-initiating hepatocellular carcinoma cells in ros-p38 mapk pathway-dependent and -independent manners. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e84807, 2014.

CHOI, A. R. et al. Anti-malarial drugs primaquine and chloroquine have different sensitization effects with anti-mitotic drugs in resistant cancer cells. **Anticancer Res.**, v. 36, n. 4, p. 1641-1648, 2016.

CHOU, T. C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. **Pharmacol. Rev.**, v. 58, n. 3, p. 621-681, 2006.

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

COLETTA, R. D. et al. Six1 overexpression in mammary cells induces genomic instability and is sufficient for malignant transformation. **Cancer Res.**, v. 68, n. 7, p. 2204-2213, 2008.

DEGTYAREV, M. et al. Akt inhibition promotes autophagy and sensitizes pten-null tumors to lysosomotropic agents. **J. Cell Biol.**, v. 183, n. 1, p. 101-116, 2008.

DIVAC RANKOV, A. et al. Targeting autophagy to modulate cell survival: A comparative analysis in cancer, normal and embryonic cells. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 148, n. 5, p. 529, 2017.

DUFFY, A. et al. Autophagy modulation: A target for cancer treatment development. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 75, n. 3, p. 439-447, 2015.

DUPONT, N. et al. Neutral lipid stores and lipase pnpla5 contribute to autophagosome biogenesis. **Curr. Biol.**, v. 24, n. 6, p. 609-620, 2014.

FINN, L.; MARKOVIC, S. N.; JOSEPH, R. W. Therapy for metastatic melanoma: The past, present, and future. **BMC Med.**, v. 10, n., p. 23, 2012.

FISHER, S. J.; SWAAN, P. W.; EDDINGTON, N. D. The ethanol metabolite acetaldehyde increases paracellular drug permeability in vitro and oral bioavailability in vivo. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 332, n. 1, p. 326-333, 2010.

FRUEHAUF, J. P.; TRAPP, V. Reactive oxygen species: An achilles' heel of melanoma? **Expert Rev. Anticancer Ther.**, v. 8, n. 11, p. 1751-1757, 2008.

FU, Y. et al. The reverse warburg effect is likely to be an achilles' heel of cancer that can be exploited for cancer therapy. **Oncotarget**, v. 8, n. 34, p. 57813-57825, 2017.

FUJIMOTO, T.; PARTON, R. G. Not just fat: The structure and function of the lipid droplet. **Cold. Spring Harb. Perspect. Biol.**, v. 3, n. 3, p., 2011.

GAJEWSKI, T. F.; HODI, F. S. **Targeted therapeutics in melanoma**. New York: Humana Press, 2010. 377 p.

GESSNER, P. K.; GESSNER, T. **Disulfiram and its metabolite, diethyldithiocarbamate: Pharmacology and status in the treatment of alcoholism, hiv infections, aids and heavy metal toxicity**. Springer Science & Business Media, 2012

GIAMPIETRI, C. et al. Lipid storage and autophagy in melanoma cancer cells. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 18, n. 6, p., 2017.

GRAMMER, A. C.; LIPSKY, P. E. Drug repositioning strategies for the identification of novel therapies for rheumatic autoimmune inflammatory diseases. **Rheum Dis. Clin. North Am.**, v. 43, n. 3, p. 467-480, 2017.

GROSS, D. A.; SILVER, D. L. Cytosolic lipid droplets: From mechanisms of fat storage to disease. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, v. 49, n. 4, p. 304-326, 2014.

HAMBRIGHT, H. G.; GHOSH, R. Autophagy: In the crosshairs of cancer. **Biochem. Pharmacol.**, v. 126, n., p. 13-22, 2017.

HAN, X. et al. Chaetocin induces apoptosis in human melanoma cells through the generation of reactive oxygen species and the intrinsic mitochondrial pathway, and exerts its anti-tumor activity in vivo. **PLoS One**, v. 12, n. 4, p. e0175950, 2017.

HAO, M. et al. Advances in targeted therapy for unresectable melanoma: New drugs and combinations. **Cancer Lett.**, v. 359, n. 1, p. 1-8, 2015.

HAYAT, M. A. **Autophagy cancer, other pathologies, inflammation, immunity, infection, and aging**. New Jersey: Elsevier, 2014. 294 p.

HEARING, V. J.; LEONG, S. P. L. **From melanocytes to melanoma: The progression to malignancy**. New Jersey: Humana, 2006. 678 p.

HOGARTH, G. Metal-dithiocarbamate complexes: Chemistry and biological activity. **Mini Rev. Med. Chem.**, v. 12, n. 12, p. 1202-1215, 2012.

HU, X.; SHI, S.; WANG, H. Blocking autophagy improves the anti-tumor activity of afatinib in lung adenocarcinoma with activating egfr mutations *in vitro* and *in vivo*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 4559, 2017.

HUANG, H. et al. Two clinical drugs deubiquitinase inhibitor auranofin and aldehyde dehydrogenase inhibitor disulfiram trigger synergistic anti-tumor effects *in vitro* and *in vivo*. **Oncotarget**, v. 7, n. 3, p. 2796-2808, 2016.

ICHIMURA, Y. et al. Phosphorylation of p62 activates the keap1-nrf2 pathway during selective autophagy. **Mol. Cell**, v. 51, n. 5, p. 618-631, 2013.

ISHAI-MICHAELI, R.; ELDOR, A.; VLODAVSKY, I. Heparanase activity expressed by platelets, neutrophils, and lymphoma cells releases active fibroblast growth factor from extracellular matrix. **Cell Regul.**, v. 1, n. 11, p. 833-842, 1990.

ISHAQ, M. et al. Atmospheric gas plasma-induced ros production activates tnf-ask1 pathway for the induction of melanoma cancer cell apoptosis. **Mol. Biol. Cell**, v. 25, n. 9, p. 1523-1531, 2014.

JAMSHIDZADEH, A.; NIKNAHAD, H.; KASHAFI, H. Cytotoxicity of chloroquine in isolated rat hepatocytes. **J. Appl. Toxicol.**, v. 27, n. 4, p. 322-326, 2007.

JANKU, F. et al. Autophagy as a target for anticancer therapy. **Nat. Rev. Clin. Oncol.**, v. 8, n. 9, p. 528-539, 2011.

JIAO, Y. et al. Docosahexaenoic acid and disulfiram act in concert to kill cancer cells: A mutual enhancement of their anticancer actions. **Oncotarget**, v., n., p., 2017.

JOHNSON, R. M. et al. Identification of inhibitors of vacuolar proton-translocating atpase pumps in yeast by high-throughput screening flow cytometry. **Anal. Biochem.**, v. 398, n. 2, p. 203-211, 2010.

KAWANISHI, S. et al. Oxidative and nitrative DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation-related carcinogenesis. **Biol. Chem.**, v. 387, n. 4, p. 365-372, 2006.

KIMURA, T. et al. Chloroquine in cancer therapy: A double-edged sword of autophagy. **Cancer Res.**, v. 73, n. 1, p. 3-7, 2013.

KONGARA, S.; KARANTZA, V. The interplay between autophagy and ros in tumorigenesis. **Front Oncol**, v. 2, n., p. 171, 2012.

LEE, H. I.; PARK, B. R.; CHUN, S. W. Reactive oxygen species increase neuronal excitability via activation of nonspecific cation channel in rat medullary dorsal horn neurons. **Korean J. Physiol. Pharmacol.**, v. 21, n. 4, p. 371-376, 2017.

LEE, Y. E. et al. Repositioning disulfiram as a radiosensitizer against atypical teratoid/rhabdoid tumor. **Neuro Oncol.**, v., n., p., 2017.

LI, J. Z. et al. Mechanistic studies of cancer cell mitochondria- and nqo1-mediated redox activation of beta-lapachone, a potentially novel anticancer agent. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 281, n. 3, p. 285-293, 2014.

LIANG, D. H. et al. The autophagy inhibitor chloroquine targets cancer stem cells in triple negative breast cancer by inducing mitochondrial damage and impairing DNA break repair. **Cancer Lett.**, v. 376, n. 2, p. 249-258, 2016.

LOO, T. W.; BARTLETT, M. C.; CLARKE, D. M. Thapsigargin or curcumin does not promote maturation of processing mutants of the abc transporters, cfr, and p-glycoprotein. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 325, n. 2, p. 580-585, 2004.

LUDKE, A. et al. Time course of changes in oxidative stress and stress-induced proteins in cardiomyocytes exposed to doxorubicin and prevention by vitamin c. **PLoS One**, v. 12, n. 7, 2017.

LUO, Y. et al. Autophagy regulates ros-induced cellular senescence via p21 in a p38 mapkalpha dependent manner. **Exp. Gerontol.**, v. 46, n. 11, p. 860-867, 2011.

MAES, H. et al. How to teach an old dog new tricks: Autophagy-independent action of chloroquine on the tumor vasculature. **Autophagy**, v. 10, n. 11, p. 2082-2084, 2014.

MANAKOVA, K. et al. Cell surface mechanochemistry and the determinants of bleb formation, healing, and travel velocity. **Biophys. J.**, v. 110, n. 7, p. 1636-1647, 2016.

MARTIN, S.; DUDEK-PERIC, A. M.; GARG, A. D. An autophagy-driven pathway of atp secretion supports the aggressive phenotype of brafv600e inhibitor-resistant metastatic melanoma cells. **Autophagy**, v., n., p. 1-16, 2017.

MAYCOTTE, P. et al. Chloroquine sensitizes breast cancer cells to chemotherapy independent of autophagy. **Autophagy**, v. 8, n. 2, p. 200-212, 2012.

MELO, R. C. et al. Lipid bodies in inflammatory cells: Structure, function, and current imaging techniques. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 59, n. 5, p. 540-556, 2011.

MELO, R. C.; DVORAK, A. M. Lipid body-phagosome interaction in macrophages during infectious diseases: Host defense or pathogen survival strategy? **PLoS Pathog.**, v. 8, n. 7, p. e1002729, 2012.

MELO, R. C.; WELLER, P. F. Lipid droplets in leukocytes: Organelles linked to inflammatory responses. **Exp. Cell. Res.**, v. 340, n. 2, p. 193-197, 2016.

MEYSKENS, F. L., JR.; FARMER, P.; FRUEHAUF, J. P. Redox regulation in human melanocytes and melanoma. **Pigment. Cell Res.**, v. 14, n. 3, p. 148-154, 2001.

MORRISON, B. W. et al. Disulfiram induces copper-dependent stimulation of reactive oxygen species and activation of the extrinsic apoptotic pathway in melanoma. **Melanoma Res.**, v. 20, n. 1, p. 11-20, 2010.

MURUGAVEL, P.; PARI, L. Attenuation of chloroquine-induced renal damage by alpha-lipoic acid: Possible antioxidant mechanism. **Ren. Fail.**, v. 26, n. 5, p. 517-524, 2004.

ONAL, G. et al. Lipid droplets in health and disease. **Autophagy**, v. 16, n. 1, p. 128, 2017.

Organização Mundial da Saúde. Efeitos da radiação ultravioleta sobre a saúde. Disponível em http://www.who.int/uv/health/uv_health2/en/index1.html. Acesso em: 26 fev 2017.

ORRENIUS, S.; GOGVADZE, V.; ZHIVOTOVSKY, B. Mitochondrial oxidative stress: Implications for cell death. **Annu. Ver. Pharmacol. Toxicol.**, v. 47, n., p. 143-183, 2007.

PIOTROWSKA, I.; ISALAN, M.; MIELCAREK, M. Early transcriptional alteration of histone deacetylases in a murine model of doxorubicin-induced cardiomyopathy. **PLoS One**, v. 12, n. 6, p. e0180571, 2017.

QIAO, S. et al. The antimalarial amodiaquine causes autophagic-lysosomal and proliferative blockade sensitizing human melanoma cells to starvation- and chemotherapy-induced cell death. **Autophagy**, v. 9, n. 12, p. 2087-2102, 2013.

RANGWALA, R. et al. Phase i trial of hydroxychloroquine with dose-intense temozolomide in patients with advanced solid tumors and melanoma. **Autophagy**, v. 10, n. 8, p. 1369-1379, 2014.

REIGADA, C. et al. Trypanocidal effect of isotretinoin through the inhibition of polyamine and amino acid transporters in trypanosoma cruzi. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 11, n. 3, p. e0005472, 2017.

REIS, I. A. et al. Inhibition of polyamine synthesis arrests trichomonad growth and induces destruction of hydrogenosomes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 43, n. 8, p. 1919-1923, 1999.

RUDDON, R. W. **Cancer biology**. Fourth Edition: Oxford University Press, 2007.

RYABAYA, O. O. et al. Autophagy inhibitors chloroquine and ly294002 enhance temozolomide cytotoxicity on cutaneous melanoma cell lines in vitro. **Anticancer Drugs**, v. 28, n. 3, p.307-315, 2016.

SAKA, H. A.; VALDIVIA, R. Emerging roles for lipid droplets in immunity and host-pathogen interactions. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 28, n., p. 411-437, 2012.

SALIDO, G. M.; ROSADO, J. A. **Apoptosis: Involvement of oxidative stress and intracellular ca²⁺ homeostasis**. Cidade: Londres. Springer, 2009 .

SANTOS, T.; MARTINS CAMPOS, A.; MORAIS, H. Sensory-motor axonal polyneuropathy involving cranial nerves: An uncommon manifestation of disulfiram toxicity. **Clin. Neurol. Neurosurg.**, v. 152, n., p. 12-15, 2017.

SAUNA, Z. E.; SHUKLA, S.; AMBUDKAR, S. V. Disulfiram, an old drug with new potential therapeutic uses for human cancers and fungal infections. **Mol. Biosyst.**, v. 1, n. 2, p. 127-134, 2005.

- SCHUMANN, G. et al. Ifcc primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees c. Part 9: Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alkaline phosphatase international federation of clinical chemistry and laboratory medicine (ifcc) scientific division, committee on reference systems of enzymes (c-rse) (1). **Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 49, n. 9, p. 1439-1446, 2011.
- SELIMOVIC, D. et al. Vinblastine-induced apoptosis of melanoma cells is mediated by ras homologous a protein (rho a) via mitochondrial and non-mitochondrial-dependent mechanisms. **Apoptosis**, v. 18, n. 8, p. 980-997, 2013.
- SIMON, H. U.; HAJ-YEHIA, A.; LEVI-SCHAFFER, F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. **Apoptosis**, v. 5, n. 5, p. 415-418, 2000.
- SOLOMON, V. R.; LEE, H. Chloroquine and its analogs: A new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 625, n. 1-3, p. 220-233, 2009.
- TIRINATO, L. et al. Lipid droplets: A new player in colorectal cancer stem cells unveiled by spectroscopic imaging. **Stem Cells.**, v. 33, n. 1, p. 35-44, 2015.
- TOWERS, C. G.; THORBURN, A. Therapeutic targeting of autophagy. **EBio. Medicine.**, v., n., p., 2016.
- TRUEBA, G. P.; SANCHEZ, G. M.; GIULIANI, A. Oxygen free radical and antioxidant defense mechanism in cancer. **Front. Biosci.**, v. 9, n., p. 2029-2044, 2004.
- U.S. National Library of Medicine, National Institute of Diabetes and Digestive, and Kidney Diseases; 2011. Disponível em: <http://www.livertox.nlm.nih.gov/Disulfiram.htm>. Acesso em: 26 de julho 2017.
- VANNIER-SANTOS, M. A. et al. The putrescine analogue 1,4-diamino-2-butanone affects polyamine synthesis, transport, ultrastructure and intracellular survival in leishmania amazonensis. **Microbiology**, v. 154, n. Pt 10, p. 3104-3111, 2008.
- VANNIER-SANTOS, M. A.; SUAREZ-FONTES, A. M. Role of polyamines in parasite cell architecture and function. **Curr. Pharm. Des.**, v., n., p., 2017.
- VELAZQUEZ, A. P.; GRAEF, M. Autophagy regulation depends on er homeostasis controlled by lipid droplets. **Autophagy**, v. 12, n. 8, p. 1409-1410, 2016.
- VELAZQUEZ, A. P. et al. Lipid droplet-mediated er homeostasis regulates autophagy and cell survival during starvation. **J. Cell. Biol.**, v. 212, n. 6, p. 621-631, 2016.
- VIQUEZ, O. M. et al. Peripheral nerve protein expression and carbonyl content in n,n-diethyldithiocarbamate myelinopathy. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 20, n. 3, p. 370-379, 2007.
- WANG, Y. et al. Cglozoquine enhances the cytotoxicity of topotecan by inhibiting autophagy in lung cancer cells. **Chinese Journal of Cancer**, v. 30, n. 10, p. 690-700, 2011.
- WELSH, C. et al. Reduced levels of xpa, ercc1 and xpf DNA repair proteins in testis tumor cell lines. **Int. J. Cancer**, v. 110, n. 3, p. 352-361, 2004.

- WIEDMER, T. et al. Autophagy inhibition improves sunitinib efficacy in pancreatic neuroendocrine tumors via a lysosome-dependent mechanism. **Mol. Cancer Ther.**, v., n., p., 2017.
- XU, B. et al. Disulfiram/copper complex activated jnk/c-jun pathway and sensitized cytotoxicity of doxorubicin in doxorubicin resistant leukemia hl60 cells. **Blood Cells Mol. Dis.**, v. 47, n. 4, p. 264-269, 2011.
- YADAV, V. et al. Co-targeting braf and cyclin dependent kinases 4/6 for braf mutant cancers. **Pharmacol. Ther.**, v. 149, n., p. 139-149, 2015.
- YANG, Y. et al. Use of the disulfiram/copper complex for breast cancer chemoprevention in mmtv-erb2 transgenic mice. **Mol. Med. Rep.**, v. 12, n. 1, p. 746-752, 2015.
- YONEKAWA, T.; THORBURN, A. Autophagy and cell death. **Essays Biochem.**, v. 55, n., p. 105-117, 2013.
- ZHANG, Y. et al. Chloroquine (cq) exerts anti-breast cancer through modulating microenvironment and inducing apoptosis. **Int. Immunopharmacol.**, v. 42, n., p. 100-107, 2017.
- ZHOU, D. Z. et al. Dihydromyricetin induces apoptosis and cytoprotective autophagy through ros-nf-kappab signalling in human melanoma cells. **Free Radic. Res.**, v. 51, n. 5, p. 517-528, 2017.
- ZHOU, Y. et al. Lysosome-oriented, dual-stage ph-responsive polymeric micelles for beta-lapachone delivery. **J. Mater Chem. B. Mater Biol. Med.**, v. 4, n. 46, p. 7429-7440, 2016.