



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À
HEMATOLOGIA**



**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTICANCERÍGENA DE
COMPOSTOS NATURAIS E SEMISSINTÉTICOS CONTRA NEOPLASIAS
HEMATOLÓGICAS**

REGIANE COSTA DE OLIVEIRA

**MANAUS - AM
2020**

REGIANE COSTA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTICANCERÍGENA DE
COMPOSTOS NATURAIS E SEMISSINTÉTICOS CONTRA NEOPLASIAS
HEMATOLÓGICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia da Universidade do Estado do Amazonas, em convênio com a Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, HEMOAM, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Aplicadas à Hematologia.

Orientador: Dr. Gemilson Soares Pontes

MANAUS

2020

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

O48a	<p>Oliveira, Regiane Costa de Avaliação in vitro da atividade anticancerígena de compostos naturais e semissintéticos contra neoplasias hematológicas. / Regiane Costa de Oliveira. Manaus : [s.n], 2020. 87 f.: color.; 21 cm.</p> <p>Dissertação - Ciências Aplicadas à Hematologia - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2020. Inclui bibliografia Orientador: Pontes, Gemilson Soares</p> <p>1. fitoterápicos. 2. leucemias. 3. neoplasias. 4. bioprospecção. 5. biomoléculas. I. Pontes, Gemilson Soares (Orient.). II. Universidade do Estado do Amazonas. III. Avaliação in vitro da atividade anticancerígena de compostos naturais e semissintéticos contra neoplasias hematológicas.</p>
------	--

Elaborado por Jeane Macelino Galves - CRB-11/463

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 07/2020

1
2
3 Ao décimo dia do mês de julho do ano de 2020, às 14h00, realizou-se no Auditório, Bloco A, 2º
4 Andar – Fundação HEMOAM, sito Av. Constantino Nery, nº 4397 – Chapada, a Defesa de
5 Dissertação de Mestrado da aluna **Regiane Costa de Oliveira**, sob o título “**Avaliação In Vitro da**
6 **Atividade Anticancerígena de Compostos Naturais e Semissintéticos Contra Neoplasias**
7 **Hematológicas**”, tendo como orientador o Prof. Dr. **Gemilson Soares Pontes**, segundo
8 encaminhamento do Prof. Dr. Nelson Abraham Fraiji, Coordenador do Programa de Pós-Graduação
9 em Ciências Aplicadas a Hematologia e de acordo com os registros constantes na Secretaria Geral
10 da Universidade do Estado do Amazonas, a Banca julgadora foi composta pelos seguintes
11 componentes, que deram o parecer final sobre a Defesa, tendo sido atribuído ao aluno o conceito
12 discriminado no parecer da referida Comissão.

13
14

Membros	Parecer	Assinatura
Prof. Dr. Allyson Guimarães Costa - Presidente	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> Reprovado(a) <input type="checkbox"/>	Assinatura: <i>Allyson G. de Costa</i> CPF: 887.465.032-17
Prof. Dr. Marco Aurélio Sartim - UFAM	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> Reprovado(a) <input type="checkbox"/>	Assinatura: <i>Marco Aurélio Sartim</i> CPF: 110.928.507-48
Profª. Dra. Ceci Sales Campos - INPA	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> Reprovado(a) <input type="checkbox"/>	Assinatura: <i>Ceci Sales Campos</i> CPF: 076.956.932-72

15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

O parecer final da Defesa de Dissertação foi:

 Aprovado Não Aprovado

Allyson G. de Costa
Presidente da Banca Examinadora

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por guiar meus caminhos nos momentos que me sentia perdida, me dando força e coragem para enfrentar toda angústia e tristeza.

À minha mãe, Deusnete Alves, por todo amor, e apoio que sempre me transmitiu, pelos conselhos, e consolo nas horas que precisei. Ao meu irmão Regison Oliveira pelo companheirismo durante nossa jornada acadêmica/vida. Obrigada por me aturar sempre.

Ao meu melhor amigo, Alexandre Esteves, por sempre me apoiar e incentivar em todas as minhas escolhas. Obrigada por cada ligação que transmitia amor e força para não desistir nos momentos de angústias.

Ao meu orientador, Dr. Gemilson Pontes, que contribuiu muito para minha formação profissional. Obrigada por toda disponibilidade, suporte e ensinamentos que vem desde a graduação.

À prof. Dra. Anamika Dhyani, pela colaboração, profissionalismo, compreensão, conselhos e ensinamentos durante a execução desse trabalho.

Ao Dr. Andriy Grafov, coordenador do projeto H2020-MSCA-RISE-2016-734759-VAHVISTUS, por todo financiamento e fornecimentos dos compostos utilizados neste estudo.

À Emmily Mourão, Gleice Guerreiro e Aline Côrrea, pelos momentos alegres, pelos conselhos, apoio, por nunca me deixarem sozinha durante as madrugadas e finais de semanas de experimentos e principalmente pela amizade. São muito especiais pra mim!

À Paula Hariana Dantas, por todo suporte, companheirismo e auxílio no início da execução deste projeto.

Agradeço também a todos do laboratório de Virologia e Imunologia do INPA, Marlon Lyra, Daniele Furtado, Jean Melo, Carlos Eduardo Castro que de alguma forma ajudaram. Em especial o Gabriel Coutinho pelo auxílio nos experimentos.

Aos todos colegas do mestrado, por serem profissionais admiráveis, por compartilharem comigo experiências e conhecimentos durante as disciplinas. Em

especial ao Alex Leonardo, Melina Mello, Gisele Moreira, Lyliane Xabregas, Ivaldete Siqueira e Lilian Ferrari, por todo apoio e incentivos.

À Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - FHMOAM e à Universidade do Estado do Amazonas (UEA) por terem me proporcionado esse aperfeiçoamento de excelência.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pela bolsa de mestrado concedida.

À coordenação do Mestrado em Ciências Aplicadas à Hematologia, especialmente à Wilmara e Greissy pela disponibilidade e paciência.

Ao João Paulo Pimentel, por toda disponibilidade e suporte na realização dos ensaios do ciclo celular. Muito obrigada!

Ao Dr. Raimundo Junior, por ter aceitado fazer parte da banca na qualificação. Obrigada pelas contribuições.

Ao professor Dr. Allyson Guimarães, por ter aceitado fazer parte da banca na qualificação e defesa, por contribuir para a melhoria deste trabalho.

À Professora Dra. Ceci Sales, pelas contribuições na banca de qualificação e pela disponibilidade em aceitar participar da banca de defesa. Muito obrigada!

À Professora Dr. Marco Aurélio Sartim, agradeço pela disponibilidade de aceitar participar da banca e contribuir nesse projeto.

À todos que contribuíram para a realização desse projeto. Meus sinceros agradecimentos e gratidão!

RESUMO

As neoplasias hematológicas são um grupo heterogêneo de doenças originadas na medula óssea que apresentam como principais tumores de tecidos linfoides e hematopoiéticos as leucemias, linfomas e mielomas. Os principais tratamentos atuais incluem quimioterápicos e radioterapia. Contudo, a maioria destes tratamentos é de alto custo e resulta em intensos efeitos colaterais aos pacientes, o que demanda novas alternativas terapêuticas mais seguras e de melhor custo-benefício. Este estudo teve como objetivo principal investigar a atividade anticancerígena e imunomoduladora *in vitro* de compostos naturais e semissintéticos contra neoplasias hematológicas. Como foram utilizadas células mononucleadas normais do sangue periférico (PBMC) humanas, este projeto foi devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação HEMOAM, de acordo com as diretrizes preconizadas pela resolução 466/2012 do Ministério da Saúde. Primeiramente, PBMC e células Vero foram tratadas com diferentes concentrações dos seguintes compostos: B_r-Ell-SO₃Na, pirazoloisoquinolina, Z1 e Z2. A avaliação da citotoxicidade foi realizada por meio do teste MTT. Em seguida, foi investigada as atividades anticancerígena e imunomoduladora utilizando-se as linhagens celulares K562, HL-60 e U937. Todas as substâncias testadas apresentaram atividade anticancerígena, sem efeito citotóxico significativo contra células não cancerígenas. A substância que apresentou melhor atividade anticancerígena foi um derivado de zerumbona (Z1) que apresentou valor de IC₅₀ de 5.20µM em células HL-60. Em relação ao ciclo celular, foi observado que as substâncias Z1 e pirazoloisoquinolina induziram maior captura na fase G1 do ciclo celular, enquanto que as substâncias B_r-Ell-SO₃Na e Z2 foi observado uma maior a proporção de captura na fase S e G2, respectivamente. As substâncias B_r-Ell-SO₃Na e pirazoloisoquinolina induziram a expressão de IL-6, porém inibiram a expressão de IL-8. A substância Z2 também inibiu a expressão de IL-8. Os resultados apresentados por este estudo demonstram que as substâncias analisadas apresentam importante potencial anticancerígeno e imunomodulador, os que as tornam possíveis candidatas para serem exploradas em estudos prospectivos *in vivo*.

Palavras chave: fitoterápicos, leucemias, neoplasias, bioprospecção, biomoléculas

ABSTRACT

Hematological neoplasms are a heterogeneous group of diseases originating in the bone marrow that present as main tumors of lymphoid and hematopoietic tissues leukemias, lymphomas and myelomas. The main current treatments include chemotherapy and radiation therapy. However, most of these treatments are expensive and result in intense side effects for patients, which demands new safer and more cost-effective therapeutic alternatives. The purpose of this study was to investigate the *in vitro* anticancer and immunomodulatory activities of natural and semi-synthetic compounds against hematological neoplasms. As human normal peripheral blood mononucleated cells (PBMC) was used in the assays, this project was duly approved by the Research Ethics Committee (CEP) of the HEMOAM Foundation, according to the guidelines recommended by the resolution 466/2012 of the Ministry of Health. First, PBMC and Vero cells were treated with different concentrations of the following compounds: Br-Ell-S03Na, pyrazoloisoquinoline, Z1 and Z2. The cytotoxicity was assessed using the K562, HL-60 and U937 cell lines. All substances tested showed anticancer activity, without significant cytotoxic effect against non-cancerous cells. The substance that showed the best anticancer activity was a derivative of zerumbone (Z1) that had an IC50 value of 5.20 μ M in HL-60 cells. Regarding the cell cycle, it was observed that the substances Z1 and pyrazoloisoquinoline induced greater capture of cells in the G1 phase of the cell cycle, while in relation to the substance Br-Ell-S03Na and Z2, a higher proportion of capture was observed in the S and G2 phases, respectively. The substances Br-Ell-S03Na and pyrazoloisoquinoline induced the expression of IL-6, but inhibited the expression of IL-8. The Z2 substance also inhibited the expression of IL-8. The results presented by this study demonstrate that the analyzed substances have an important anticancer and immunomodulatory potential, which make them possible candidates to be explored in prospective *in vivo* studies.

Key words: phytotherapics, leukemias, neoplasias, bioprospecting, biomolecules

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de ação entre células tumorais e células imunes no microambiente tumoral. As citocinas secretadas pelas células tumorais e imunológicas podem induzir a supressão tumoral ou promover a progressão tumoral.....	12
Figura 2. Compostos naturais como o revesratrol têm como alvo diferentes vias de sinalização celular para inibir a proliferação, invasão e metástase de células cancerígenas.....	15
Figura 3. Rizoma do <i>Z. zerumbet</i>	16
Figura 4. Estrutura química da Zerumbona.....	17
Figura 5. Estrutura química da Ftalimida.....	18
Figura 6. Estrutura química da Elipticina.....	19
Figura 7. Atividade anticancerígena das substâncias Br-Ell-SO ₃ Na e pirazoloisoquinolina em linhagem K562.....	27
Figura 8. Atividade anticancerígena das substâncias Z1 e Z2 em linhagem K562.....	28
Figura 9. Atividade anticancerígena da substância pirazoloisoquinolina em linhagem U937.....	29
Figura 10. Atividade anticancerígena da substância Br-Ell-SO ₃ Na em linhagem HL60.....	30
Figura 11. Atividade anticancerígena das substâncias Z1 e Z2 em linhagem HL60.....	31
Figura 12. Atividade citotóxica das substâncias em PBMC humano.....	32
Figura 13. Viabilidade celular da linhagem Vero.....	33
Figura 14. Análise do ciclo celular das células k562 tratadas com Z1.....	34
Figura 15. Análise do ciclo celular das células k562 tratadas com Z2.....	35
Figura 16. Análise do ciclo celular das células K562 tratadas com Br-Ell-SO ₃ Na.....	36
Figura 17. Análise do ciclo celular das células K562 tratadas com pirazoloisoquinolina.....	37
Figura 18. Efeito das substâncias sobre o sistema imune.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Esquema terapêutico do uso de drogas quimioterápicas para as Leucemias aguda e crônicas (Adaptado de Ministério da Saúde, 2014).	8
Tabela 2. Plantas medicinais e seus fitoquímicos com atividade anticancerígena.	13
Tabela 3. Substâncias utilizadas no estudo.....	22
Tabela 4. Citotoxicidade das substâncias contra linhagens celulares de neoplasias hematológicas	26

LISTA DE SIGLAS / ABREVIATURAS

AP-1	Proteína ativadora
Bcl-2	Linfoma de células B 2
BFGF	Fator básico de Crescimento de Fibroblastos
<i>C. roseus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CO₂	Dióxido de carbono
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CHONSP	Carbono, Hidrogênio, Oxigênio, Nitrogênio, Fósforo
DANT	Doenças e Agravos Não Transmissíveis
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
HEMOAM	Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HL60	Linhagem celular Leucemia Promielócítica Aguda
IL-2	Interleucina 2
IL6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina-8
IL10	Interleucina 10
INCA	Instituto Nacional de Câncer
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
Interferon γ	Interferon gama
ISI	Web of Science
K562	Linhagem celular Leucemia Mielóide Crônica
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMC	Leucemia mieloide crônica
MTT	Methylthiazole tetrazolium
NFκB	Factor nuclear kappa B
OD	Densidade óptica
OE	Óleo Essencial
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBMC	Células Mononucleares de Sangue Periférico
PBS	Sulfeto de Chumbo
PCR	Proteína C reativa
PI	Iodeto de Propídeo
PLT	Plaquetas
RDM	Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos
RNase	<i>Ribonuclease</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
TCLE	<i>Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</i>
U937	Linhagem Celular Linfoma Histiocítico Humano
VCM	Volume Corpuscular Médio
VEGF	Fator de crescimento epitelial vascular
VHC	Velocidade de Hemossedimentação
VPM	Volume Plaquetário Médio
<i>Z. zerumbet</i>	<i>Zingiber zerumbet</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEORICO	3
2.1. Neoplasias Hematológicas	3
2.2. Epidemiologia das Neoplasias Hematológicas	4
2.3. Diagnóstico das Neoplasias Hematológicas	6
2.4. Tratamentos das Neoplasias Hematológicas.....	8
2.5. Imunopatogênese do câncer.....	11
2.6. Biocompostos naturais com atividade anticancerígena	13
2.6.1. Zingiber zerumbet (L.) Smith.....	15
2.6.2 Derivados sintéticos de compostos naturais.....	17
2.6.3 Elipticina	19
3. OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo Geral.....	21
3.2. Objetivos Específicos	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1. Aspectos Éticos.....	22
4.2. Obtenção das substâncias naturais e semissintéticos	22
4.3. Cultura de células.....	23
4.4. Isolamento e preparação de células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC).....	23
4.5. Viabilidade Celular	24
4.6. Análise da ação dos compostos de acordo com ciclo celular	24
4.7. Análise da atividade imunomoduladora.....	25
4.8. Análise estatística	25
5. RESULTADOS	26
5.1 Atividade anticancerígena.....	26
5.2. Atividade citotóxica contra células não cancerígenas	32
5.3. Análise do Ciclo Celular	34
5.4. Atividade imunomoduladora	38
6. DISCUSSÃO	40
7. CONCLUSÃO.....	45
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
9. ANEXOS E APÊNDICES.....	56

9.1 Artigo publicado na revista molecules.....	56
9.2 Artigo aceito para publicação na revista PLOS ONE PONE-D-20-06981R2 - [EMID:3d312c22caaefe12].....	69
9.3 Termo de consentimento livre e esclarecido – TCLE.....	70
9.4 Termo de assentimento	72
9.5 Aprovação aspecto ético	74

1. INTRODUÇÃO

As neoplasias hematológicas são um grupo heterogêneo de doenças malignas, originárias de células de linhagem hematopoéticas (leucemias) e do sistema imunitário (mielomas/linfomas), representando 8% das neoplasias humanas¹. Os órgãos mais envolvidos neste processo são: sangue, medula óssea, gânglios linfáticos, baço e fígado. Este grupo heterogêneo de doenças variam quanto a gravidade clínica e a resposta ao tratamento².

Dentre os grupos de neoplasias hematológicas encontram-se as leucemias, caracterizadas pelo acúmulo de células brancas malignas indiferenciadas na medula óssea e na corrente sanguínea. Podem ser classificadas quanto a maturação celular, sendo aguda quando há o predomínio de células blásticas, ou crônica se ocorre o predomínio de células maduras. Também podem ser classificadas de acordo com a linhagem afetada, denominada linfocítica quando as alterações ocorrem nos linfócitos T ou B, ou mielocítica, quando altera as linhagens das células mielóides³.

Os linfomas são um grupo de neoplasias hematológicas que derivam de linfócitos provenientes da medula óssea que podem ser classificados em duas formas: Linfoma Hodgkin e não Hodgkin. O linfoma de Hodgkin é definido como uma neoplasia do tecido linfóide caracterizada pela presença de células de Reed-Sternberg (ou células de Hodgkin), constituído por estroma, linfócitos, eosinófilos e monócitos^{4,5}. O linfoma Não-Hodgkin representa um grupo heterogêneo de neoplasias linfoproliferativas, que podem ser divididas de acordo com o tipo de célula precursora : linfócitos B (são a forma mais comum, cerca de 85-90%), T ou células natural killer^{6,7}.

Outro tipo de neoplasia hematológica comum é o mieloma múltiplo (MM), caracterizado pela presença de células B clonais e malignas na medula óssea⁸. Na maioria dos casos, essas células plasmocitárias produzem uma imunoglobulina monoclonal (proteína M) em excesso, que pode ser encontrada no plasma e na urina de pacientes acometidos pela doença⁸.

Dentre os tratamentos atuais das neoplasias hematológicas, incluem-se os quimioterápicos e a radioterapia. Contudo, esses tratamentos em sua grande maioria apresentam efeitos colaterais intensos aos pacientes, deixando-os muito debilitados. A terapia fotodinâmica e o transplante de células-tronco hematopoiéticas também tem sido usado, porém, muitas vezes também apresentam inúmeros efeitos colaterais. Tais efeitos incluem, alta toxicidade e restrição na metástase⁹.

Cerca de 80% da população mundial depende de medicamentos tradicionais e mais de 60% dos medicamentos anticâncer aprovados clinicamente são derivados de plantas medicinais^{9,10}. Metade das drogas atualmente em uso clínico é de origem natural, indicando que os produtos naturais têm um papel significativo no processo de descoberta e desenvolvimento de drogas¹¹. Devido a isso, a

prospecção de biomoléculas oriundas de plantas medicinais com potencial antineoplásico tem sido amplamente explorada¹².

O reino vegetal é composto por aproximadamente 250.000 espécies de plantas e apenas cerca de 10% foram estudadas para o tratamento de diferentes doenças. Os fitoquímicos e os seus derivados estão presentes em diferentes partes da planta podendo apresentar várias funções farmacológicas¹³. Ao longo dos anos, diversas biomoléculas têm sido associadas à atividade anticancerígena, tais como: carboidratos^{14,15}, polissacarídeos¹⁶, além de compostos de organismos marinhos e substâncias encontradas no veneno de cobras¹⁷.

Uma revisão publicada por Prakash e colaboradores em 2013, apresentou as principais espécies de plantas com potenciais antineoplásicos, sendo a maioria destas de origem asiática, chinesa e europeia. Alguns desses compostos são capazes de restaurar a capacidade funcional das células T nos pacientes com neoplasias. Outros, demonstraram eficácia *in vitro* e *in vivo*, podendo ativar os mecanismos imunes anti-tumorais do paciente¹⁸.

Um estudo realizado por Yokosuka et al. (2007) relatou que a molécula flavone glaziovianin A, isolada das folhas da árvore brasileira *Ateleia glazioviana* possuía citotoxicidade contra células leucêmicas promielocíticas, sugerindo que o mecanismo envolvido estava relacionado a inibição da polimerização da tubulina¹⁹. Uma outra espécie denominada de *Zingiber zerumbet* (*Z. zerumbet*) tem despertado interesse científico e vem sendo estudada em diversas partes do mundo, devido ser utilizada há séculos na medicina tradicional asiática e por apresentar diversas atividades farmacológicas²⁰. Entretanto, até o momento, pouco se conhece sobre o potencial terapêutico do *Z. zerumbet* no Brasil principalmente no que se refere a neoplasias hematológicas.

Diante deste contexto, é evidente a importância de estudos que caracterizem as atividades anticancerígena e imunomoduladora de biomoléculas naturais e semi-sintéticas. Tais ações são de grande importância na luta contra câncer além de promover o desenvolvimento científico de nossa região. Portanto, este estudo teve como principal finalidade avaliar o potencial anticancerígeno *in vitro* de compostos naturais e seus derivados bioativos contra neoplasias hematológicas. Avaliar também ação imunomoduladora das principais citocinas relacionadas ao câncer, que regulam a carcinogênese, expressando o receptor relacionado para usá-lo na resposta imune, assim podendo direcionar terapêuticamente, reforçando suas bioatividades específicas para o design de novos terapêuticos para auxiliar no tratamento contra neoplasias hematológicas.

2. REFERENCIAL TEORICO

2.1. Neoplasias Hematológicas

Como já mencionado anteriormente, as neoplasias hematológicas são um grupo heterogêneo de doenças originadas a partir da proliferação anormal e descontrolada de uma célula clonal de origem hematopoiética²². Adicionalmente, estas doenças, comprometem também o sangue, gânglios linfáticos, baço e fígado²². Tais neoplasias se desenvolvem a partir de mutações celulares, influenciadas tanto por fatores genéticos, quanto por fatores ambientais¹⁸. A transformação maligna celular decorrente de fatores genéticos é resultado de um conjunto de mutações gênicas, muitas das quais de caráter hereditário¹⁸. Os fatores ambientais estão principalmente associados a agentes químicos, drogas, exposição à radiação, tabagismo, alimentação e infecções²³.

Dentre as neoplasias hematológicas, a leucemia é mais comumente encontrada na população. Esta doença maligna afeta os glóbulos brancos e tem como principal característica o acúmulo de blastos na medula óssea, que sobrepõem as células sanguíneas normais, prejudicando assim a produção dos glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas²⁴.

As leucemias podem ser classificadas em mielóide e linfóide, dependendo da linhagem celular comprometida. Desta forma, incluem-se no conceito mielóide todas as células que integram as linhagens granulocítica (neutrófilos, eosinófilos, basófilos), monocítica, eritróide, megacariocítica e de mastócitos²⁵. A leucemia linfóide corresponde a um terço do total de leucemias, presente principalmente em pessoas com mais idade e raramente observada em crianças e indivíduos com menos 40 anos. Este tipo de leucemia é derivado de células linfóides indiferenciadas (linfoblastos), presentes em grande número na medula óssea, no timo e nos gânglios linfáticos e caracteriza-se principalmente pelo acúmulo de linfócitos monoclonais^{26,27}.

No geral, as leucemias podem também estar relacionadas aos fatores de risco ocupacionais, agentes químicos como os solventes (sendo o mais comum o Benzeno) facilmente encontrados no vapor da gasolina em postos de abastecimentos, entre outros²⁸. Portanto, as leucemias apresentam diferentes etiologias, patogenias e prognósticos. Devido suas classificações, tentado reduzir a heterogeneidade da doença, com diferentes opções terapêuticas para melhorar o prognóstico dos pacientes leucêmicos²⁹.

Os linfomas representam outro tipo de neoplasia hematológica que possuem como procedência a presença de linfócitos que se acumulam nos tecidos linfóides e como consequência promovem o desenvolvimento de massas tumorais³⁰. Podem ser classificados em linfoma Hodgkin e não Hodgkin. O linfoma de Hodgkin é caracterizado por ser uma neoplasia linfoproliferativa que

histopatologicamente apresenta células neoplásicas com variadas morfologias denominadas de Reed – Sternberg^{31,32}. Aproximadamente 15% das neoplasias que acometem as crianças são representadas por esse tipo de neoplasias^{31,32}. Por outro lado, Linfomas não-Hodgkin (LNH) são caracterizados pelo envolvimento mais frequente dos múltiplos linfonodos periféricos, de disseminação não contínua, onde o Anel de Waldeyer e linfonodos mesentéricos são geralmente envolvidos³³. Esta patologia é a nona (86%) causa de morte por câncer no sexo masculino e a sétima (5%) no sexo feminino³⁴. A maioria desses casos não apresentam etiologia definida, porém, acredita-se que múltiplos fatores possam estar envolvidos, como fatores hereditários, ambientais, ocupacionais e dietéticos³⁴.

O mieloma múltiplo também é considerado uma neoplasia maligna hematológica, caracterizado pela proliferação clonal de células plasmocitárias e pela secreção de seus produtos celulares. No geral, essa patologia é precedida por um estágio pré-maligno denominado de gamopatia monoclonal de significado indeterminado³⁵. Esta patologia pode ser classificada em assintomática, latente ou sintomática, com base nos sinais e sintomas³⁶. Outras apresentações menos comuns incluem mieloma não secretor, plasmocitoma ósseo solitário, plasmocitoma extramedular e síndrome POEMS³⁶. De acordo com o Instituto Nacional de Câncer entre os anos de 2005 e 2015 foram registrados 5.255 novos casos de mieloma múltiplo no território nacional².

2.2. Epidemiologia das Neoplasias Hematológicas

Atualmente as doenças e agravos não transmissíveis (DANT) são consideradas as principais responsáveis por enfermidades e óbitos da população mundial. No ano de 2008, as DANT corresponderam 63% do total da mortalidade no mundo, com ênfase para as doenças cardiovasculares (48%) e o câncer (21%). Estas doenças afetam principalmente países em desenvolvimento e que apresentam altos índices de mortes prematuras³⁷. No decorrer das transições demográficas e epidemiológicas globais, acredita-se que a incidência de câncer seja cada vez maior nas próximas décadas³⁸. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, as neoplasias hematológicas são as principais causas de morte dentre todos os tipos de câncer nos países desenvolvidos e a segunda causa entre os países em desenvolvimento².

Dentre os tipos de neoplasias hematológicas, a mais comum é a leucemia², onde no ano de 2018, foram registrados mundialmente 249 mil novos casos, sendo o décimo tumor mais incidente entre todos os cânceres, com um risco estimado de 6,5 a cada 100 mil homens. Para as mulheres, foram estimados 187 mil casos novos com taxa de incidência de 5,0 a cada 100 mil, ocupando a décima segunda posição^{39, 40}. No Brasil, para o triênio de 2020-2022 estima-se que sejam registrados cerca de 5.920 novos casos da doença em homens e 4.890 em mulheres. Estes valores correspondem

a um risco de 5,67 casos novos para cada 100 mil homens e 4,56 para cada 100 mil mulheres, ocupando assim, a nona e a décima posição, respectivamente, de todas as neoplasias no território brasileiro ⁴¹ .

Na região Norte do Brasil, a leucemia é considerada para os homens a quinta mais frequente, totalizando um risco de 4,45 a cada 100 mil habitantes e para as mulheres é a sexta mais frequente, com um risco de 3,55 a cada 100 mil habitantes, sendo que no ano de 2017, ocorreram 4.795 óbitos por leucemia, com uma taxa de bruta mortalidade de 4,75/100 mil em homens e 4.401 óbitos com taxa bruta de 4,25/100 mil em mulheres ⁴² .

Ao que se refere aos linfomas, de acordo com dados publicados pela Globocan/IARC, foram registrados cerca de 199.670 óbitos, tendo um risco estimado de 2,8 a cada 100 mil habitantes no ano de 2012. Em relação ao Brasil, em 2018 foram estimados 46 mil casos novos de linfoma de Hodgkin nos homens com um risco estimado de 1,200 para cada mil homens. Para as mulheres, foram 33 mil casos novos, com taxa de incidência de 0,88 para 100 mil mulheres³⁴. As maiores taxas de incidência em ambos os sexos foram encontradas nos países da Europa (Ocidental, Norte e Sul), Austrália e Nova Zelândia, e América do Norte ^{39,40} .

De acordo com os dados publicados pelo Registro de Câncer de Base Populacional (RCBP) Curitiba é apontada como a principal capital a apresentar as maiores taxas de neoplasias hematológicas e São Paulo ocupa a segunda posição. O linfoma de Hodgkin ocupa a 12^o posição de neoplasias mais frequentes entre homens e a 17^o posição na região Norte do Brasil (0.28/100 mil)⁴¹.

Quanto ao Linfoma não-Hodgkin, para o sexo masculino, os óbitos registrados para o ano de 2013 em todo mundo , foi de 115.404 (3,2/100 mil), enquanto que para mulheres foi verificado 84.266 mortes (2,4/100 mil) ⁴¹. No ano de 2015, ocorreram no Brasil um total de 2.434 óbitos entre o sexo masculino e 1.960 entre o sexo feminino. Na região Norte, o linfoma não-Hodgkin é considerada oitava neoplasia hematológica mais frequente entre o sexo masculino (2,84/100 mil) e a décima primeira mais frequente entre o sexo feminino (1,79/100 mil)²⁸.

Em relação ao linfoma não-Hodgkin (LNH), no Brasil foram registrados para o ano de 2016, cerca de 5.210 novos casos para o sexo masculino o que correspondeu a um risco estimado de 5,27 novos casos a cada 100 mil homens e 5.030 para o sexo feminino correspondendo a um risco estimado de 4,88 a cada 100 mil mulheres ². Para o triênio de 2020-2022 estimou-se um aumento entre os casos da doença, onde seriam registrados cerca de 6.580 novos casos para o sexo masculino e 5.450 para mulheres, estimando um risco de 6,31 a cada 100 mil homens e 5,07 a cada 100 mil mulheres, colocando esta patologia na 10^o posição entre mais frequentes de todos os cânceres em ambos os

sexos. Na região Norte do Brasil, a LNH é considerada a 10º mais frequente entre o sexo masculino (2,23/100 mil) e 11º posição entre o sexo feminino (1,95/100 mil) ⁴¹.

O mieloma múltiplo é o tipo de neoplasia hematológica que afeta milhões de pessoas no mundo, considerada a segunda mais frequente entre todos os tipos de neoplasia hematológica., desta doença apresenta maior incidência em indivíduos da faixa etária entre 65 a 70 anos de idade ⁴². No ano de 2013 foram registrados cerca de 22.350 novos casos em todo mundo, dos quais 10.710 resultaram em óbito. No ano de 2018, foram registrados cerca de 30.770 casos da doença no mundo, sendo observado um risco é maior para o sexo masculino em comparação com o sexo feminino ⁴³. No Brasil, no ano de 2012, foram registrados uma incidência de cerca 3.500 casos da doença, com uma prevalência de quatro a cada 100.000 habitantes (2008-2012) ⁴⁴.

2.3. Diagnóstico das Neoplasias Hematológicas

No geral, o diagnóstico das leucemias baseia-se em estudos microscópicos das linhagens leucocitárias por meio da análise de amostras de sangue, aspirados de medula óssea, e em caso de suspeitas de acometimento do sistema nervoso central, deve ser realizado uma análise do líquido cefalorraquidiano (LCR-líquor). Os parâmetros avaliados nestes exames são: morfologia, quantidade celular, reações citoquímicas e a presença ou ausência de marcadores imunofenotípicos. A morfologia da célula apresenta inicialmente a diferenciação dos blastos entre as células linfoides e mieloides, especialmente onde ocorre o predomínio de poucas células ⁴⁵.

O hemograma é o exame que em conjunto com a sintomatologia do paciente, fornece informações necessárias para o diagnóstico inicial das leucemias, sendo observado uma frequência de anemia normocítica e normocrômica e talvez a presença de trombocitopenia. A contagem de leucócitos mostra-se excessivamente elevada, porém, inicialmente pode apresentar quantidades normais ou diminuídas ^{45,46}.

Para diagnosticar tanto a leucemia linfóide aguda quanto o mieloma realiza-se o mielograma. Este exame deve apresentar quantidades de 25% linfoblastos para diagnosticar a leucemia linfóide, isso se deve a substituição das células adiposas por células leucêmicas, observando uma hiperplasticidade na medula óssea, sendo que em alguns casos pode ocorrer fibrose medular. O aspirado da medula óssea (mielograma) também pode ser submetido a reações de citoquímica, o que proporciona a melhor diferenciação do tipo celular ⁴⁷.

A Citoquímica e a Citogenética auxiliam na diferenciação entre as células de linhagem mieloide ou até mesmo linfóide. As células de origem linfóides são caracterizadas pela presença de

vacúolos após a coloração e pode apresentar uma atividade nuclear não característica⁴⁸. A citogenética, por sua vez, detecta alterações clonais, estruturais e numéricas, mesmo com um número pequeno de células, apenas duas ou três metáfases são suficientes para a determinação de um clone neoplásico, além desse exame também ser capaz de detectar a presença de rearranjos recorrentes ⁴⁹.

As reações de imunofenotipagem são capazes de avaliar antígenos celulares apresentados nos blastos de leucócitos. Muito se tem proposto sobre a classificação das leucemias de acordo com a expressão de antígenos celulares específicos, classificando-as em linhagens T e B, de acordo com as suas características imunofenotípicas. Detectando assim com maior precisão não só a linhagem celular, mas o nível de diferenciação em que o processo leucêmico se encontra⁴⁶. As reações de imunofenotipagem são reveladas através da citometria de fluxo⁴⁶.

A citometria de fluxo tem como função direcionar, através de um feixe de laser, as células que estão em uma suspensão a se posicionarem em um fluxo unidirecional, para que o feixe de laser emitido atinja todas as células. Este tipo de técnica permite a visualização multifatorial, além da quantificação celular quanto seu peso molecular e morfologia, tendo, portanto, a diferenciação das células T e B, independente do grau de maturação ⁵⁰.

O diagnóstico dos linfomas, baseia-se na biópsia do linfonodo ou massa tumoral. O material coletado é examinado por patologistas que irão classificar a doença de acordo com os critérios morfológicos e imunohistoquímicos. A partir da suspeita de linfoma, deve-se realizar um exame baseado na presença de anticorpos monoclonais utilizados em diversas reações imunohistoquímicas, com o objetivo principal de identificar a presença de proteínas no citoplasma ou núcleo das células tumorais, afim de definir: o tipo de tumor, tipo de linfoma, origem celular do linfoma e qual seu subtipo ⁴⁹. Além disso, realiza-se exames de diagnósticos diferencial a partir da punção aspirativa por agulha fina (PAAF). Este diagnóstico é extremamente útil no diagnóstico das neoplasias, principalmente para diferenciação de linfonodomegalias reacionais, doenças proliferativas e metástase de carcinoma. Contudo, este exame não substitui a biópsia de linfonodo ou o diagnóstico e classificação inicial da doença ^{51, 52}.

Quanto ao diagnóstico do mieloma, realiza-se inicialmente eletroforese e imunofixação. Ambos são feitos por meio da coleta de sangue e de urina, com o objetivo de identificar a proteína M. Exames de imunohistoquímica, imunofenotipagem, citogenética (cariótipo) e hibridização fluorescente *in situ* (FISH) também são muito sensíveis na detecção dessas proteínas. A partir da suspeita de mieloma é necessário a realização da biópsia da medula, sendo este um método determinante para o diagnóstico da doença, pois define a quantidade de plasmócitos presente na medula óssea. Outros exames como os de imagem, também podem ser solicitados, como a radiografia

óssea, tomografia computadorizada, PET scan e ressonância magnética, que servem para verificar alterações nos ossos ^{53,54}.

2.4. Tratamentos das Neoplasias Hematológicas

Os atuais tratamentos convencionais incluem radioterapia, quimioterapia, imunoterapia, terapia fotodinâmica, cirurgia de tumor, transplante de medula óssea e o transplante de células tronco-hematológicas (TCTH). Este último, baseia-se na transferência de células da medula de um doador para outro, o qual se torna alogênico, ou autólogo, envolvendo o uso da medula óssea do próprio paciente visando reestabelecer a função das células hematopoiéticas, devido as altas doses de quimioterapia ⁵⁵. Outros tratamentos também podem ser realizados, como o transplante de células progenitoras do sangue periféricos ou transplante de células do cordão umbilical⁵⁶.

A maioria destes tratamentos resultam em intensos efeitos colaterais aos pacientes. Estudos clínicos indicam que a terapia de radiação é prejudicial aos tecidos normais⁵⁷. Assim, equipamentos de alta precisão para destruir o tumor sem danificar as células normais tem sido desenvolvido para aumentar a eficácia do tratamento e reduzir os efeitos colaterais da radiação ⁵⁷.

A quimioterapia consiste no uso de substâncias químicas isoladas ou em combinação, tendo como objetivo o tratamento de neoplasias malignas, sendo este uma das principais fontes terapêuticas no caso de neoplasias hematológicas. A quimioterapia resulta em diversos efeitos adversos, que incluem: alterações hematológicas, toxicidade gastrointestinais, pulmonares, cardíacas, hepáticas, neurológicas, renais, vesicais, dermatológicas, disfunção reprodutivas, metabólicas, além de reações alérgicas e a fadiga⁵⁷. Dentre as alterações hematológicas, estão a leucopenia, anemia, trombocitopenia e neutropenia febril⁵⁷.

As terapias com drogas quimioterápicas tem sido a mais eficaz para a cura das neoplasias hematológicas, como as leucemias, e para o tratamento de metástases não detectáveis ⁵⁸. Estas drogas apresentam inúmeros efeitos colaterais ⁵⁹. Embora seja necessária a utilização desse medicamento como índice terapêutico, a toxicidade aos tecidos normais, é uma questão limitante na eficácia do tratamento ⁶⁰ (Tabela 1). Os agentes quimioterapêuticos oficiais incluem agentes alquilantes, inibidores da topoisomerase, agentes atuantes da tubulina e antimetabólitos⁶¹. Devido as várias limitações e seus efeitos, estudos têm sido realizados para minimizar os efeitos colaterais gerados durante a terapia ^{61, 62}.

Tabela 1. Esquema terapêutico do uso de drogas quimioterápicas para as Leucemias aguda e crônicas (Adaptado de Ministério da Saúde, 2014).

Neoplasia Hematológica	Medicamento	Mecanismo de ação	Dose (mg/m ² /dia)	Efeitos colaterais	Tempo de tratamento
Leucemia Linfóide Aguda Leucemia Mielóide Aguda	Mesilato de Imatinibe	<p>Inibidor seletivo da atividade da tirosinoquinase do gene de fusão BCR-ABL*;</p> <p>Bloqueia a atividade da tirosinoquinase do c-kit* e do receptor de PDGF*;</p> <p>Inibidor da atividade da tirosinoquinase do BCR-ABL;</p> <p>Bloqueia o acesso ao ATP e previne a fosforilação do substrato, inibindo a proliferação celular dependente de BCR-ABL;</p> <p>Promove a apoptose ou parada de crescimento em células hematopoéticas que expressam BCR-ABL.</p>	340mg/m ² /dia, administrada por via oral	<p>Náusea/diarreia;</p> <p>Retenção hídrica;</p> <p>Edema periférico, edema periorbitário;</p> <p>Mielossupressão (neutrófilos/plaquetas);</p> <p>Fadiga, rash, câimbras musculares, artralgia.</p> <p>Retardo do crescimento, principalmente em pacientes impúberes.</p>	2 anos a 3 anos, conforme a conduta ou protocolo terapêuticos adotados no hospital.
Leucemia Linfóide Crônica Leucemia Mielóide Crônica	Hidroxiureia	Inibe a atividade da tirosinoquinase	2mg/m ² /dia por via interna (oral)	<p>Gastrintestinais: (estomatite, náusea, vômito, diarreia e constipação)</p> <p>Dermatológicos: (hiperpigmentação,</p>	A dose de manutenção é ajustada conforme a leucometria, sendo interrompida o

			erupção maculopapular, eritema periférico e facial, úlceras cutâneas, atrofia da pele e unhas, descamação cutânea e lesões similares à dermatomiosite)	número de leucócitos estiver abaixo de 2.500/mm ³ e o de plaquetas, de 100.000/mm ³ .
Alfa-Interferona	Inibe a atividade da tirosinoquinase; Reduz ou estabiliza a mielofibrose associada à doença;	5.000.000 µI/m ² /dia; Dose máxima de 9.000.000 µI/dia; Via subcutânea.	Neutropenia ou úlceras orais persistentes promovendo redução de dose.	12 meses de tratamento, a conduta deve ser modificada se não houver evidência de resposta citogenética
Dasatinibe (2ª linha)	Inibe a atividade da tirosinoquinase; Empregado em caso de falha terapêutica.	100 mg/dia por via oral; Escalonar para 140 mg/dia após três meses, em caso de resposta inadequada, perda da resposta anterior ou progressão da doença.	Dor musculoesquelética, cefaleia, infecção, diarreia, fadiga, erupção cutânea, dispneia, artralgia, hemorragia, edema superficial, derrame pleural, dor abdominal e náusea. Asma, doença pulmonar obstrutiva crônica, insuficiência cardíaca, hipertensão arterial, doenças autoimunes, sangramento gastrointestinal, ocorrência de derrame pleural e pericárdico.	3 meses, sendo suspenso quando não há resposta no tratamento.

	<p>Inibe a atividade da tirosinoquinase; Empregado em caso de falha terapêutica.</p>	<p>400 mg, duas vezes ao dia, com intervalo de 12 horas entre as doses, por via oral.</p>	<p>Erupção cutânea, prurido, náusea, vômito, fadiga, cefaleia, constipação, diarreia e mialgia; Anemia, neutropenia e trombocitopenia.</p>	<p>3 meses iniciais e sempre que ocorrer modificação da dose</p>
--	--	---	--	--

*Receptor do fator stem-cell - SCF; * Fator de Crescimento derivado das Plaquetas; *Oncoproteína.

Diante dos dados apresentados acima, torna-se evidente necessidade da busca constante por novas opções terapêuticas mais eficazes e seguras. Tais ações são essenciais na luta contra o câncer. Atualmente, o uso de extratos de plantas tem se destacado no cenário científico no que tange o tratamento do câncer ^{62, 63}.

2.5. Imunopatogênese do câncer

O crescente interesse relacionado a utilização do sistema imunológico como estratégia de combate ao câncer, tem focado principalmente em biomarcadores imunes, como citocinas e quimiocinas, e suas vias de sinalização durante o processo de formação e manutenção da oncogênese ⁶⁴. As citocinas pro-inflamatórias tem sido os principais alvos no desenvolvimento de estratégias terapêutica. Porém, essa abordagem ainda continua sendo um desafio científico e clínico ^{64, 65}.

A modulação do processo inflamatório é crucial durante o processo da oncogênese e para manutenção do microambiente tumoral. Por exemplo, células inflamatórias podem ser recrutadas diretamente pelas células neoplásicas e as citocinas e quimiocinas por elas secretadas são capazes de constituir um microambiente pró-tumorigênico ⁶⁶. Sparmann e Bar-Sagi, demonstraram que secretomas de células cancerígenas tem um papel fundamental na indução do arremetimento de leucócitos no local do tumor e na promoção da vascularização do tumor ⁶⁷.

Além disso, os linfócitos T citotóxicos inibem o desenvolvimento tumoral via da resposta imune aguda, enquanto que a ativação da resposta imune crônica e a infiltração Th2, resulta no desenvolvimento tumoral e na progressão da patologia ^{68,69}. A figura 1, mostra a regulação dessas respostas mediadas pelas citocinas secretadas na imunidade antitumoral dos hospedeiros ⁷⁰.

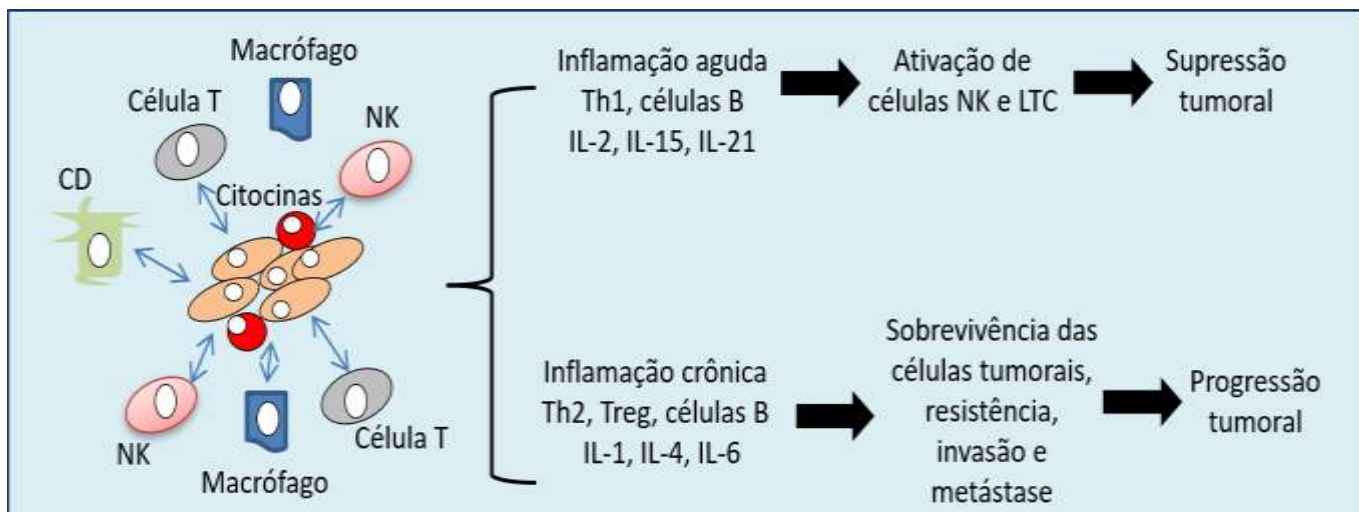


Figura 1. Mecanismo de ação entre células tumorais e células imunes no microambiente tumoral. As citocinas secretadas pelas células tumorais e imunológicas podem induzir a supressão tumoral ou promover a progressão tumoral.

Fonte: Adaptada de Setrerrahmane S et al., 2017.

A IL-6, citocina pró-inflamatória, está envolvida na proliferação, diferenciação e resistência à apoptose de diversas células cancerígenas, como mieloma múltiplo e câncer de mama, colorretal, entre outras neoplasias⁷⁰. O receptor da IL-6 (sIL-6Ra), demonstra ter um papel fundamental na transcrição de inflamação aguda para uma inflamação controlada ou até crônica pela redução dos neutrófilos, o que favorece acumulação de células mononucleares⁷¹. Camundongos com deficiência de IL-6, demonstrou resistência à formação de um conjunto células tumorais resistentes à quimioterapia. Concomitantemente, a sinalização da IL-6 nas células tumorais possui um alto potencial para facilitar a progressão e a recidiva do tumor⁷².

A IL-2, uma citocina produzida por CD4, importante na regulação da sobrevivência, proliferação e diferenciação de células T ativadas e células NK⁷³. Usada para ativar o sistema imunológico de pacientes com neoplasia, sendo de grande importância na pesquisa atual em imunoterapia contra o câncer^{74,75}. Frequentemente utilizada para compensar as citocinas imunossupressoras secretadas pelas células cancerígenas⁷⁰.

A citocina pró-inflamatória IL-8 e outras quimiocinas CXC, são mediadores da angiogênese, cuja sua alta expressão está relacionada com os potenciais tumorigênicos e metastáticos⁷⁶. Agentes anticancerígenos, como a curcumina, que inibe a expressão da IL-8, através do bloqueio da ativação NF-κB, também inibem o crescimento celular⁷⁷.

Em relação as citocinas anti-inflamatórias, diversos fatores do microambiente tumoral contribuem para a “anti-inflamação” associada ao câncer. A IL-10, possui ação inibitória na produção de citocinas a partir de linfócitos T auxiliares (Th1, Th2), desempenhando um papel crucial na patogênese de infecções e inflamações, além de possuir ação essencial na supressão de mediadores

que promove tumores⁷⁸. A IL-4 cuja função principal é , regular a proliferação e sobrevivência dos linfócitos, também pode , promover a proliferação e a sobrevivência de diversas células cancerígenas^{79,70}. Esta citocina também age sinergicamente com a IL-13 e ativa STAT6, ligando-se a promotores de vários genes e desempenham um importante papel na diferenciação celular, indução de colônia e resistência à apoptose^{80,70}. Porém, em estudos *in vivo*, a IL-4 demonstrou a capacidade de inibir a proliferação de células cancerígenas, reduzir as metástases linfáticas e hematogênicas⁷⁹.

Chang Y., *et al*, (2017) avaliaram atividade imunomoduladora de um polissacarídeo isolado de *Coriolus versicolor*. Os resultados demonstraram que as substâncias ativam o sistema imune, aumentando as respostas mediadas pelos biomarcadores IL-1 e IL-6, estimulando as células T e dendríticas em tumores, o que resultou na diminuição dos efeitos colaterais do tratamento convencional⁸¹. É importante ressaltar que estudos com substâncias anticancerígenas que envolvam a avaliação de suas atividades sobre o sistema imune é de suma importância para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra o câncer⁸².

2.6. Biocompostos naturais com atividade anticancerígena

As plantas são consideradas fontes potenciais de drogas para o desenvolvimento de quimio-prevenção ou tratamento do câncer. Seus compostos bioativos estão sendo utilizadas na medicina há muito tempo, sendo possível encontrar biomoléculas com efeitos anticancerígenos disponíveis e eficientes para tratamento alternativo¹³. Já foi relatado várias espécies de plantas medicinais com potencial fitoquímico de inibir a progressão e o desenvolvimento do câncer⁸³ (Tabela 2).

Tabela 2. Plantas medicinais e seus fitoquímicos com atividade anticancerígena.

Nome Planta	Família	Fitoquímico	Câncer
<i>Curcuma longa</i>	Zingiberace	Curcumina, ácido ascórbico	Leucemia, glioblastoma e câncer de cólon (<i>In vitro</i>)
<i>Ziziphus mauritiana</i>	Rhamnaceae	Ácido a-linolênico, estearato de metila	Leucemia, câncer cervical (<i>In vitro</i>)
<i>Aloe vera</i>	Asphodelaceae	Alexin B, emodin	Leucemia, câncer de estômago (<i>In vivo</i>)
<i>Amoora rohituka</i>	Meliaceae	Amooranina	Leucemia linfocítica (<i>In vivo</i>)
<i>Macrobotrys de croton</i>	Euphorbiaceae	Coridina, salutaridina	Leucemia (<i>In vitro</i>)

<i>C. roseus</i>	Apocyanaceae	Vincristina	Leucemia linfocítica (<i>In vitro</i>)
<i>Zingiber officinale</i>	Zingiberaceae	Gingerol	Ovário, colo do útero, cólon, fígado e câncer urinário (<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>)
<i>Aegle marmelos</i>	Rutaceae	Lupeol	Linfoma, melanoma, leucemia e câncer de mama (<i>In vitro</i>)
<i>Colchicum autumnale</i>	Colchicaceae	Colquicina	Leucemia granulocítica (<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>)
<i>Capsicum annuum</i>	Solanaceae	Luteolina	Câncer colorretal (<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>)
<i>Xanthium strumarium</i>	Asteraceae	Xanthatin	Leucemia linfocítica e fígado câncer (<i>in vitro</i>)
<i>Eleusine coracana</i>	Poaceae	Inibidor bifuncional de Ragi	Célula de leucemia mieloide, linhagem celular K562 (<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>)

Fonte: Adaptado de Javed Iqbal *et al.*, 2017.

Dentre os principais agentes com potenciais anticancerígenos, podem-se mencionar: a vitamina D produzida pelo cogumelo, os polissacarídeos do cogumelo e o resveratrol ⁸⁵. Alguns cogumelos quando expostos à luz, mais especificamente após a exposição de raios ultravioleta B, mostram-se como uma melhor fonte de vitamina D ^{83, 84, 85}. Estudos envolvendo a terapia de diversos cânceres (câncer de cólon de útero, câncer de mama, pâncreas e ovário) utilizando cogumelos, demonstraram que metabólitos de alguns cogumelos podem inibir diferentes proteínas, enzimas e vias de sinalização, induzindo a apoptose de células cancerígenas, a qual previne o desenvolvimento de carcinogênese ou metástase ^{84,85}.

Os polissacarídeos vegetais são também agentes anticancerígenos promissores e têm sido utilizados desde há muito tempo como terapia para vários tipos de câncer, como fígado (células HepG2), células pulmonares (A549), célula leucêmica (HL-60) câncer de ovário e células endoteliais linfáticas humanas ⁸⁶.

O Resveratrol (Trihidroxiestilbeno) é um polifenol que pode ser encontrado principalmente em sementes e peles de uvas, no vinho tinto e também em amendoins e amoras. O resveratrol tem um papel importante na cura de diversas neoplasias, como câncer de mama, próstata e pulmão. Seu mecanismo de ação ocorre principalmente, via regulação positiva da p53 e proteínas X associadas a Bcl-2 e MMPs de regulação negativa, NFkB, AP-1, Bcl-2, ciclinas, quinases dependentes de ciclina, citocinas e proteínas COX-2 ^{87,88}. Estudos revelam que resveratrol tem mostrado reduzir a produção

de várias citocinas angiogênicas, incluindo fator de crescimento epitelial vascular (VEGF) e interleucina-8 (IL-8) ^{87,88}. A figura 2 mostra que o resveratrol atua na fosforilação do retinoblastoma para inibir a progressão do ciclo celular. A substância epigallocatequina (EGCG) atua as vias Ras/ERK e PI3K /AKT para inibir a tumorigênese, enquanto que genisteína age na metaloproteínas da matriz para inibir a angiogênese e a invasão tumoral, ⁸⁹.

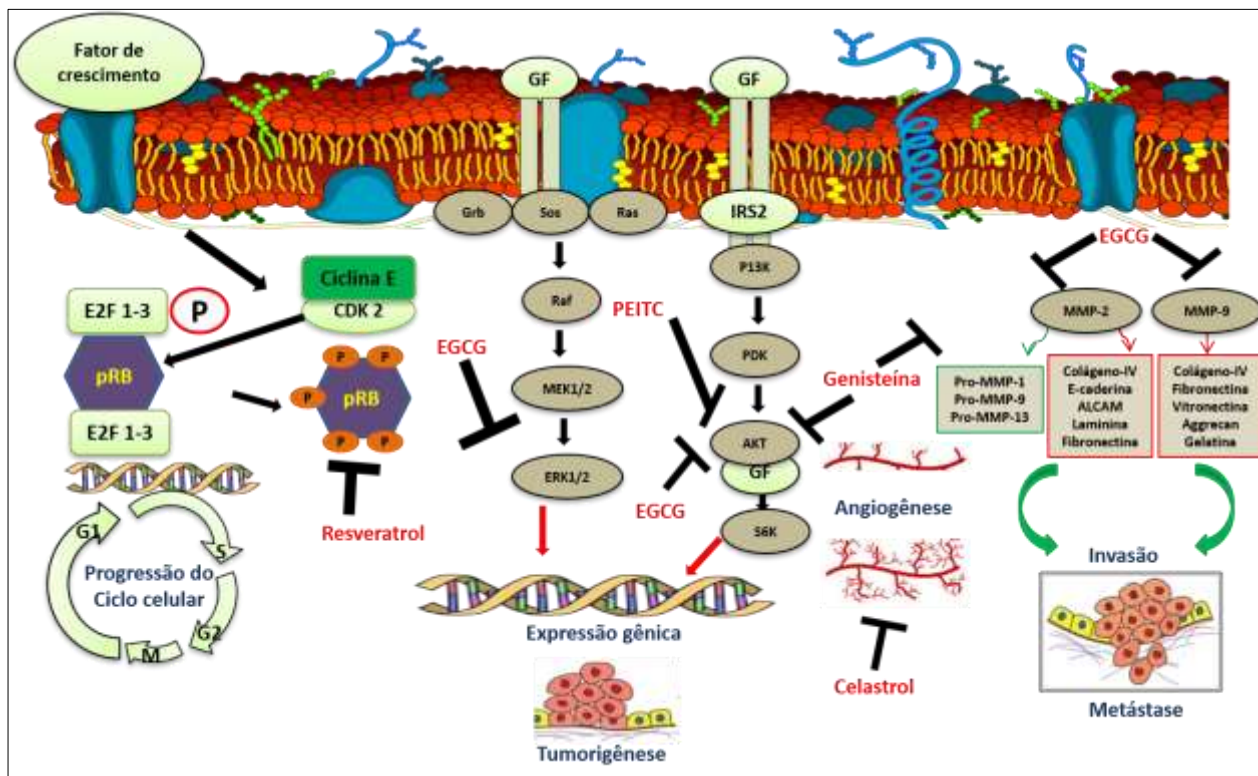


Figura 2. Compostos naturais como o resveratrol têm como alvo diferentes vias de sinalização celular para inibir a proliferação, invasão e metástase de células cancerígenas.
Fonte: Adaptada de Mazumber A et al., 2018⁸⁹.

2.6.1. Zingiber zerumbet (L.) Smith

A espécie de planta pertencente à família Zingiberaceae, gênero *Zingiber*, denominada de *Zingiber zerumbet* (L.) Smith tem despertado um interesse científico particular nas últimas décadas devido ser amplamente utilizada na medicina alternativa por comunidades tradicionais, principalmente na Ásia¹⁶. O gênero *Zingiber* é representado por cerca de 141 espécies que apresentam amplo espectro de utilização que vai desde a fabricação de aromas até o tratamento de infestações parasitárias ^{90,91}.

Vários estudos têm revelado diferentes potenciais farmacológicos do *Z. zerumbet*, tanto em modelos *in vitro* como em modelos de ensaio *in vivo*. O rizoma do *Zingiber zerumbet*, em particular, possui propriedades anti-inflamatórias, antinociceptiva, antiúlcera, antioxidante, anticancerígena, antimicrobiana, antihiperlipidêmica, antialérgicos e antiplaquetários em diferentes doses e concentrações, conforme já descrito anteriormente ⁹².

Extratos de rizomas de *Z. zerumbet* contém principalmente zerumbona, humuleno e canfeno. Contudo, o componente que é encontrado em maior porcentagem no óleo essencial do *Z. zerumbet* é a zerumbona (2E, 6E, 10E) -2,6,9,9- tetrametilcicoundeca-2,6,10-trien-1-ona), um sesquiterpeno monocíclico contendo uma porção de dienona conjugada ⁸⁸ .



Figura 3. Rizoma do *Z. zerumbet*.
Fonte: Rahman et al., 2014.

A zerumbona é atualmente explorada em diversas linhas de pesquisa devido seu amplo potencial biológico ^{93,94}. Recentemente, vários estudos mostraram que a zerumbona apresenta diferentes potenciais farmacológicos, incluindo antioxidante, anti-inflamatório, hepatoproteção, agregação antiplaquetária e antibacteriana ^{95,96}. Também já foi demonstrado que a zerumbona uma forte capacidade também de tratar câncer de fígado, carcinogênese pulmonar, aumentando a apoptose e inibindo a invasão celular ^{18, 92}. Contudo sua atividade anticancerígena contra neoplasias hematológicas e sua atividade imunomoduladora ainda necessitam ser esclarecidas.

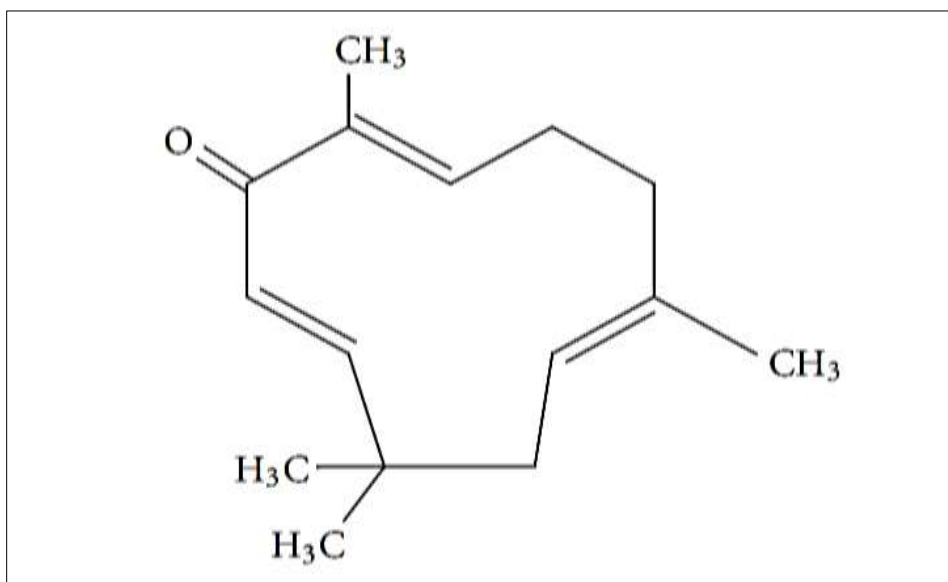


Figura 4. Estrutura química da Zerumbona.

Fonte: Rahman et al, 2014.

Pesquisas voltadas para o estudo de atividades imunomoduladoras desencadeadas por biomoléculas ativas oriundas de plantas são essenciais, considerando a crescente utilização de espécies vegetais para o tratamento de doenças que comprometem o sistema imunológico, em especial as associadas a neoplasias ^{95, 96}.

2.6.2 Derivados sintéticos de compostos naturais

Com o avanço da bioprospecção de compostos naturais, substâncias com amplo espectro de atividades biológicas são potenciais candidatos para a síntese de derivado bioativos mais solúveis e eficazes ⁹⁷.

Entre diversos compostos extraídos das plantas, os alcaloides e seus análogos são umas das classes mais pesquisadas cientificamente do ponto de vista químico e biológico⁹⁸. Estes compostos desempenham papéis significativos na inibição de proteínas ativadoras das células cancerígenas, enzimas e vias de sinalização^{99, 13}. Adicionalmente, há registro também de suas ações nos mecanismos de reparo do DNA (p21, p27, p51, p53), no mecanismo de apoptose relacionado as ações das proteínas Bax e Bak, e na produção de enzimas protetoras (Caspase-3, 7, 8, 9, 10, 12), além de induzir a ação antioxidante (enzima antioxidante GSH, GST e GPx) ^{99, 13}. Todas essas atividades demonstram as o grande potencial anticancerígeno dos alcaloides e seus derivados.

Os alcaloides de vinca (VA) são um grupo versátil de fitoquímicos isolados de *Catharanthus roseus* (*C. roseus*) Apocynaceae. Os principais VA utilizados na terapia de vários tipos de neoplasias são vinorelbina, vindesina, vincristina e vinblastina ¹⁰⁰. Outras espécies de *Catharanthus*, como *C. longifolius*, *C. trichophyllus* e *C. lanceus*, também contêm alcalóides do tipo vindolina. Esses

medicamentos a base de alcalóides apresentam efeitos citostático intenso o que resulta na destruição das células neoplásicas ¹⁰¹.

A vincristina possui potencial anticancerígeno e citotoxicidade diferente da vimblastina, mesmo tendo características químicas similares. A diferença ocorre na estrutura do N-substituinte da unidade di-hidroindólica. São utilizadas como terapias alternativas para leucemia infantil e linfomas ¹⁰². A vinorelbina foi aprovada para uso na Europa (1991) e nos EUA (1995) para o tratamento de câncer de pulmão e a vindesina foram aprovados para o tratamento do melanoma ¹⁰³.

Entre diversos medicamentos registrados para tratamento de neoplasias, nos últimos anos foram obtidos de produtos naturais, semissintético e sintético, incluindo sulforafano que é um composto bioativo derivado de brotos de brócolis, que tem como alvo as vias NF-KB e Wnt/B-catenina, sendo reguladores que promovem a renovação das células-tronco cancerígena ¹⁰⁴. Estudos recentes demonstram que o sulforafano, inibe a progressão de células cancerígenas, como câncer de mama, pulmão e gástrico ¹⁰⁵. Os análogos da ftalimida (1,3 isoindolinediona) derivado do ácido ftálico (Figura 5) têm sido amplamente utilizados na química medicinal devido seu potencial anti-inflamatório, analgésico, imunomoduladoras, antiproliferativo e apoptótico ¹⁰⁶.

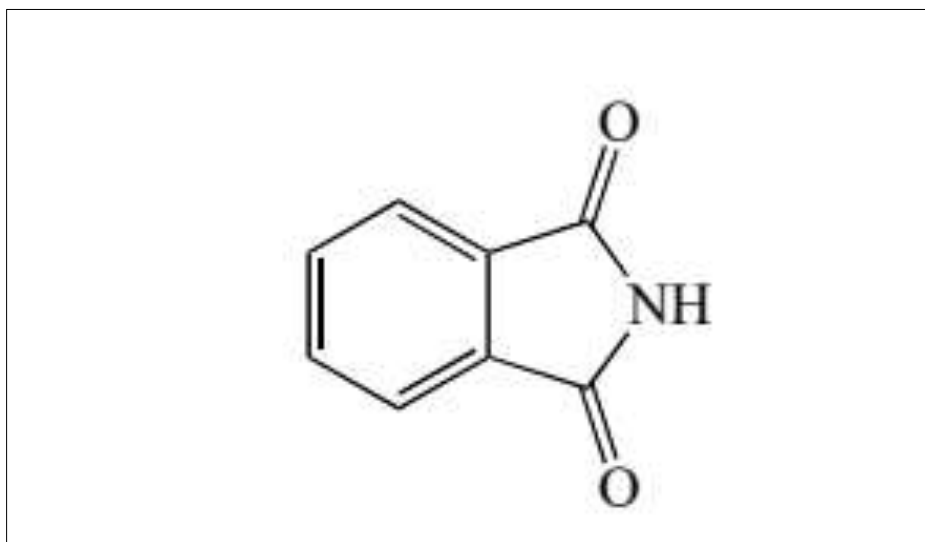


Figura 5. Estrutura química da Ftalimida.

Fonte: Adaptada Gabriel S et al., 1887

Os sintéticos de auronas [Benzilidenobenzofuran-3 (H)] é um inibidor da iodotironina-desiodinase, uma síntese desenvolvida na síntese de enzima. Auronas é pertencente à família dos flavonoides, tendo como composto sintético a areusidina ¹⁰⁷, que inibem quinases dependentes de ciclinas com propriedades antiproliferativos, atuando como agentes neoplásicos ^{108, 109}.

O desenvolvimento de pequenas moléculas com ação antineoplásica e atividade biológica, além do aprimoramento de tratamentos alternativos, é de grande importância, pois proporciona novas alternativas de fitoterápicos para o tratamento de neoplasias hematológicas.

2.6.3 Elipticina

Em 1959 foi isolado o produto natural tetracíclico elipticina 1 (5,11-dimetil 6H-pirido [4,3-b] carbazol, (Figura 6) ^{110,111}. Posteriormente, foram desenvolvidas várias rotas sintéticas da elipticina como estratégia a partir da abordagem de R.B.Woodward ¹¹¹. A elipticina juntamente com a elipticas (agora isoreserpilina), metoxi-elipticina foram isoladas do caule, casca, folha e madeira de raiz de *Ochrosia elliptica*. É um alcaloide isolado da planta *Apocynaceae* encontrada principalmente em países próximos ao Oceano Índico ¹¹⁰.

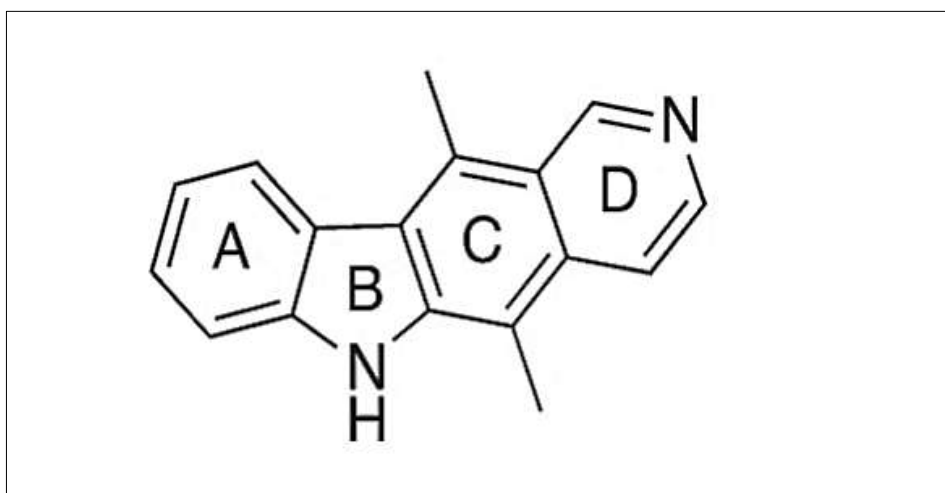


Figura 6. Estrutura química da Elipticina.
Fonte: Miller *et al.*,2012.

A elipticina e seus análogos, tem mostrado atividade antitumoral significativa ao longo dos anos contra diferentes tipos de neoplasias, como leucemia, mieloma, melanoma, câncer de mama, cólon e carcinoma de Erlich ¹¹². Estudos *in vitro* relatam, que a elipticina ¹¹³ induz a geração de radicais livres citotóxicos, inibindo o citocromo P4501A1, o que resulta no desacoplamento da fosforilação oxidativa ^{113, 115}. Estes compostos também agem como inibidor da topoisomerase II ¹¹⁴, que também tem a capacidade de ativar a função de transcrição da p53¹¹⁵. A ação farmacológica ou os efeitos colaterais citotóxicos da elipticina dependem da ativação enzimática do alcaloide no tecido alvo. Contudo, muito pouco se conhece sobre os efeitos antineoplásicos da elipticina e seus derivados em neoplasias hematológicas.

No estado do Amazonas, a incidência de neoplasias hematológicas é alta e cada vez mais as opções de tratamento eficientes na rede de saúde pública são limitadas. Além do mais, o alto custo

dos esquemas terapêuticos associado aos seus intensos efeitos colaterais são um grande obstáculo para os pacientes portadores de neoplasias. Diante disto, a bioprospecção de moléculas naturais e semi-sintéticos com potencial anticancerígeno tem sido um campo revolucionário, pois são menos citotóxicos e tem um baixo custo em comparação com os tratamentos convencionais para neoplasias hematológicas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a atividade anticancerígena e imunomoduladora de substâncias naturais e semissintéticas contra células tumorais oriundas de neoplasias hematológicas.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* de substâncias naturais e semissintéticas contra células cancerígenas de linhagem permanente;
- Analisar a atividade imunomoduladora de biomoléculas naturais e semissintéticas com potencial anticancerígeno;
- Determinar a fase do ciclo celular que as substâncias têm maior atividade;
- Avaliar a citotoxicidade dirigida contra células de linhagem hematológicas normais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

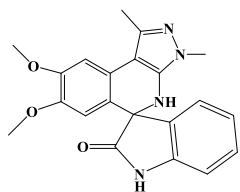
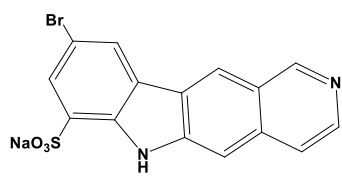
4.1. Aspectos Éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Fundação HEMOAM (Número do Parecer: 3.138.343) aprovado dia 08 de fevereiro de 2019, em acordância com a resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, a qual preconiza as diretrizes e Normas Regulamentares da Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (Anexo III).

4.2. Obtenção das substâncias naturais e semissintéticos

As substâncias utilizadas neste estudo foram cedidas pelo Laboratório Temático de Química e Produtos Naturais do INPA, pelo Instituto de Química da Universidade de Helsinki e pelo Instituto de Química Orgânica da Academia Nacional de Ciências da Ucrânia. Devido a questões de patente, algumas substâncias que foram testadas estão sob sigilo e são utilizados códigos com as letras APG seguida de números. Após uma triagem inicial com base em análise *in silico*, foram selecionados os seguintes compostos para serem testados: pirazoloisoquinolina, derivado de ellipticina (Br-Ell-SO₃Na), dois análogos hidrossolúveis de zerumbona (Z1 e Z2). Considerando que há a possibilidade de patente, por questões de sigilo, este estudo não disponibilizará as formulas químicas das substâncias Z1, Z2 e pirazoloisoquinolina.

Tabela 3. Substâncias utilizadas no estudo.

SUBSTÂNCIAS TESTADAS	FORMULA
Pirazoloisoquinolina	
Br-Ellipticina×SO ₃ Na	

4.3. Cultura de células

As linhagens celulares que foram utilizadas neste estudo são: células transformadas não aderentes (obtidas comerciais U937 (ATCC® CRL-1593.2TM – Linfoma histiocítico), HL60 (ATCC® CCL-240TM- Leucemia promielocítica aguda) e K562 (ATCC® CCL-243TM – Leucemia mielogênica crônica) e células aderentes (obtidas comerciais) VERO (*Cercopithecus aethiops*).

As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco, Rockville, MD) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (FBS; Gibco), 100µg/mL de penicilina e 500µg/mL de estreptomicina. Todas as células foram mantidas a temperatura de 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Essas linhagens celulares foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Biologia Molecular da UNICAMP. A linhagem celular Vero foi gentilmente cedida pela Fundação Oswaldo Cruz de Manaus e foram utilizadas neste estudo com o objetivo de verificar se as substâncias apresentam alguma ação citotóxica contra células não cancerígenas. A linhagem Vero foi mantida em frascos T75 contendo Dulbecco's modified Eagle's médium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 500ug/mL de penicilina/streptomicina/ fungicida, 2mM L-glutamina e 0.1mM MEM aminoácidos não essenciais. As condições de cultivo foram as mesmas descritas acima para células de linhagem cancerígenas. A troca de meio de cultura e repique foi efetuado em média de 48h para cada linhagem celular.

4.4. Isolamento e preparação de células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC).

Os indivíduos que decidiram participar do presente estudo foram convidados a assinarem um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Após a assinatura foi feita a coleta de sangue periférico com anticoagulante (EDTA) de doadores de sangue (n=10) do HEMOAM.

As células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram isoladas por meio de centrifugação por gradiente de densidade utilizando Histopaque-1077 (Sigma)¹¹⁶. Em seguida, as células mononucleares foram coletadas e lavadas três vezes em RPMI antes de serem cultivadas. As células foram mantidas com meio RPMI suplementada com 10% de soro fetal bovino (FBS) à temperatura de 37 °C na incubadora de CO₂. As células foram contadas em câmara de Neubauer com azul de trypan (0,2%). Foi cultivada uma quantidade (1×10^5 /poço) em placa de 96 poços e tratadas com diferentes concentrações (100; 50; 25; 12,5; 6 e 3 µg/mL) dos compostos naturais e semissintéticos. Estas células foram utilizadas para analisar a atividade imunomoduladora e para avaliar a citotoxicidade das substâncias contra células normais.

4.5. Viabilidade Celular

A proliferação celular foi avaliada por meio do ensaio de Metiltiazoletrazolium (MTT) ¹¹⁷. Resumidamente, as linhagens celulares transformadas K562, HL-60, U937 e Vero (10⁴ células / poço) e as primárias (PBMCs, 10⁵ células / poço) foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços e tratadas com as concentrações (100; 50; 25; 12,5; 6 e 3 µg/mL) dos compostos em triplicata. As placas foram incubadas por 24, 48 e 72 hrs a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂.

Após o período de incubação, foi retirado o sobrenadante e adicionado 10µL de uma solução de MTT (5mg /mL) e 100µL de meio RPMI sem vermelho de fenol em cada poço, seguido por uma incubação a 37°C durante 4h. A reação foi interrompida utilizando 100µL de 0,1 N HCl em isopropanol anidro. O MTT é um método colorimétrico rápido, frequentemente utilizado para medir proliferação celular e citotoxicidade. Os sais de tetrazólio são reduzidos a formazan pela succinato desidrogenase mitocondrial, uma enzima que só é ativa em células com um metabolismo intacto e cadeia respiratória. Essa reação muda a cor do meio de incolor ou amarelo claro para violeta caso as células permaneçam viáveis após o tratamento com os compostos ¹¹⁷. A viabilidade celular foi verificada por meio das absorbâncias que foram medidas via espectrofotometria, utilizado um filtro de comprimento de onda de 570nm.

A viabilidade celular relativa das células foi estimada usando a seguinte equação: (expressa como absorbância óptica A₅₇₀ da amostra tratada) / (A₅₇₀ da amostra não tratada) × 100. Todos os testes foram feitos em triplicata.

4.6. Análise da ação dos compostos de acordo com ciclo celular

Para a determinação de qual fase do ciclo celular a ação dos compostos foi mais acentuada, as células K562 (5 X 10⁵ células / 500 µl/ poço) foram cultivadas em uma placa de 24 poços e incubadas com concentrações dos compostos referentes a IC₅₀ e 2xIC₅₀ por 48h a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂. Após a incubação, as células foram colhidas e fixadas com etanol 70% durante 24h a 4 ° C. O teste foi realizado com base no protocolo descrito anteriormente, com algumas modificações ¹¹⁸.

As células fixadas com etanol foram lavadas com PBS e incubadas em temperatura ambiente com 100µl de inibidor de ribonuclease (RNase A; 1mg / ml) e 10 µl de iodeto de propídio (PI, 50 µg / ml) e incubadas por 30 min em temperatura ambiente protegidas da luz. Após este período, as células foram analisadas por meio de citometria de fluxo (FACS Calibur, BD Biosciences, San Jose, CA) usando o módulo de discriminação de duplete, e os dados foram adquiridos usando o software Cell Quest (BD Biosciences). O ciclo celular foi modelado usando o software ModFit (Venty Software, Topsham, ME) e as porcentagens de células nas fases S, G1 e G2 M foram calculadas diretamente pelo software flowjow_v10.6.1.

4.7. Análise da atividade imunomoduladora

A análise da atividade imunomoduladora foi realizada conforme descrito anteriormente, com algumas modificações¹¹⁹. Resumidamente, as PBMC isoladas foram cultivadas em meio RPMI-1640 em microplaca de poliestileno de 96 poços e incubadas a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂ por um período de 24 horas, na presença das concentrações referentes a IC₅₀ e 2xIC₅₀ das substâncias.

O sobrenadante da cultura de PBMCs foi submetido a teste para verificar as concentrações das seguintes citocinas: IL-2 e IL-4, IL-6, IL-8 e IL-10. No geral, estas citocinas são responsáveis por influenciar a atividade, diferenciação, proliferação e a sobrevivência de células imunológicas que regulam a produção e a atividade de outras citocinas, potencializando ou inibindo a resposta pró-inflamatória. A dosagem foi realizada por meio de ensaio imunoenzimático (kits Boster Pleasant, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram normalizados para os níveis de proteína contidos em cada amostra e foram expressos em pg/mL de proteína total. Foram utilizados poços duplicata técnica para cada amostra individual.

4.8. Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados por meio do software GraphPad Prism (v.5.0). Todas as variáveis numéricas foram expressas por média ± desvio padrão ou mediana. Variáveis categóricas foram expressas por valor absoluto (n) e frequência relativa (%). Foram utilizados os teste Qui-quadrado ou exato de Fisher para variáveis categóricas. Teste 't' de student, Mann-Whitney ou ANOVA foram utilizados para avaliar citotoxicidade relativa das substâncias testadas. A IC₅₀ dos compostos foi calculada por meio do teste de regressão não linear.

5. RESULTADOS

5.1 Atividade anticancerígena

A atividade anticancerígena das substâncias B_r-Ell-SO₃Na, Z1, Z2 e pirazoloisoquinolina foi avaliada por meio da viabilidade relativa das células pós-tratamento com diferentes concentrações das substâncias, conforme descrito anteriormente. Foi observado que as quatro substâncias apresentaram atividade antiproliferativa significativa em comparação ao controle (células não-tratadas) nos três períodos de tratamento avaliados: 24, 48 e 72h. As substâncias B_r-Ell-SO₃Na e Z1 se destacaram em relação as demais, pois foi verificado valor de IC₅₀ de 3.69μM e 5.20μM contra a linhagem HL60, respectivamente. As menores atividades anticancerígena observadas foram das substâncias B_r-Ell-SO₃Na (IC₅₀=35 μM) e pirazoloisoquinolina (IC₅₀=25.27 μM) contra as células K562 (Figura 7). A tabela 4 apresenta os valores de IC₅₀ obtidos nos ensaios de atividade anticancerígena de todas as substâncias frente às linhagens celulares testadas.

Tabela 4. Citotoxicidade das substâncias contra linhagens celulares de neoplasias hematológicas

Substâncias	IC ₅₀ (μM)		
	Linhagens celulares		
	K562	U937	HL60
Z1	7.68	-	5.20
Z2	19.4	-	34.37
Pirazoloisoquinolina	25.27	>100	-
B _r -Ell-SO ₃ Na	35	-	3.69

A substância Br-ElI-SO₃Na demonstrou atividade anticancerígena significativa (figura 7 A) em comparação ao controle contra células K562, sendo observado um valor de IC₅₀ de 35µM (figura 7 B). Quanto à substância pirazoloisoquinolina, foi verificada uma atividade anticancerígena significativa a partir da concentração 50µg/mL (Figure 7 C) com IC₅₀ de 25.27µM (Figura 7 D).

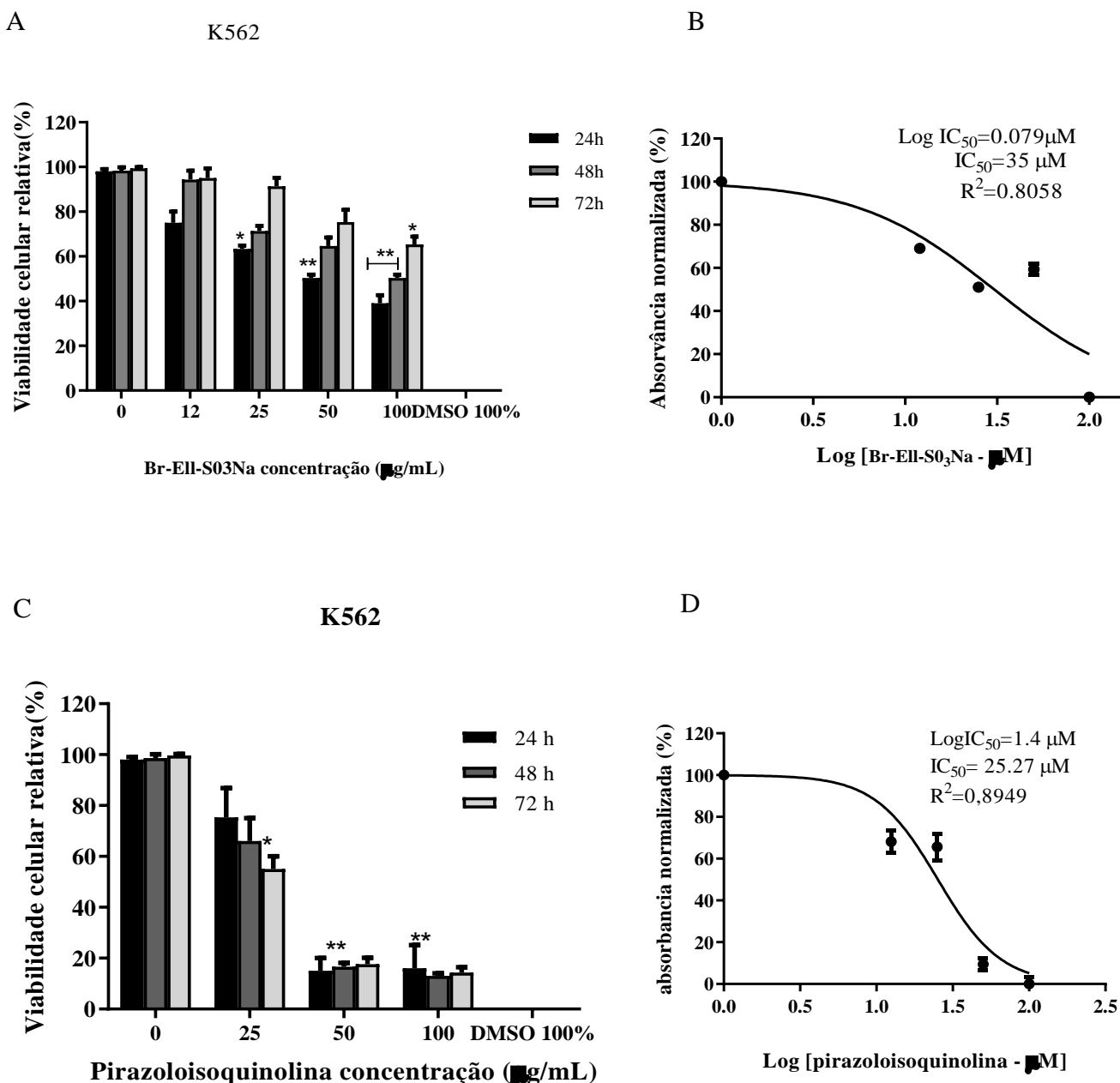


Figura 7. Atividade anticancerígena das substâncias Br-ElI-SO₃Na e pirazoloisoquinolina em linhagem K562. Células foram tratadas com as concentrações 12-100µg/mL da substância Br-ElI-SO₃Na (A) e pirazoloisoquinolina (C) por 24, 48h e 72h. Os dados são representados como desvio padrão (SD). (B) e (D) Regressão não-linear e IC₅₀. A análise estatística foi feita através do teste t de Student e ANOVA. Um valor de probabilidade inferior a 0,05 foi escolhido como critério de significância estatística. *: p <0,01; **: p <0,001; quando comparado ao controle negativo (células não tratadas).

Em relação às substâncias Z1 e Z2, foi verificada atividade antiproliferativa em todas as concentrações (3-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e em todos os períodos de tratamento testados. Ao se realizar a regressão não-linear, foi observado valores de IC_{50} de 7.68 e 19.24 μM para as substâncias Z1 e Z2, respectivamente (figura 8).

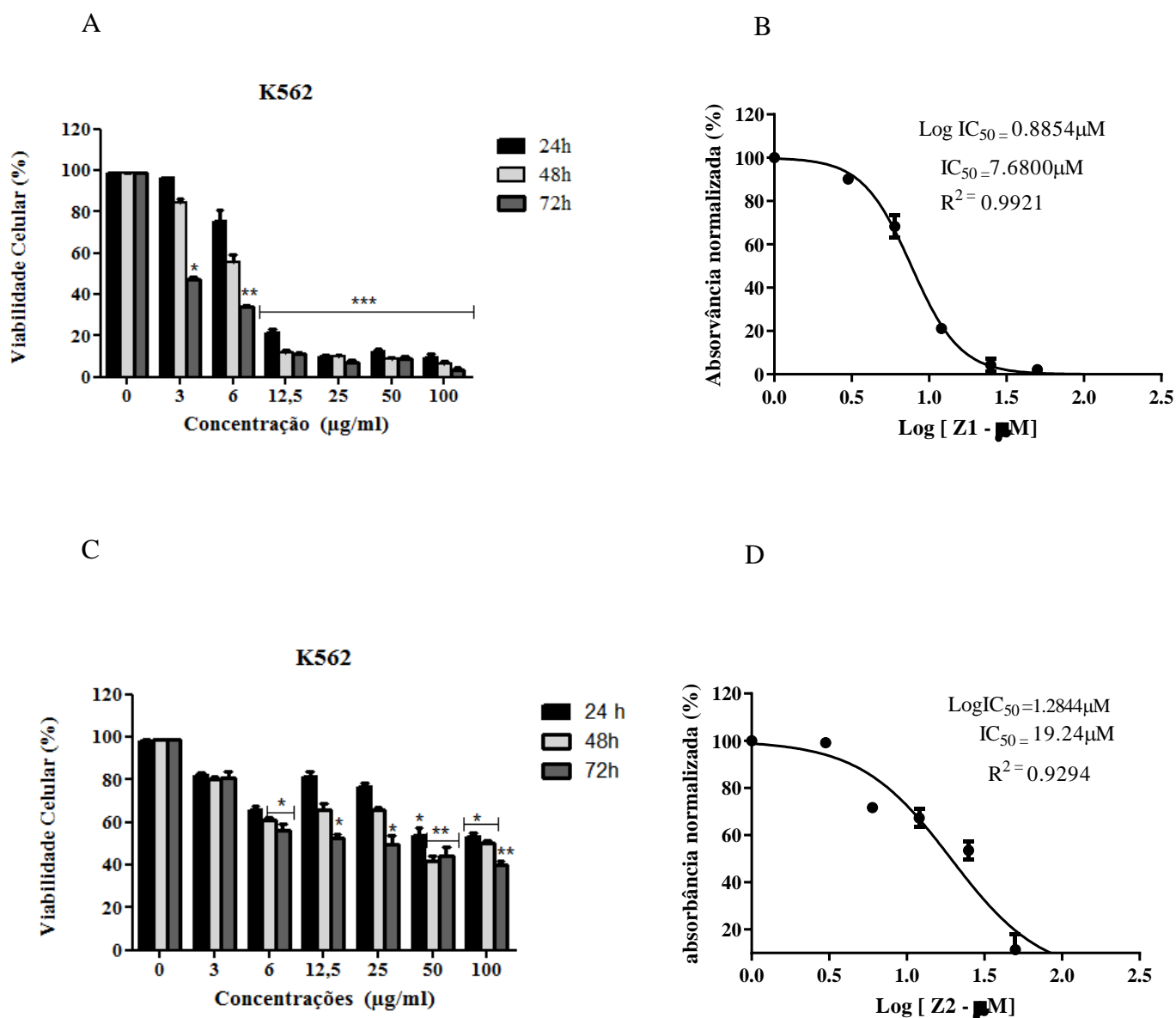


Figura 8. Atividade anticancerígena das substâncias Z1 e Z2 em linhagem K562. (A) Células foram tratadas com as concentrações 25-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 24, 48h e 72h. Os dados são representados como desvio padrão médio aritmético (SD). (B) Regressão não-linear e IC_{50} . A análise estatística foi feita através do teste t de Student e ANOVA. Um valor de probabilidade inferior a 0,05 foi escolhido como critério de significância estatística. *: $p < 0,01$; **: $p < 0,001$ ***; $p < 0,001$; quando comparado ao controle negativo (células não tratadas).

Apenas a substância pirazoloisoquinolina teve sua atividade anticancerígena avaliada contra a linhagem U937. Porém, não foi verificada atividade antiproliferativa significativa (Figura 9). Devido a problemas técnicos (interrupção no fornecimento de energia elétrica e problemas com a estufa de CO₂), não foi possível avaliar a atividade anticancerígena das substâncias Br-Ell-SO₃Na, Z1 e Z2 contra células U937.

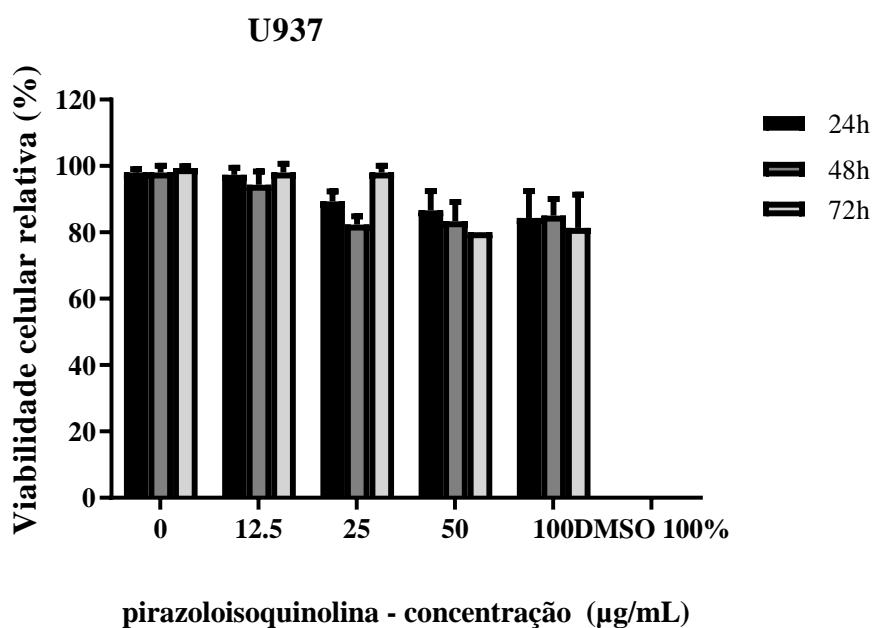


Figura 9. Atividade anticancerígena da substância pirazoloisoquinolina em linhagem U937. Células tratadas nas concentrações 12-100 µg/mL por 24, 48 e 72h. Os dados são representados como desvio padrão (SD). A análise estatística foi feita através do teste t de Student e ANOVA. Um valor de probabilidade inferior a 0,05 foi escolhido como critério de significância estatística.

Ao se avaliar a atividade da substância Br-ElI-SO₃Na contra a linhagem HL60, foi verificada atividade antiproliferativa em todas as concentrações testadas (figura 10 A), sendo observado um valor de IC₅₀ de 3.69 μM (figura 10 B).

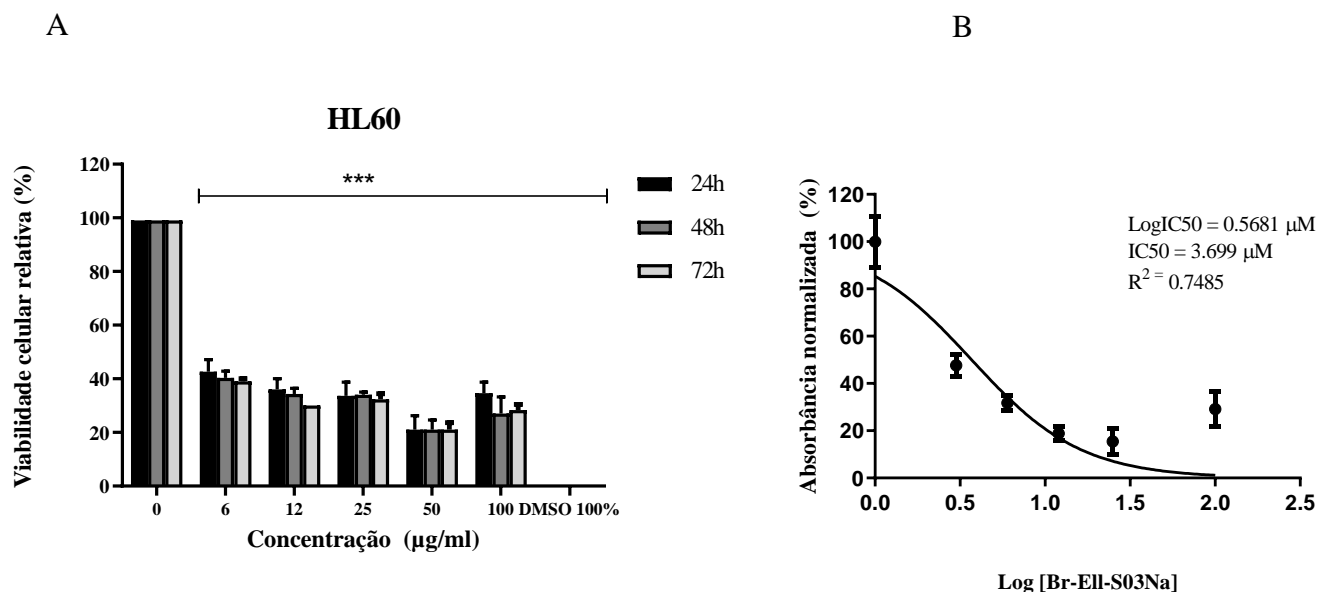


Figura 10. Atividade anticancerígena da substância Br-ElI-SO₃Na em linhagem HL60. (A) As células foram tratadas nas concentrações 6-100 μg/mL por 24, 48 e 72h. Os dados são representados como desvio padrão (SD). (B) Regressão não-linear e IC₅₀. A análise estatística foi feita através do teste t de Student e ANOVA. Um valor de probabilidade inferior a 0,05 foi escolhido como critério de significância estatística. *: p < 0,01; **: p < 0,001 quando comparado ao controle negativo (células não tratadas).

A substância Z1 também apresentou atividade antiproliferativa contra a linhagem HL-60 nas concentrações de 6-100µg/mL após 24, 48 e 72h de incubação (IC₅₀ de 5.20µM). Por outro lado, a substância Z2 apresentou menor ação antiproliferativa, pois foi verificado um valor de IC₅₀ de 34.37 µM (Figura 11).

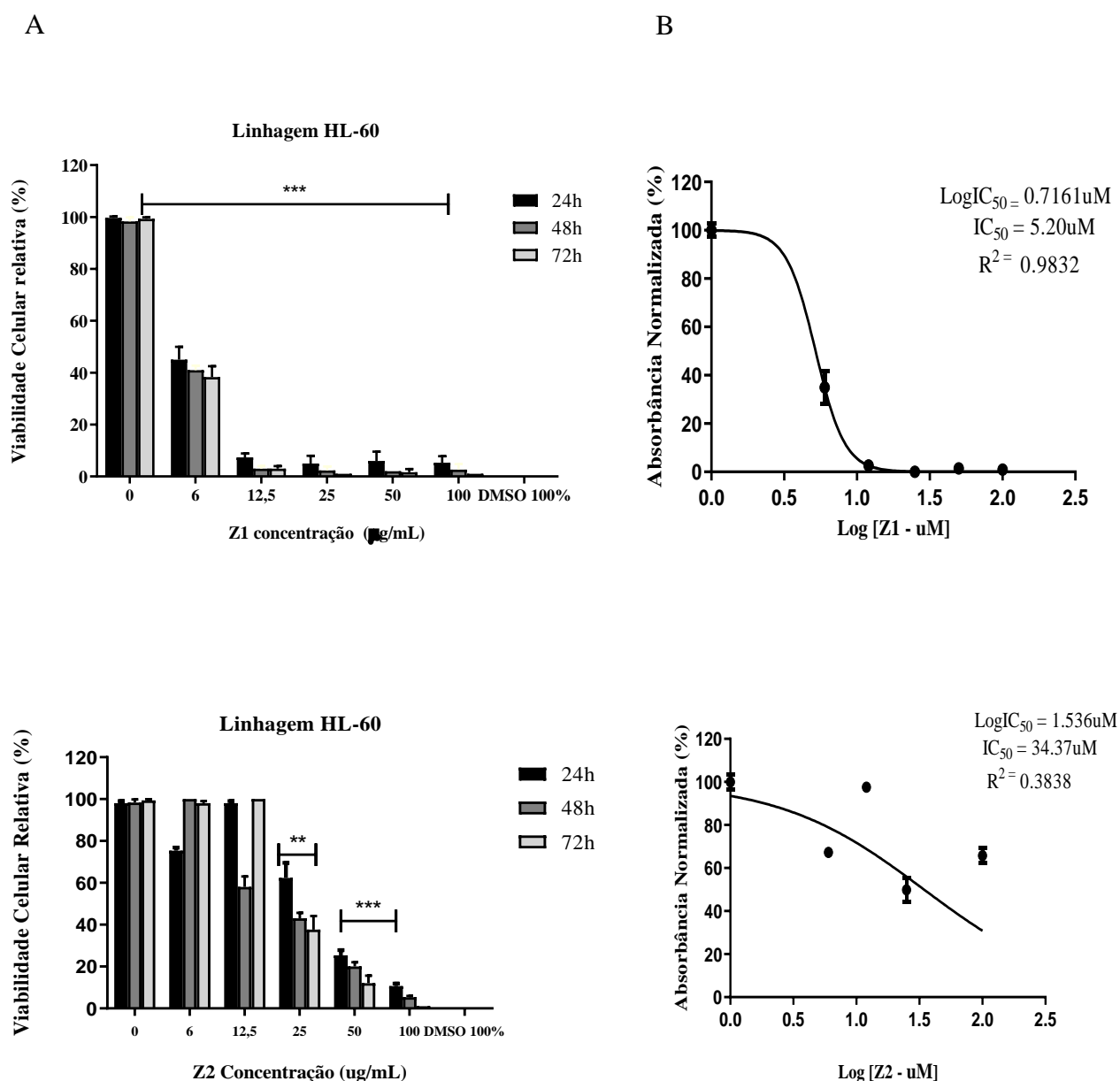


Figura 11. Atividade anticancerígena das substâncias Z1 e Z2 em linhagem HL60. (A) Células foram tratadas com as concentrações 6-100 µg/mL por 24, 48 e 72h. Os dados são representados como desvio padrão médio aritmético (SD). (B) Regressão não-linear e IC₅₀. A análise estatística foi feita através do teste t de Student e ANOVA. Um valor de probabilidade inferior a 0,05 foi escolhido como critério de significância estatística. *: p <0,01; **: p <0,001 ***; p <0,001; quando comparado ao controle negativo (células não tratadas).

5.2. Atividade citotóxica contra células não cancerígenas

Com o objetivo de avaliar a citotoxicidade frente as células não cancerígenas, PBMC humano e a linhagem celular Vero foram submetidas ao tratamento com diferentes concentrações das substâncias testadas. PBMC humano foi tratado com as concentrações referentes aos valores de IC_{50} e $2xIC_{50}$ para linhagem K562 (Figura 12) e não foi observado ação citotóxica de todas as substâncias testadas (Figura 13).

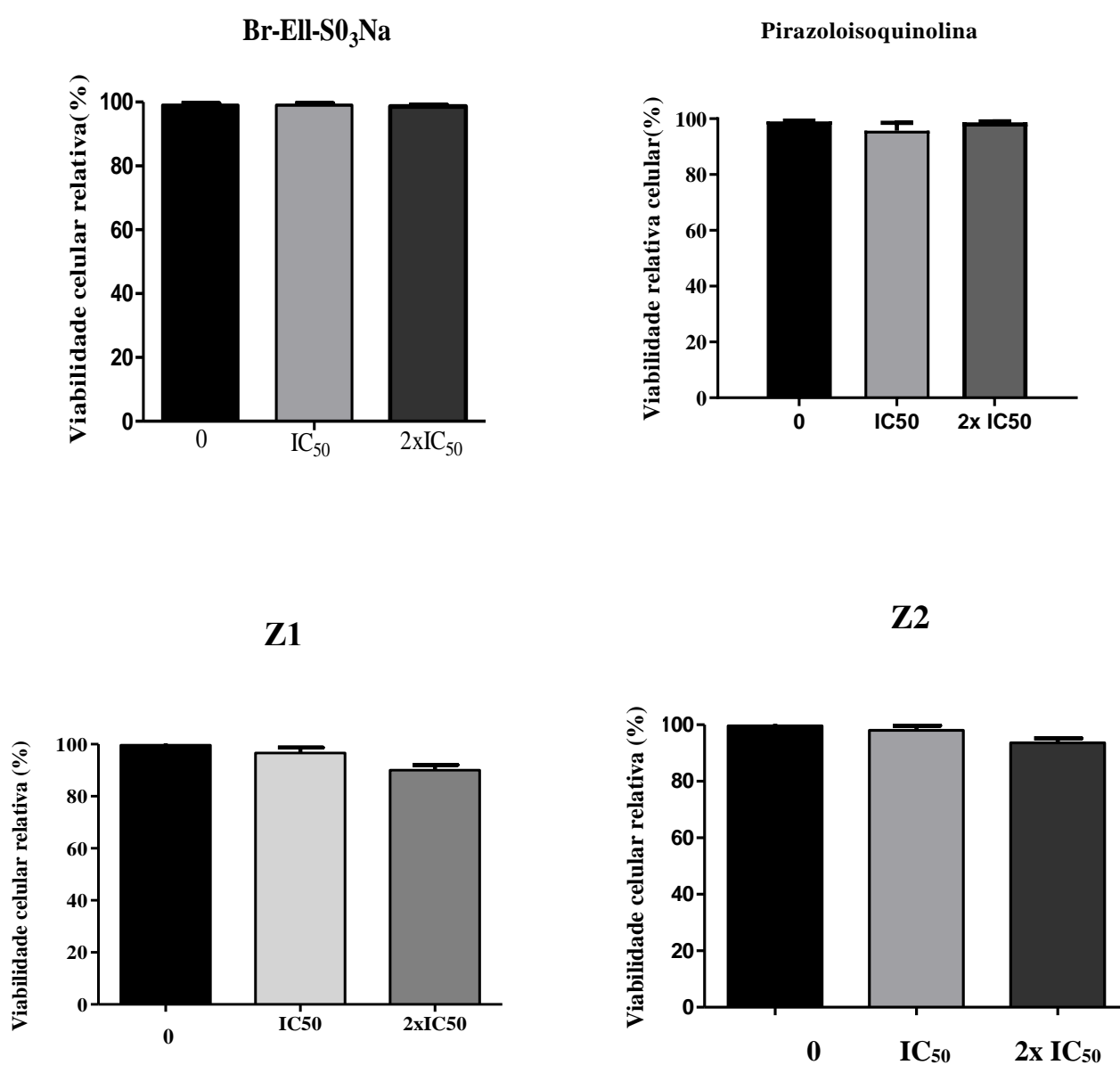


Figura 12. Atividade citotóxica das substâncias em PBMC humano. As células foram tratadas com concentrações que correspondem aos valores de IC_{50} e $2xIC_{50}$ para linhagem K562.

A linhagem Vero foi tratada com concentrações que variaram de 12 a 100 µg/mL. Os resultados demonstraram que apenas a substância pirazoloisoquinolina apresentou citotoxicidade contra células Vero na concentração 100 µg/mL após 72 horas de tratamento ($p=0,001$). A ausência de atividade citotóxica em células não cancerígenas (em quase todas as concentrações testadas) demonstra que atividade citotóxica observada nas substâncias testadas é direcionada apenas contra células cancerígenas (Figura 13).

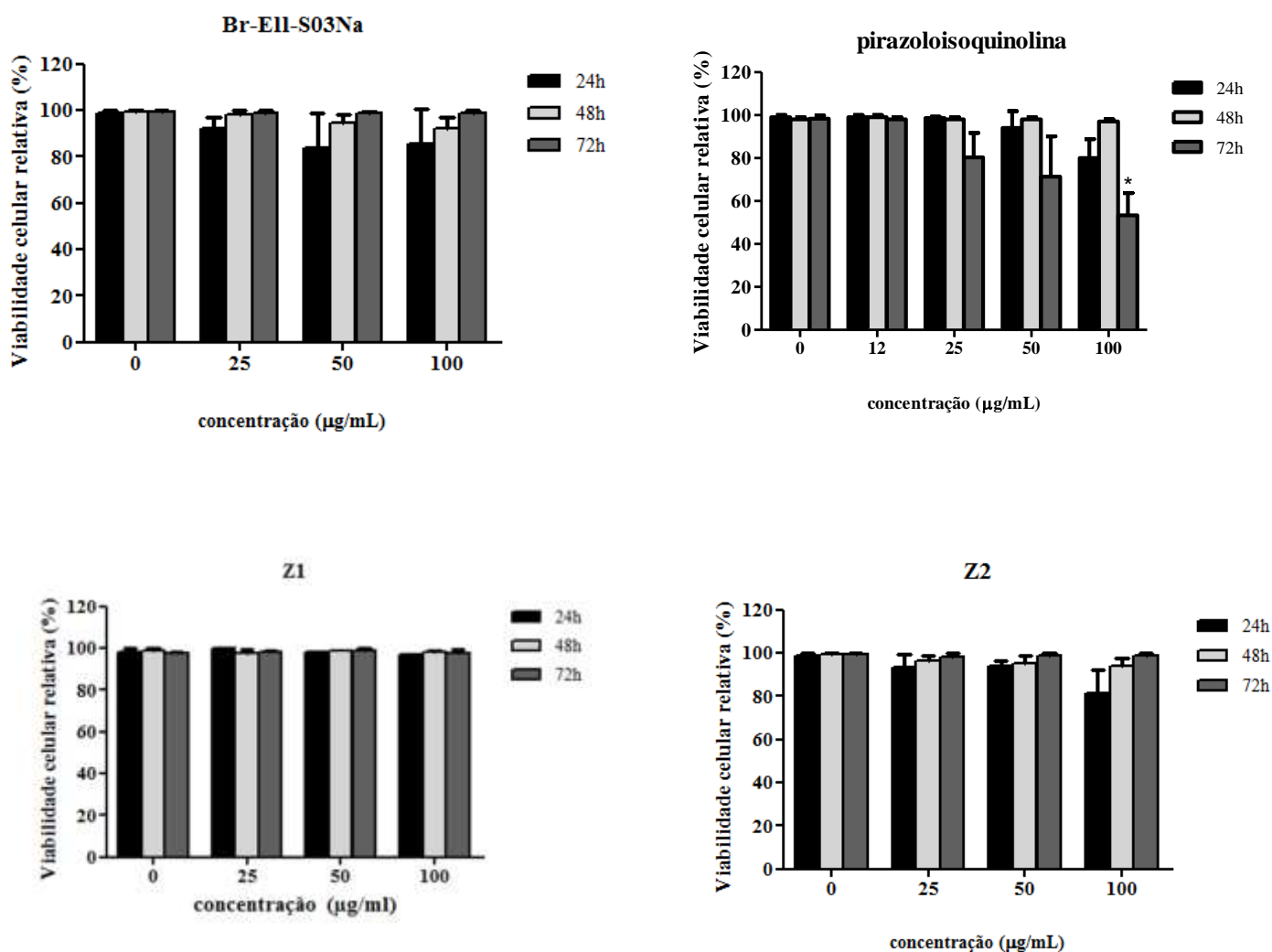


Figura 13. Viabilidade celular da linhagem Vero. Células tratadas com as concentrações 100, 50, 25, 12 e 6 µg/mL nas cinéticas de 24, 48 e 72h das testadas.

5.3. Análise do Ciclo Celular

Para a determinação de qual fase do ciclo celular a ação das substâncias B_r-Ell-SO₃Na, pirazoloisoquinolina e Z1 e Z2 seriam mais acentuadas, células da linhagem K562 foram tratadas nas concentrações referentes aos valores de IC₅₀ e 2xIC₅₀ e posteriormente avaliadas por citometria de fluxo, conforme descrito anteriormente¹¹⁸. Como pode ser observado na figura 14 A, a distribuição na fase G2 aumentou significamente (p=0,001) após tratamento com a substância Z1. Ocorreu um aumento de 0% para 16% após tratamento com a concentração equivalente a IC₅₀ e para 12% no tratamento com 2x IC₅₀ (figura 14 B).

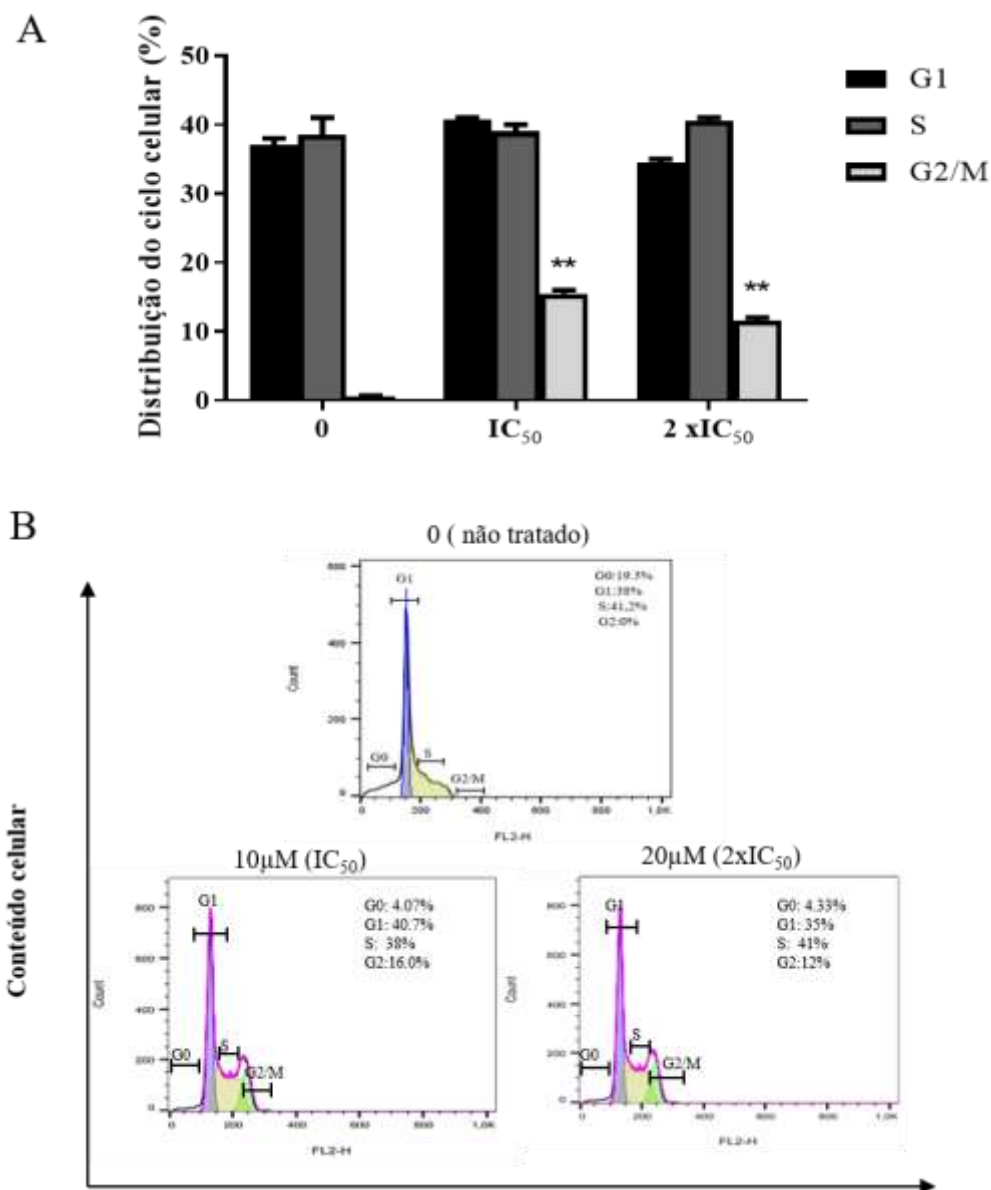


Figura 14. Análise do ciclo celular das células k562 tratadas com Z1. (A) Análise da distribuição do ciclo celular em células K562 não tratadas (0 -controle) e tratadas (IC₅₀ e 2xIC₅₀) com Z1; (B) micrografias representativas do ciclo celular de células K562 sensíveis, descrevendo a população de células K562 não tratadas (controle) e tratadas com Z1, que sofreram “arrest” (captura) nas fases G0, G1, S e G2/M . **p=0.001.

Em relação à substância Z2, após tratamento com 20 e 40 μ g/mL, foi verificado um aumento da distribuição na fase G2. Na concentração de 20 μ g/mL foi observado um aumento de 26.6% (p=0.01) enquanto que na concentração de 40 μ g/mL o aumento foi de 23.1% (p=0.01) (figura 15). Os resultados obtidos sugerem que os compostos Z1 e Z2 podem ser eficazes na interrupção do ciclo celular na fase G2 e G1, respectivamente. Tal atividade impede a proliferação de células tumorais no início do ciclo celular. No entanto, testes adicionais são necessários para melhor compreender o mecanismo de ação dessas substâncias.

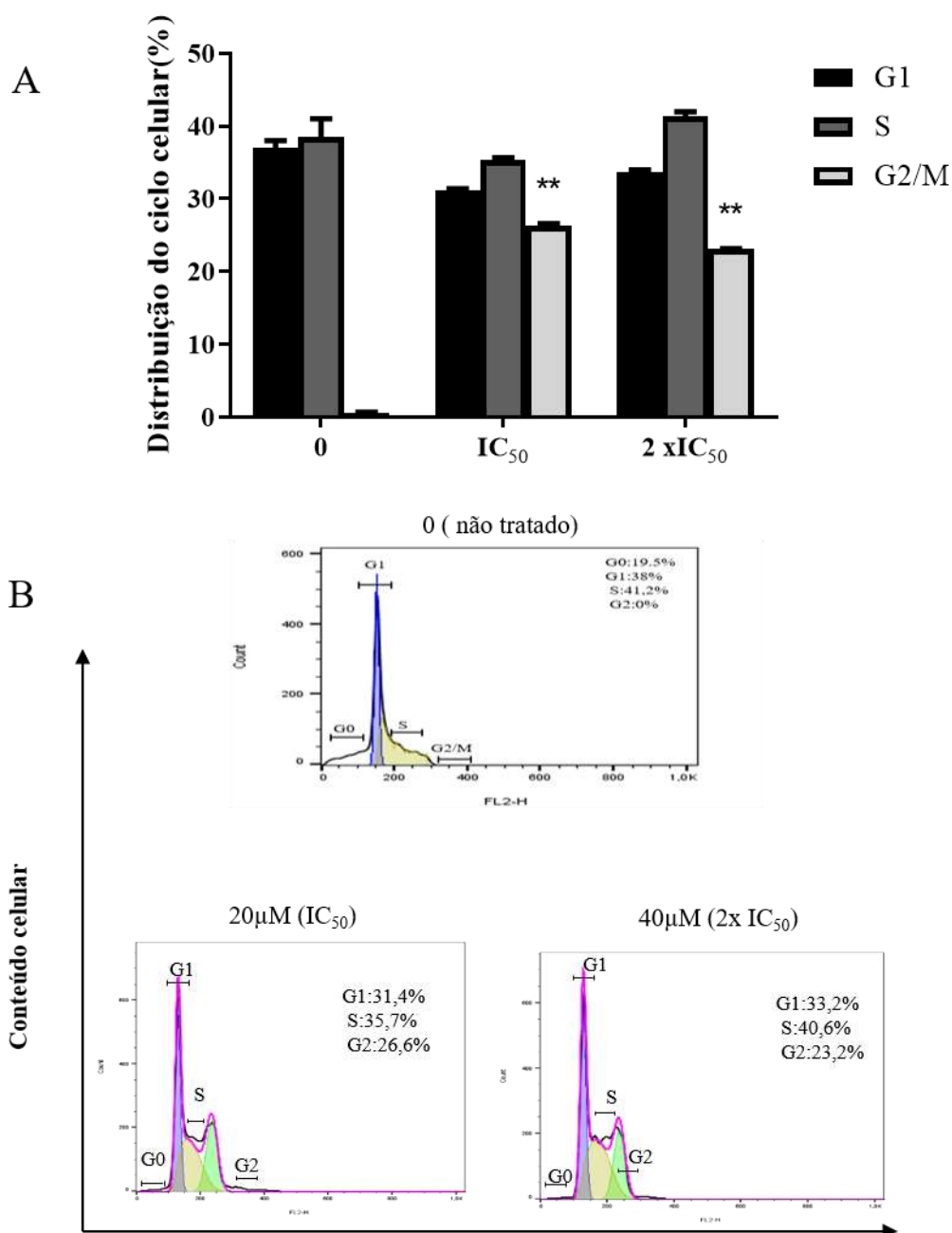


Figura 15. Análise do ciclo celular das células k562 tratadas com Z2. Análise da distribuição do ciclo celular em células K562 não tratadas (0 -controle) e tratadas (IC₅₀ e 2xIC₅₀). A análise estatística foi feita através do teste t de Student e ANOVA. Um valor de probabilidade inferior a 0,05 foi escolhido como critério de significância estatística. *: p <0,01; **: p <0,001; ***: p <0,0001 quando comparado ao controle (células não tratadas).

Quando as células foram tratadas com a substância Br-Ell-SO₃Na na concentração de 35 µg/mL, a distribuição da fase S (53%) aumentou significativamente (P<0,001) em comparação com o controle (41%) e houve 0% de células na fase G2, demonstrando a interrupção do ciclo celular na fase S. Ao dobrar a concentração da substância (70 µg/mL), observou-se que a maior taxa de distribuição continuou na fase S (50%), contudo foi observado um leve aumento na fase G2 (9%). Tais resultados sugerem a substância Br-Ell-SO₃Na interrompe a progressão do ciclo celular ao inibir síntese de DNA celular (figura 16).

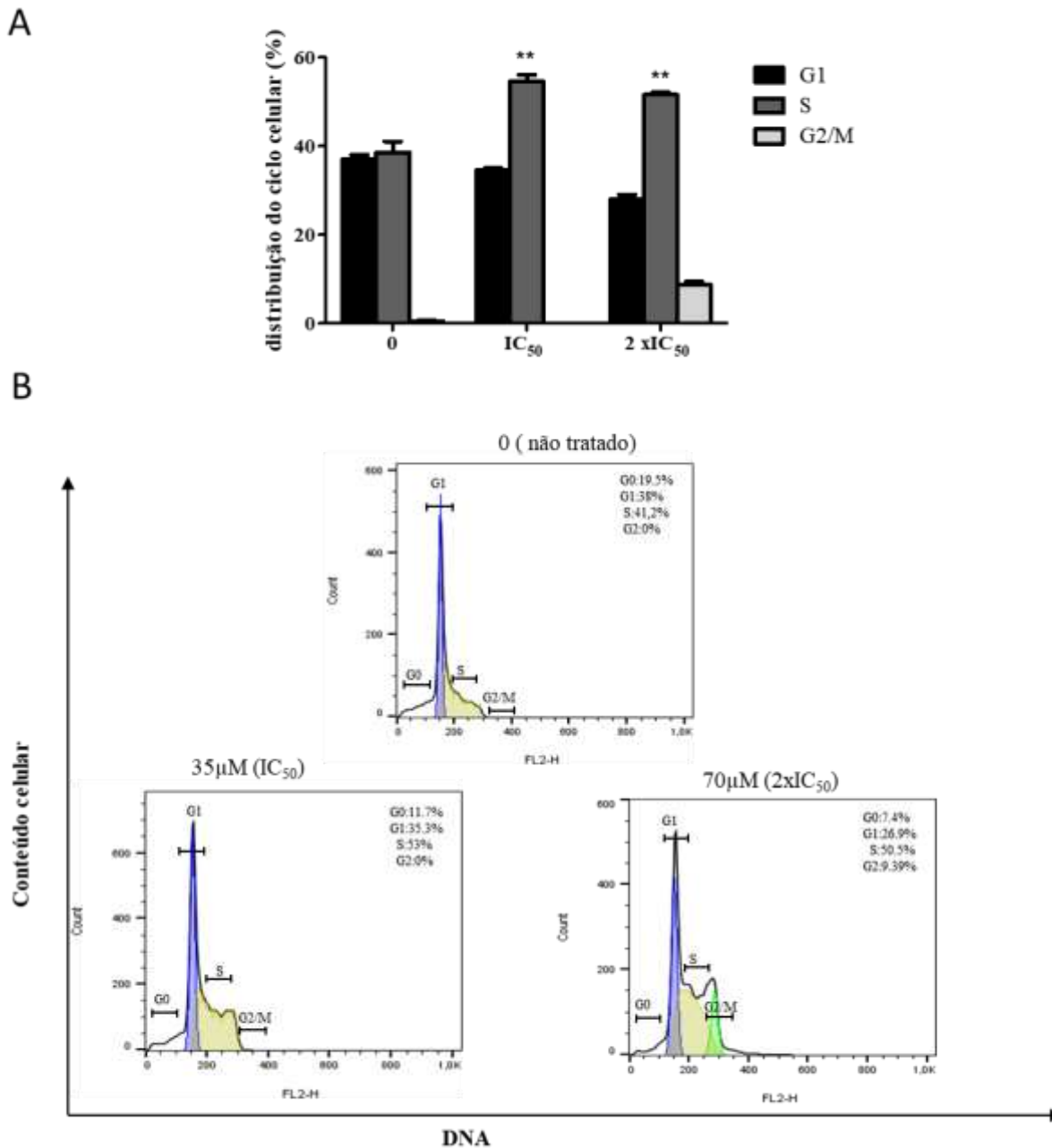


Figura 16. Análise do ciclo celular das células K562 tratadas com Br-Ell-SO₃Na. (A) Análise da distribuição do ciclo celular em células K562 não tratadas (0 -controle) e tratadas (IC₅₀ e 2xIC₅₀) com Br-Ell-SO₃Na; (B) micrografias representativas do ciclo celular de células K562 sensíveis, descrevendo a população de células K562 não tratadas (controle) e tratadas com Br-Ell-SO₃Na, que sofreram “arrest” (captura) nas fases G0, G1, S e G2/M . **p=0.001.

Quanto à substância pirazoloisoquinolina, após o tratamento com a concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$, a distribuição da fase S aumentou significativamente de 41.2% para 50.6%. Também foi observado um aumento de 16.1% de células na fase G2, sugerindo a interrupção do ciclo celular ocorre também na fase G2 ($p=0.001$). (Figura 17).

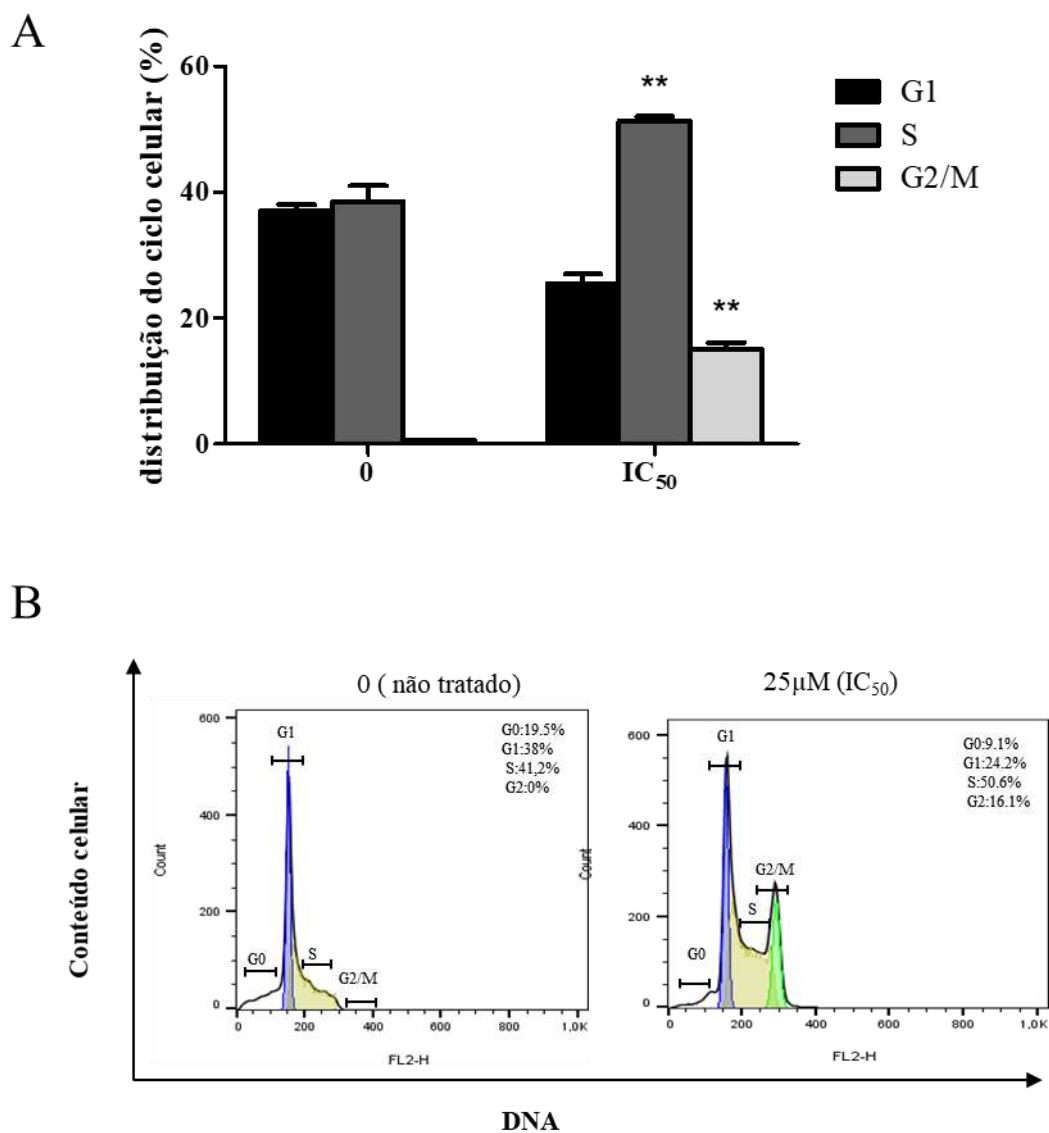


Figura 17. Análise do ciclo celular das células K562 tratadas com pirazoloisoquinolina. (A) Análise da distribuição do ciclo celular em células K562 não tratadas (0 -controle) e tratadas (IC₅₀ and 2xIC₅₀) com spirazoloisoquinoline; (B) micrografias representativas do ciclo celular de células K562 sensíveis, descrevendo a população de células K562 não tratadas (controle) e tratadas com spirazoloisoquinoline, sofreram “arrest” (captura) nas fases G0, G1, S e G2/M . * $p=0.001$.

5.4. Atividade imunomoduladora

Para avaliar os efeitos das substâncias Br-Ell-SO₃Na, pirazoloisoquinolina, Z1 e Z2 sobre o sistema imune, as citocinas pró-inflamatórias IL-2 IL-6 e IL-8 e as citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 foram dosadas a partir do sobrenadante da cultura de PBMCs humano tratados com as substâncias.

Os resultados demonstraram que as substâncias Br-Ell-SO₃Na e pirazoloisoquinolina, estimularam a expressão da IL-6 em níveis estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em comparação ao controle. Por outro lado, as substâncias Br-Ell-SO₃Na, pirazoloisoquinolina e Z2 inibiram a expressão de IL-8 ($p = 0,01$) (Figura 18). Nenhuma das substâncias analisadas interferiu na expressão das citocinas IL-4, IL-2 e IL-10. Estes dados sugerem que as substâncias Br-Ell-SO₃Na, pirazoloisoquinolina e Z1, além de possuírem atividade anticancerígena também possuem atividade imunomoduladora.

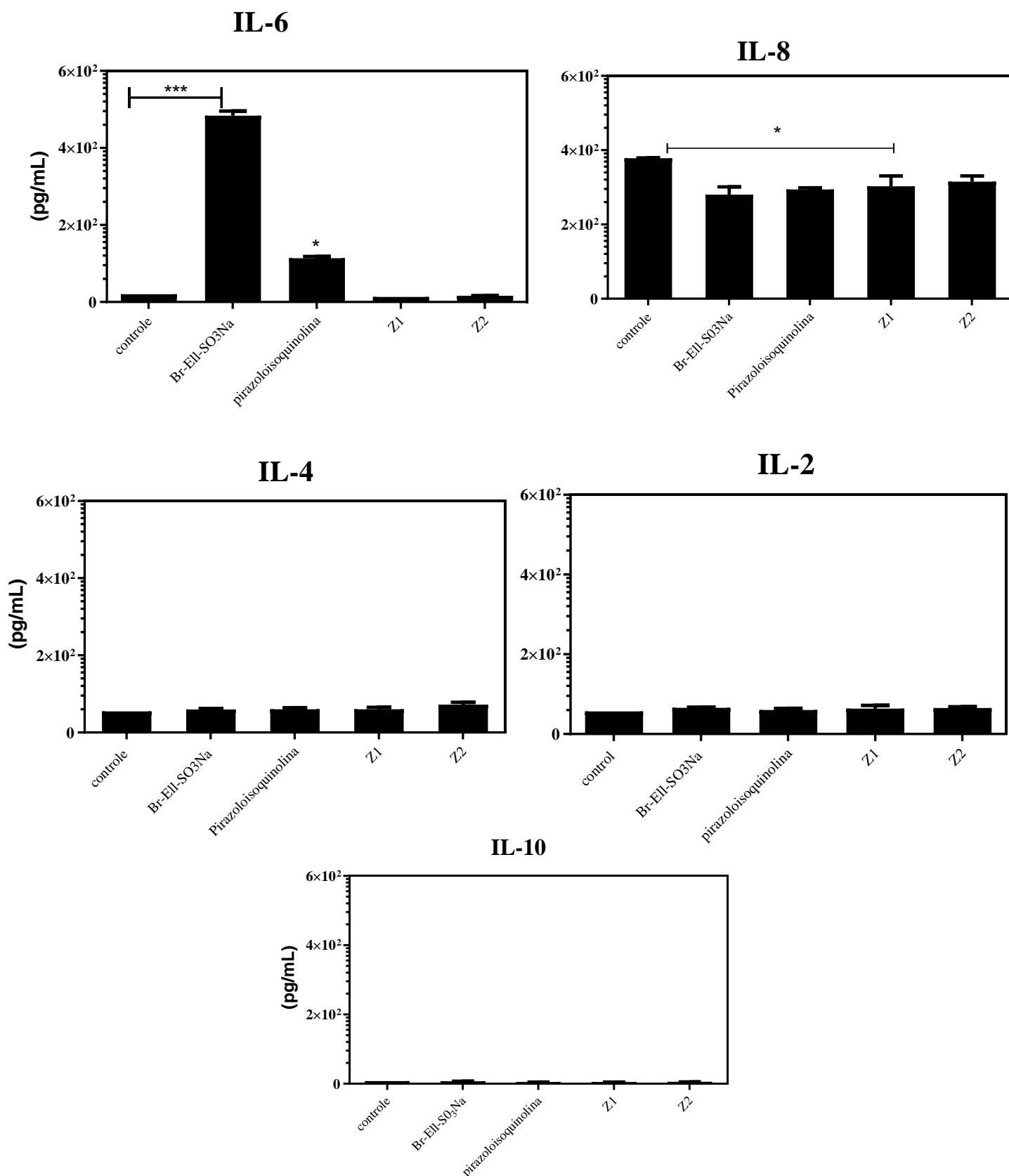


Figura 18: Efeito das substâncias sobre o sistema imune. Níveis de IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, e IL-10 foram analisados por ELISA em sobrenadantes de PBMC humano tratados com as substâncias (IC₅₀). Controle representam os sobrenadantes de PBMCs que não foram submetidos ao tratamento. Todos os testes foram feitos em triplicata. *p=0.01; ***p=0.001

6. DISCUSSÃO

Embora avanços substanciais no tratamento do câncer tenham sido alcançados nas últimas décadas, questões críticas como alta toxicidade e disponibilidade de medicamentos, avaliação de custo-benefício e eficácia continuam sendo o principal gargalo no desenvolvimento de medicamentos contra o câncer. Portanto, a busca por novas alternativas terapêuticas configura uma necessidade real no corrente cenário. Assim, diante deste contexto, este estudo avaliou a atividade anticancerígena e imunomoduladora de compostos químicos derivados de elipticina, zerumbona e do composto pirazoloisoquinolina.

A elipticina e seus derivados são uma classe de agentes quimioterápicos promissores no tratamento alternativo das neoplasias ¹²⁰. Com este enorme interesse sobre a elipticina, várias rotas sintéticas para a molécula principal e seus derivados surgiram a partir da abordagem de R. Woodward ¹²¹. Contudo, a baixa solubilidade, juntamente com intensos efeitos colaterais dos derivados de elipticina, tem limitado o uso desses compostos na medicina ^{122, 155}. Neste estudo, utilizamos um novo derivado da elipticina solúvel em água (Br-Ell-SO₃Na) que inibiu a proliferação de células leucêmicas HL60, K562 e não demonstrou atividade citotóxica contra células não cancerígenas.

Um estudo realizado por Russel G e colaboradores (2015), avaliou a atividade antiproliferativa de um derivado de elipticina, (7-formil-10-metilisoelipticina) contra a linhagem celular MV4-11 (leucemia). Durante um período de 96 horas, na concentração de 5 μM, verificou-se uma inibição de crescimento celular de até 96% ¹²³. Stiborová M e colaboradores (2011) avaliaram a ação citotóxica da elipticina frente as células leucêmicas, onde verificou o valor de IC₅₀ de 0.67 μM na linhagem HL-60 e 4.70 μM na linhagem CCRF-CEM. ¹²⁰. O derivado de elipticina solúvel em água (Br-Ell-SO₃Na) apresentado neste estudo inibiu a proliferação de células leucêmicas HL-60 com um valor de IC₅₀ de 3.69 μM, e não mostrou atividade de citotoxicidade contra células não-cancerígenas, o que demonstra seu potencial no desenvolvimento de novos fármacos contra neoplasias hematológicas.

Atualmente, os alcaloides e seus derivados são de grande interesse no tratamento alternativo de neoplasias. No presente estudo, verificou-se que a substância alcaloide pirazoloisoquinolina, apresentou efeito anticancerígeno contra a linhagem K562 com IC₅₀ de 25.27 μM, não sendo também observado efeitos citotóxicos contra células não cancerígenas. Este resultado difere de um estudo que avaliou uma síntese de esteroidais tetrazóis contra células HeLa (câncer cervical), KCL-22 (leucemia mielóide) e células mononucleares de sangue periférico (PBMC) ¹²⁴, que apesar de não ter verificado também atividade citotóxica contra células normais, apresentaram IC₅₀ que variaram de 64 a 69 μg/mL, valores bem superior ao apresentado pelo presente estudo. Em outro estudo, avaliou-se o potencial citotóxico *in vitro* do óleo essencial da folha de *Guatteria megalophylla* (Annonaceae) contra diversas células cancerígenas, onde verificou-se um valor de IC₅₀ de 12,51 μg/mL contra células da

linhagem HL-60¹²⁵. Estes dados corroboram os resultados obtidos no presente estudo ao demonstrar que os derivados de alcaloides são promissores agentes anticancerígenos.

Netto *et al.*, (2010) avaliaram a citotoxicidade de uma substância sintética derivada de pterocarpanquinona, classe de substâncias com efeito antineoplásico que apresentaram valores de IC₅₀ de 2.75 a 3.10µM em células leucêmicas (k562, Lucena-1 e HL-60) e de linfoma (Daudi), respectivamente. Além disso, o composto pterocarpanquinona não apresentou efeito citotóxico em células não cancerígenas ¹²⁶. Os resultados obtidos no presente estudo, são semelhantes visto a substância pirazoloisoquinolina apresentou valor de IC₅₀ de 25µM/mL. No entanto, a pirazoloisoquinolina não apresentou atividade citotóxica contra células normais, atividade considerada essencial para desenvolvimento de medicamentos antineoplásico.

Recentemente, estudos mostraram que a zerumbona tem potencial terapêutico para tratar câncer de fígado e pulmão, atuando principalmente no aumento da apoptose e inibição da invasão celular ¹²⁷. Sakinah *et al.*, 2007, avaliaram atividade antiproliferativa na linhagem HepG2 com sesquiterpeno zerumbona, onde observaram o efeito inibitório da zerumbona sobre o crescimento de células cancerígenas HepG2 (IC₅₀ de 3,45 ± 0,026 µg / ml) ¹²⁸. No presente estudo, dos derivados de zerumbona testados (Z1 e Z2), observou-se que a substância Z1 apresentou maior efeito antiproliferativo, com o valor de IC₅₀ de 5.20µM para células HL-60, não sendo observada ação citotóxica contra células não cancerígenas. Estes dados são de grande importância para a pesquisa de novas substâncias com potencial anticancerígeno, visto que o tratamento tradicional para neoplasias hematológicas além de apresentar custos elevados, podem causar efeitos colaterais tóxicos para células normais.

No estudo de Hoffmann *et al.*, (2002) observou-se que a zerumbona em concentrações específicas possui um papel regulador no redox intracelular, atenuando a proliferação de células cancerígenas, mas não das células normais, podendo agir como um agente anticancerígeno ¹²⁹. Além disso, outros estudos observaram que agentes antineoplásicos medeiam a parada do ciclo celular na fase G2/M em diferentes processos, como interrupção da polimerização da tubulina, complexos de ciclinas^{130,131}. Seguindo este contexto, verificamos se as substâncias Z1 e Z2 poderia interromper o ciclo celular em células K562. Os resultados obtidos demonstraram que as substâncias Z1 e Z2 induziram a interrupção do ciclo celular na fase G2/M. Kirana *et al.*, (2009), verificaram que a zerumbona apresentava ação antiproliferativa em células HT-29, causando inibição da síntese de DNA e bloqueio das células nas fases G0/G1 em baixas concentrações e na fase G2/M em altas concentrações ¹³². Entretanto, são necessários estudos adicionais para maior esclarecimento dos mecanismos de ação destas substâncias (Z1 e Z2) contra neoplasias hematológicas.

Até o momento, na literatura há pouco relato sobre a atividade antiproliferativa da zerumbona e seus análogos frente a neoplasias hematológicas¹²⁷. Porém, já foi relatado na literatura, atividades

anticancerígenas de outras substâncias contra estas patologias. Por exemplo, já foi verificado que os alcaloides e suas sínteses são considerados compostos bastante promissores como fonte terapêutica utilizada como protótipos na pesquisa de novos fármacos com atividade neoplásica. No estudo de Dantas e colaboradores (2015), verificou-se que a curina, um alcalóide isolado do *Chondrodendron platyphyllum*, demonstrou efeito citotóxico nas linhagens celulares leucêmicas K562 e HL-60. Os efeitos citotóxicos nas células HL-60 foram relacionados a danos na membrana plasmática e parada do ciclo celular na fase G1 de $43,4 \pm 1,0$ a $56,7 \pm 1,4\%$ ($p = 0,05$) após 48h de incubação com concentração de 15uM do composto¹¹⁸.

Considerando que as células neoplásicas estimulam seu próprio crescimento reduzindo os sinais inibitórios que controlam a proliferação celular, é importante verificar o efeito das substâncias sobre o ciclo celular. Observou-se que a substância pirazoloisoquinolina, induziu a captura de células na fase S (50.6%) em comparação ao controle, além de ter sido observado redução de 16% na fase G2, o que sugere indução da apoptose celular. Em um levantamento, realizado por Habli e colaboradores (2017), sobre a importância de diversos alcaloides promissores com potencial antineoplásico e a capacidade de atuar nos pontos de verificação induzindo a parada do ciclo celular, foi verificada que a noscapina, isolada da flor de ópio (*Papaver somniferum*), causou a indução na parada do ciclo celular na fase G2 /M em vários tipos de neoplasias¹³³. Estes dados reforçam que alcaloides e seus análogos tem potencial terapêutico, agindo como agente antiproliferativo, causando danos no DNA e induzindo a apoptose de células cancerígenas.

Em relação a substância Br-Ell-SO₃Na, observou-se que a mesma induz a interrupção do ciclo celular na fase S. Na literatura, a maior parte dos estudos mostram que a elipticina e seus derivados induz a parada do ciclo celular na fase G1¹²³. Nossos dados demonstraram que o mecanismo de ação da substância Br-Ell-SO₃Na referente ao ciclo celular é diferente dos mecanismos relatados, visto que induz a inibição da síntese do DNA. Contudo, é importante ressaltar que a atividade biológica da elipticina se dá por diferentes mecanismos de ação. O mecanismo mais extensivamente examinado é a interação com o DNA. Estas interações incluem intercalação de DNA, inibição da topoisomerase II, inibição da quinase AKT associada à parada do ciclo celular e apoptose de células cancerígenas^{134, 135, 136}. Embora os dados sugiram que o mecanismo de ação Br-Ell-SO₃Na esteja relacionado ao comprometimento da síntese de DNA em células cancerígenas, neste estudo não verificamos a influência direta do Br-Ell-SO₃Na na intercalação da atividade da topoisomerase II.

A patogênese e o tratamento do câncer estão diretamente relacionados ao sistema imunológico¹³⁷. Por exemplo, o status imunossupressor geralmente induzido pela patogênese do tumor pode ser alterado pelos efeitos imunomoduladores de drogas anticâncer, como inibidores checkpoints de verificação imunes^{138,139}. Nesse sentido, os agentes químicos mais promissores na batalha contra o

câncer são os que podem modular o sistema imunológico através da supressão ou aprimoramento da resposta imune, alterando seu tipo, escopo ou duração ^{140,141}.

Neste estudo, foi avaliado o potencial imunomodulador de todas as substâncias testadas. Nossos resultados demonstraram que as substâncias Br-Ell-SO₃Na e pirazoloisoquinolina, estimularam a expressão da IL-6. Em estudos anteriores, foi demonstrado que a IL-6 é crucial na mobilização da resposta imune de células T antitumorais e na ativação, proliferação e sobrevivência de linfócitos durante respostas imunes ativas ^{142,143}. Mais importante ainda, a sinalização da IL-6 também pode reformular a resposta imune das células T, convertendo-a de um estado supressivo para um responsivo, importante para combater tumores ¹⁴⁴. Por outro lado, essa citocina tem sido amplamente associada à progressão tumoral e metástase ^{145,146}. Assim, o papel da sinalização trans ativador da IL-6 no contexto do câncer pode depender de muitos fatores do microambiente do tumor, como tipo de célula, localização do tumor ou gravidade do câncer ¹⁴³.

As citocinas pró-inflamatórias têm desempenhado um papel importante nos estágios da carcinogênese. Como observado, no estudo realizado por Aung e colaboradores (2017), a atividade imunomoduladora de um derivado de flavonóide (Trifolirhizin) induziu a expressão de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6, TNF- α e COX-2. ¹⁴⁷. Michalak e colaboradores (2019) avaliaram a atividade imunomoduladora de 5 extratos sintetizados da *Eupatorium cannabinum*. Dentre os compostos testados, observaram que a eupatoriopicrina, inibiu a expressão da IL-8 em níveis estatisticamente significativos ($p < 0.001$) em comparação ao controle ¹⁴⁸. No presente estudo, verificou-se que as substâncias Br-Ell-SO₃Na, pirazoloisoquinolina e Z2 inibiram a expressão da IL-8 em níveis significativos comparado ao controle. Embora a IL-8 e a IL-6 sejam biomarcadores pró-inflamatórios que geralmente são estimulados juntos no cenário da doença, sua expressão e produção também podem ser reguladas diferencialmente por substâncias (via cAMP) ¹⁴⁹, como ocorreu no caso da Br-Ell-SO₃Na, pirazoloisoquinolina e Z1. Recentemente, um estudo realizado por Gutierrez e colaboradores (2020) verificou que compostos derivados de diterpenos reduzem a expressão de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8, bem como a expressão de COX-2 em células leucêmicas THP-1 ¹⁵⁰. Por outro lado, um estudo que utilizou uma substância derivada de *Agaricus blazei* Murill (AbM), demonstrou que a mesma induzia a expressão de IL-6 e IL-8 ¹⁵¹.

A IL-8, também conhecida como CXCL8, é uma quimiocina pró-inflamatória da família CXC. A atividade biológica da IL-8 é mediada via ligação a dois receptores acoplados à proteína G, denominados CXCR1 e CXCR2 ¹⁵². No microambiente das células cancerígenas, a IL-8 tem sido associada a metástases, resposta angiogênica, indução de proliferação, sobrevivência e migração de células endoteliais vasculares e células neoplásicas ¹⁵³. Desta forma, substâncias que também agem inibindo a expressão desta citocina potencializa seu efeito anticancerígeno. Assim, a inibição da expressão da IL-8 induzida pelas substâncias Br-Ell-SO₃Na, pirazoloisoquinolina e Z2 demonstram

seu importante potencial anticancerígeno. Este estudo ressalta a importância da exploração de compostos sintetizados a partir substâncias isoladas de plantas, não apenas em relação a atividade anticancerígenas, mas também no que tange as atividades imunomoduladoras.

As substâncias utilizadas neste estudo não tiveram efeito sobre a expressão das citocinas de IL-2, IL-4 e IL-10. A principal fonte de IL-2 é a resposta imune Th1 (celular), enquanto que a IL-4 e IL-10 são citocinas Th2 (humorais) ¹⁵⁴. O equilíbrio Th1 / Th2 é mediado criticamente por essas citocinas, que estão diretamente envolvidas no processo de carcinogênese ¹⁵⁵. Entretanto, faz-se necessário a realização de mais estudos para melhor avaliar a ação imunomoduladora destas substâncias frente a linhagens de neoplasias hematológicas.

Os dados apresentados pelo presente estudo demonstraram que as substâncias Br-Ell-SO₃Na, pirazoloisoquinolina, Z1 e Z2 tem potencial anticâncer e imunomodulador e não apresentam atividade citotóxica contra células não cancerígenas, propriedade essencial para serem consideradas como compostos candidatos para o desenvolvimento de novos fármacos antineoplásicos. Tais dados reforçam que as substâncias testadas podem ser novas alternativas terapêuticas a serem exploradas *in vivo* em estudos prospectivos relacionados ao tratamento de neoplasias hematológicas.

7. CONCLUSÃO

- As substâncias analisadas apresentam atividades anticancerígenas contra células de linhagem neoplásicas, e podem ser exploradas farmacologicamente em estudos futuros *in vivo* que permitam uma melhor caracterização de seu potencial antineoplásico.
- A substância Z1 demonstrou maior potencial anticancerígeno em comparação as demais;
- Os resultados sugerem que todas as substâncias são seguras para testes *in vivo*, visto que não foi evidenciado atividade citotóxica em células não cancerígenas;
- Os achados sugerem que as substâncias inibem a proliferação celular na fase S, G1 e G2 do ciclo celular. Contudo, outras linhagens precisam ser testadas uma vez que isto foi observado apenas na linhagem K562.
- As substâncias Br-Ell-SO₃Na, pirazoloisoquinolina e Z2 apresentam atividade imunomoduladora, pois estimularam a expressão da citocina IL-6 e inibiram (apenas a Z2) a produção de IL-8 em níveis estatisticamente significativos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pereira, J. et al. Papel da célula endotelial em neoplasias hematológicas. Rev Bras Hematol Hemoter, v 30, n3, p223-228, 2008.
2. Instituto Nacional de Câncer – LNH. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-2016-ID-23.pdf>.
3. Moreira A.L, Batista C.S, Silva M.B.J. Diagnóstico de leucemias linfóides agudas. Revista Saúde em Foco – Edição nº 10 – Ano: 2018
4. Lowry L, Linch D. Lymphoproliferative disorders - non-hodgkin's lymphoma, Medicine, v. 41 p.5, 2013
5. Yun L, Linch D. Hodgkin's lymphoma. Lancet, v. 361 p. 943–51, 2003.
6. Siegel, R. et al. Cancer statistics, the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. Cancer J Clin, v. 61 p. 212-36, 2011.
7. Swerdlow, S. H. et al. Who Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4 ed. Geneva: WHO Press, 2008.
8. Neri P. Bahlis N. J. Targeting of adhesion molecules as a therapeutic strategy in multiple myeloma. Curr Cancer Drug Targets, v. 12, n. 7, p. 776-96, 2012.
9. Cragg GM, Newman DJ, Yang SS. Natural product extracts of plant and marine origin having antileukemia potential. The NCI experiences. J Nat Prod. 69: 488-98, 2016.
10. Khan H. Medicinal plants in light of history: recognized therapeutic modality. J Evid Based Complement Altern Med. 19: 216-9, 2014.
11. M. Greenwell and P.K.S.M. Rahman. Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment. Int J Pharm Sci Res. 1; 6(10): 4103–4112, 2015.
12. Melo J. G et al. Medicinal Plants Used as Antitumor Agents in Brazil: An Ethnobotanical Approach. Evid Compl Alter Med, v. 20 p. 1- 14, 2011.
13. Javed I, et al. Plant-derived anticancer agents: A green anticancer approach; Asian Pac J Trop Biomed 7(12): 1129–1150, 2017.
14. Sears P. & Wong C.H. Kohlenhydratmimetika: ein neuer Lösungsansatz für das Problem der kohlenhydratvermittelten biologischen Erkennung Angew. Chemie. 111(16), 2446-2471, 1999.
15. Sathisha M.P., Budagumpi S., Kulkarni N.V., Kurdekar G.S., Revankar V.K. & Pai K.S.R. Eur. J. Med. Chem., 45(1), 106 -113, 2010.
16. Wei D., Wei Y., Cheng W. & Zhang L. Sulfated modification, characterization and antitumor activities of *Radix hedysari* polysaccharide. Int. J. Biol. Macromol., 51(4), 471-476, 2012.
17. Leung S. & Romanowski M. Light-activated content release from liposomes. Theranostics, 2(10), 1020 – 1036, 2012.
18. Stocker K.F. Medical Use of Snake Venom Proteins, CRC press, New York, 34-50, 1990.

19. Prakash O, Kumar A, Kumar P, Ajeet. Anticancer Potential of Plants and Natural Products: A Review. *American Journal of Pharmacological Sciences*. v. 1, n. 6, 104-115, 2013.
20. Yokosuka A., Haraguchi M., Usui T., Kazami S., Osada H., Yamori T., Mimaki Y. & Glaziovianin A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17(11), 3091-3094, 2007.
21. Bhuiyan, N.I; Chowdhury, J.U.; Begum, J. Chemical investigation of the leaf and rhizome essential oils of *Zingiber zerumbet* (L.) Smith from Bangladesh,” *Bangladesh Journal of Pharmacology*. 4: 9-12, 2009.
22. Lisana, T. Tumores sólidos e neoplasias hematológicas. Sobre Câncer. *Rev Bras Hematol Hemoter*. v.28, n.1, 2010.
23. Khatami M. Unresolved inflammation: immune tsunami or erosion of integrity in immune-privileged and immune-responsive tissues and acute and chronic inflammatory diseases or câncer. *Expert Opin Biol Ther*. 11 (11): 1419-1432, 2011.
24. Brasil. Ministério da Saúde; Instituto Nacional do Câncer. Tipos de câncer [Internet]. Rio de Janeiro; 2010.
25. Vardiman JW. et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 114(5):937-51, 2009.
26. Chisesi, T. State of the art in the treatment of CLL. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. v.31, s.2, p. 51-56, 2009.
27. Silva S, Ávila FD, Soares Mo Perfil Hematológico e Bioquímico Sérico de Pacientes Submetidas à Quimioterapia Antineoplásica. *Revista de Enfermagem e Atenção à Saúde*, v. 2, n. 02, 2013.
28. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância, Área de Vigilância do Câncer relacionado ao Trabalho e ao Ambiente. Rio de Janeiro: INCA, 2012. 187 p.
29. Merino, A. Clasificación de las leucemias agudas mieloides Acute myeloid leukemia classification. *Rev Lab Clín*. v3, i3, p139-147, 2010.
30. Monteiro TAF, Arnaud MVC, Barros VLS, Monteiro JLF, Vasconcelos PFC. Identificação do Gene EBER1 e EBNA1 do vírus Epstein Barr (EBV) em tecidos de pacientes com doença de Hodgkin na região Norte do Brasil. *Rev Panam Infectol*. 2014;16(1):17-24.
31. Diehl V. Chemotherapy or combined modality treatment: the optimal treatment for Hodgkin's disease. *J Clin Oncol*. 2004 Jan; 22:15-8.
32. Ministério da Saúde (BR). Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Câncer no Brasil: dados dos registros de câncer de base populacional. Rio de Janeiro: INCA; 2011.
33. Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, et al. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 17a ed. New York: McGraw-Hill Medical Publishing Division; 2008.
34. Campos LC, de Andrade DAP. Linfoma não-Hodgkin de células do manto: relato de caso. *Rev. Med. Minas Gerais* 2009; 19(2): 177-179.

35. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos M-V, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* [Internet]. Elsevier; 2014 Nov 1 [cited 2018 Mar 26];15(12): e538-48.
36. Nikhil C. Munshi; Dan L. Longo; Kenneth C. Anderson. Plasma Cell Disorders. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 19e. 2015.
37. World Health Organization. Global Action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013-2020. Geneva, 2013.
38. Ferlay, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, Genève, v. 136, n. 5, p. 359-386, 2015.
39. Bray, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, Hoboken, v. 68, n. 6, p. 394-424, Nov. 2018.
40. Ferlay, J. et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International journal of cancer*, New York, v. 144, n. 8, p. 1941-1953, Apr. 2019.
41. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva/ Ministério da Saúde. Estimativa de câncer no Brasil. 2020. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2020/estimativa-2020.pdf>.
42. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. A situação do câncer no Brasil/Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Instituto Nacional de Câncer, Coordenação de Prevenção e Vigilância. -Rio de Janeiro: INCA, 2016.
43. World Health Organization (WHO). International Agency for Research on Cancer. Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. World; 2016b.
44. International Myeloma Foundation (IMF). Concise Review of the Disease and Treatment Options: Multiple Myeloma. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8520-9>. Acesso em: 13 de março de 2019.
45. Almeida TJB. Avanços e perspectivas para o diagnóstico da leucemia linfóide aguda. *Cand Rev Virt*, v.5, n.1, p.40-55, 2009.
46. Barbosa CMPL. Manifestações músculo-esqueléticas como apresentação inicial das leucemias agudas na infância. *Sociedade Brasileira de Pediatria, Jornal de Pediatria*, v. 78, n.6, p. 481 a 484, 2002.
47. Farias MG, Castro SM. Diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* v.40, n.2, p.91-8, 2014.
48. Fadel AP. Investigação laboratorial de LLA. *Ac&T Científica*, v. 1, n. 2, 2010.
49. Dantas GKS et al. Diagnóstico diferencial da leucemia linfóide aguda em pacientes infantojuvenis. *Rev Un Val Rio Verde, Três Corações*, v.13, n.2, p. 3-18, 2015.

50. Silva GC et al. Diagnóstico Laboratorial das leucemias mielóides agudas. *Jorn Bras Pat Med Lab.* v.42, n.2, p.77-84, 2007.
51. Moreira CA; Okamoto OK. *Medicina genômica e prática clínica.* Einstein, São Paulo, v. 2, n. 3, p. 235-236, 2015.
52. Armitage JO How I treat patients with diffuse large B-cell lymphomas. *Blood.* 2007;110(1):29-36
53. Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, et al. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with RCHOP. *Blood.* 2007; 109(5):1857-61
54. Fundação Internacional de Mieloma (2019). Diagnóstico do Mieloma. Disponível em <<http://www.myeloma.org.br/diagnostico.php>> Acesso em fevereiro de 2019.
55. Almeida, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova.* v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
56. Amos, T. A.; Gordon, M. Y. Sources of human hematopoietic stem cells for transplantation-a review. *Cell Transplantation.* v. 4, n. 6, p. 547-69, 2005.
57. Meesat R. et al. Cancer radiotherapy based on femtosecond IR laser-beam filamentation yielding ultra-high dose rates and zero entrance dose. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 109(38), E2508-E2513, 2012.
58. Instituto Nacional De Câncer (Brasil). ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: Inca. p128, 2011.
59. Guerard, E. J; Bishop M. R. *Overview of Non-Hodgkin's Lymphoma,* 2012.
60. Hajjaji, N; Bougnoux, P. Selective sensitization of tumors to chemotherapy by marine-derived lipids: a review. *Cancer Treat Rev.* v.39 n. 5, p. 473-88, 2012.
61. Ferrari M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat. Rev. Cancer* 5(3), 161–171, 2005.
62. Mukherjee S, Patra CR. Biologically synthesized metal nanoparticles: recent advancement and future perspectives in cancer theranostics. *Future Sci. OA* 3(3), FSO203, 2017.
63. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. A situação do câncer no Brasil/Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Instituto Nacional de Câncer, Coordenação de Prevenção e Vigilância. -Rio de Janeiro: INCA, 2016.
64. Lee S, Margolin K. Cytokines in cancer immunotherapy. *Cancers (Basel).* 2011;3(4):3856–93.
65. Germano G, Allavena P, Mantovani A. Cytokines as a key component of cancer-related inflammation. *Cytokine.* 2008; 43:374-379
66. Capece D, Verzella D, Tessitore A, Alesse E, Capalbo C, Zazzeroni F. Cancer secretome and inflammation: The bright and the dark sides of NF- κ B. *Semin Cell Dev Biol [Internet].* 2018;78:51–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.08.004>.

67. Sparmann A, Bar-Sagi D. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell*. 2004.
68. Sektioglu IM, Carretero R, Bulbuc N, Bald T, Tüting T, Rudensky AY, et al. Basophils promote tumor rejection via chemotaxis and infiltration of CD8⁺ T cells. *Cancer Res*. 2017.
69. Schwartz C, O'Grady K, Lavelle EC, Fallon PG. Interleukin 33: An innate alarm for adaptive responses beyond Th2 immunity-emerging roles in obesity, intestinal inflammation, and cancer. *Eur J Immunol*. 2016.
70. Setrerrahmane S, Xu H. Tumor-related interleukins: Old validated targets for new anti-cancer drug development. *Molecular Cancer*. 2017.
71. Lippitz BE, Harris RA. Cytokine patterns in cancer patients: A review of the correlation between interleukin 6 and prognosis. *Oncoimmunology* [Internet]. 2016;5(5):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/2162402X.2015.1093722>.
72. Mauer J, Denson JL, Brüning JC. Versatile functions for IL-6 in metabolism and cancer. *Trends Immunol*. 2015;36(2):92–101.
73. Malek TR. The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:453.
74. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, et al. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med*. 1985;313:1485.
75. Yang JC, Sherry RM, Steinberg SM, et al. Randomized study of high-dose and low-dose Interleukin-2 in patients with metastatic renal cancer. *J Clin Oncol*. 2003;21:3127–32.
76. Brat DJ, Bellail AC, Van Meir EG. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro Oncol*. 2005;7(2):122–33.
77. Hidaka H, Ishiko T, Furuhashi T, Kamohara H, Suzuki S, Miyazaki M, et al. Curcumin inhibits interleukin 8 production and enhances interleukin 8 receptor expression on the cell surface: Impact on human pancreatic carcinoma cell growth by autocrine regulation. *Cancer*. 2002;95(6):1206–14.
78. Ahmad N, Ammar A, Storr SJ, Green AR, Rakha E, Ellis IO, et al. IL-6 and IL-10 are associated with good prognosis in early stage invasive breast cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* [Internet]. 2018;67(4):537–49. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00262-017-2106-8>
79. Joshi BH, Leland P, Lababidi S, Varrichio F, Puri RK. Interleukin-4 receptor alpha overexpression in human bladder cancer correlates with the pathological grade and stage of the disease. *Cancer Med*. 2014
80. Ostrand R S, Grusby MJ, Clements VK. Cutting Edge: STAT6-Deficient Mice Have Enhanced Tumor Immunity to Primary and Metastatic Mammary Carcinoma. *J Immunol*. 2000.
81. Chang Y, Zhang M, Jiang Y, Liu Y, Luo H, Hao C, et al. Preclinical and clinical studies of coriolus versicolor polysaccharopeptide as an immunotherapeutic in China. *Discov Med*. 2017.
82. Blagodatski A, Yatsunskaya M, Mikhailova V, Tiasto V, Kagansky A, Katanaev VL. Medicinal

- mushrooms as an attractive new source of natural compounds for future cancer therapy. *Oncotarget*. 2018;9(49):29259–74.
83. Newell DR. Como desenvolver um can- sucesso cer droga - moléculas para medicamentos ou alvos para tratamentos. *Eur J Cancer*. 41: 676-82, 2005.
 84. Garland Cf, Mohr, SB, Gorham Ed, Grant WB, Garland FC. Roleof ultravioleta B irradianceand vitamin D in prevention of ovaria cancer. *Am Prev Med*. 31: 512-4, 2006.
 85. Buyru N. Tezol A, Yosunkaya-Fenerci E, Dalay N Vitamin D receptor gene polymorphism in breast câncer. *Exp mol. Med*. 35: 550-5, 2003.
 86. Liu Y, Tian J, Qian K, Zhao XB, Susan LM, yang L. Recent progress on c-4 modified Podophillo toxina an log as potent antitumor agents. *Med Rev*. 35: 1-62, 2015.
 87. Ay Sun A. Simonyi Q. Wang, e G. Sun, “Beyond the paradoxo francês: proteção dos polifenóis de uva contra processos rodegenerative neu-” *Alcoholism: Clinical & Experimental Research*, vol. 28, 2004.
 88. Varoni EM, Faro AFL, Shariti-Rad J, Iriti M. Anticancer molecular mechanism of revesratrol. *Front Nutr* 2016; 3:8.
 89. Mazumder A, Cerella C, Diederich M. Natural scaffolds in anticâncer therapy and precision medicine. *Biotechnol Adv [Internet]*. 2018;36(6):1563-85.
 90. Wutthithamavet, W. *Traditional Medicine*, Odean Store Press, Bangkok, Thailand. 1997.
 91. Sulaiman MR et al. Antinociceptive activity of the essential oil of Zingiber zerumbet. *Planta Medica*, 76: 107–112, 2010.
 92. Yob, NJ et al. “Zingiber zerumbet (L.) Smith: A Review of Its Ethnomedicinal, Chemical, and Pharmacological Uses,” *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 12, 2011.
 93. Dai JR et al. Zerumbone, an HIV-inhibitory and cytotoxic sesquiterpene of Zingiber aromaticum and Z. zerumbet,” *Natural Product Letters*, vol. 10, no. 2, pp. 115–118, 1997.
 94. Kim M et al. Zerumbone, a tropical ginger sesquiterpene, inhibits colon and lung carcinogenesis in mice,” *International Journal of Cancer*, vol. 124, no. 2, pp. 264–271, 2009.
 95. Jalili-Nik M, Sadeghi MM, Mohtashami E, Mollazadeh H, Afshari AR, Sahebkar A. Zerumbone Promotes Cytotoxicity in Human Malignant Glioblastoma Cells through Reactive Oxygen Species (ROS) Generation. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020.
 96. Junior, JCM et al. A Citometria De Fluxo Como Instrumento De Avaliação Da Atividade Imunomodulatória De Extratos E Substâncias Isoladas De Plantas Medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16: 645-655, 2006.
 97. Hashimoto Y. Thalidomide as a multi-template for development of biologically active compounds. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2008;341(9):536-47.
 98. Brandão HN, David JP, Couto RD, Nascimento JAP, David JM. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Quim Nova*. 2010;33(6): 1359-69.

99. Thakore P, Mani RK, Kavitha SJ. A brief review of plants having anti-cancer property. In *J Pharm Res Dev* 2012; 3: 129-36.
100. Sing S, Jarial R, Kanwar SS. Therapeutic effect herbal medicines on obesity: herbal pancreatic lipase inhibitors. *Wudpecker J Med Plants* 2013; 2:53-65.
101. Khazir J, Mir BA, Pilcher L, Riley DL. Role of plants in anticancer drug discovery. *Phytochem. Lett.* 2014, 7, 173–181.
102. Almeida VL. d., A. Leitão, et al. (2005). "Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução." *Química Nova* 28: 118-129.
103. Ishikawa H, Seto D, Porino C, Tam P, Kakei H et al. Total Synthesis of Vinblastine, Vincristine, Related Natural Products, and Key Structural Analogues. *J Am Chem Soc.* Author manuscript; available in PMC 2010 April 8.
104. Li Y, Zhang T, Hasan K, Liu S, Lee HF, Neuman B, Yu Y, Clouthier SG, Steven J. Schwartz MSW and DS. NIH Public Access. *Clin Cancer Res.* 2010;23(1):1–19.
105. Liang J, Hänsch GM, Hübner K, Samstag Y. Sulforaphane as anticancer agent: A double-edged sword? Tricky balance between effects on tumor cells and immune cells. *Adv Biol Regul* [Internet]. 2019;71:79–87.
106. Sharma U, Kumar P, Kumar N, Singh B. Recent Advances in the Chemistry of Phthalimide Analogues and their Therapeutic Potential. *Mini-Reviews Med Chem.* 2010;10(8):678–704.
107. Zwergel C, Gaascht F, Valente S, Diederich M, Bagrel D, Kirsch G. Aurones: Interesting natural and synthetic compounds with emerging biological potential. *Nat Prod Commun.* 2012;7(3):389–94.
108. Hadjeri M, Barbier M, Ronot X, Mariotte AM, Boumendjel A, Boutonnat J. Modulation of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by flavonoid derivatives and analogues. *J Med Chem.* 2003;46(11):2125–31.
109. Schoepfer J, Fretz H, Chaudhuri B, Muller L, Seeber E, Meijer L, et al. Structure-based design and synthesis of 2-benzylidene-benzofuran-3-ones as flavopiridol mimics. *J Med Chem.* 2002;45(9):1741–7.
110. Sidney BY. ALKALOIDS Alkaloids of *Ochrosia elliptica* Labill.?. 1959;215(in 1955)
111. Fiona M. Deane, Charlotte M. Miller, Anita R. Maguire and FOM. Modifications to the Vilsmeier-Haack Formylation of 1,4- Dimethylcarbazole and Its Application to the Synthesis of Ellipticines. *J Heterocycl Chem.* 2011;48(July):814–23.
112. Kizek R, Adam V, Hrabeta J, Eckschlager T, Smutny S, Burda J V., et al. Anthracyclines and ellipticines as DNA-damaging anticancer drugs: Recent advances. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2012;133(1):26–39.
113. Dodin G, Andrieux M, Kabbani H Al. Binding of ellipticine to P-lactoglobulin. 1990;700(1 990):697–700.

114. Ma W, Lu S, Pan P, Sadatmousavi P, Yuan Y, Chen P. Pharmacokinetics of Peptide Mediated Delivery of Anticancer Drug Ellipticine. *PLoS One*. 2012;7(8).
115. Hägg M, Berndtsson M, Mandic A, Zhou R, Shoshan MC, Linder S. Induction of endoplasmic reticulum stress by ellipticine plant alkaloids. *Mol Cancer Ther*. 2004;3(4):489–97.
116. Pradeep K. Dagur and J. Philip McCoy, Jr. Collection, Storage, and Preparation of Human Blood Cells. *Curr Protoc Cytom*. 2015; 73: 5.1.1–5.1.16.
117. Dhyani A, Machado-Neto JA, Favaro P, Saad ST. ANKHD1 represses p21 (WAF1/CIP1) promoter and promotes multiple myeloma cell growth. *Eur J Cancer*. 2015 Jan;51(2):252-9. doi: 10.1016/j.ejca.2014.11.01.
118. Dantas, B.B et al. Effects of curine in HL-60 leukemic cells: cell cycle arrest and apoptosis induction. *The Japanese Society of Pharmacognosy and Springer Japan 2015*, doi: 10.1007/s11418-014-0881-5.
119. Yue GG1, Chan BC, Hon PM, Lee MY, Fung KP, Leung PC, Lau CB. Evaluation of in vitro anti-proliferative and immunomodulatory activities of compounds isolated from *Curcuma longa*. *Food Chem Toxicol*. 2010 Aug-Sep;48(8-9):2011-20.
120. Stiborová M, Poljaková J, Martínková E, Bořek-Dohalská L, Eckschlagler T, Kizek R, et al. Ellipticine cytotoxicity to cancer cell lines-a comparative study. *Interdiscip Toxicol*. 2011;4(2):98–105.
121. Woodward RB, Iacobucci GA, Hochstein IA. The Synthesis of Ellipticine. *J. Am. Chem. Soc*. 1959, 81, 4434–4435.
122. Anderson G, Clavel M, Smyth J, Giaccone G, Gracia M, Planting AS, Dalesio O, Kirkpatrick A, McVie G. Phase II study of 9-hydroxy-2-methyl-ellipticinium acetate (ellipticinium) in patients with advanced carcinoma of the lung. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol*. 1989, 25, 909–910.
123. Russell EG, Guo J, O’Sullivan EC, O’Driscoll CM, McCarthy FO, Cotter TG. 7-formyl-10-methylisoellipticine, a novel ellipticine derivative, induces mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and shows anti-leukaemic activity in mice. *Invest New Drugs*. 2016;34(1):15–23.
124. Shamsuzzaman, Asif M, Ali A, Mashrai A, Khanam H, Sherwani A, et al. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Steroidal Tetrazoles as Antiproliferative and Antioxidant Agents. *Eur Chem Bull*. 2014;3 (11):1075–80.
125. Costa RGA, Anunciação TA d., Araujo M de S, Souza CA, Dias RB, Sales CBS, et al. In vitro and in vivo growth inhibition of human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells by *Guatteria megalophylla* Diels (Annonaceae) leaf essential oil. *Biomed Pharmacother [Internet]*. 2020;122 (November 2019):109713. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109713>.
126. Netto C D Silva, Salustiano A J, Bacelar E J, Riça T S, Cavalcante IG, M. C, & Costa P R. 2010. New Pterocarpanquinones: synthesis, antineoplastic activity on cultured human malignant cell lines and TNF- α modulation in human PBMC cells. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 18(4), 1610-1616.

127. Murakami A, Ohigashi H, Ikeda Y, Kizaki M. a Fas- and mitochondria-mediated pathway. *Cancer Sci* [Internet]. 2007;98(1):2–10. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1349-7006.2006.00362.x>
128. Sakinah et al. Zerumbone induced apoptosis in liver cancer cells via modulation of Bax/Bcl-2 ratio. *Cancer Cell International* 2007, 7:4 doi:10.1186/1475-2867-7-4.
129. Hoffman, L. Spetner, and M. Burke, “Redox-regulated mechanism may account for zerumbone’s ability to suppress cancer-cell proliferation,” *Carcinogenesis*, vol. 23, no. 11, pp. 1961-1962, 2002.
130. Liu C K, Shih T Y, Kuo C L et al., “Sulforaphane induces cell death through G2/M phase arrest and triggers apoptosis in HCT 116 human colon cancer cells,” *The American Journal of Chinese Medicine*, vol. 44, no. 6, pp. 1289–1310, 2016.
131. Monma H, Lida Y, Moritani T., et al., “Chloroquine augments TRAIL-induced apoptosis and induces G2/M phase arrest in humanpancreatic cancercells,” *PloS One*, vol.13, no.3, article e0193990, 2018.
132. Kirana C, McIntosh GH, Record IR, Jones GP. Antitumor activity of extract of *Zingiber aromaticum* and its bioactive sesquiterpenoid zerumbone. *Nutr Cancer*. 2009;45(2):218–25.
133. Habli Z, Toumeh G, Fatfat M, Rahal ON, Gali-Muhtasib H. Emerging cytotoxic alkaloids in the battle against cancer: Overview of molecular mechanisms. *Molecules*. 2017;22(2):1–22.
134. Deane FM, O’Sullivan EC, Maguire AR, Gilbert J, Sakoff JA, McCluskey A et al (2013) Synthesis and evaluation of novel ellipticines as potential anti-cancer agents. *Org Biomol Chem* 11(8):1334–134.
135. Lerman LS (1961) Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. *J Mol Biol* 3:18–30.
136. Prudent R, Moucadel V, Nguyen CH, Barette C, Schmidt F, Florent JC, Lafanechere L, Sautel CF, Duchemin-Pelletier E, Spreux E, Filhol O, Reiser JB, Cochet C (2010) Antitumor activity of pyridocarbazole and benzopyridoindole derivatives that inhibit protein kinase CK2. *Cancer Res* 70(23):9865–9874.
137. Shurin, M. Cancer as an immune-mediated disease. *ImmunoTargetsTher*. 2012, 1, 1–6. [CrossRef] [PubMed]
138. Wahid B, Ali A, Rafique S, Waqar M, Wasim M, Wahid K, Idrees M. An overview of cancer immunotherapeutic strategies. *Immunotherapy* 2018, 10, 999–1010. [CrossRef] [PubMed]
139. Ribas A, Wolchok J D. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science* 2018, 359, 1350–1355. [CrossRef] [PubMed]
140. Weiden J, Tel J, Figdor C G. Synthetic immune niches for cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol*. 2018, 18, 2012–2019. [CrossRef] [PubMed]
141. Hegmans J.P.J.J, Aerts J.G.J.V. Immunomodulation in cancer. *Curr. Opin. Pharmacol*. 2014, 17, 17–21. [CrossRef]

142. Mikucki ME, Fisher DT, Ku AW, Appenheimer MM, Muhitch JB, Evans SS. Preconditioning thermal therapy: Flipping the switch on IL-6 for anti-tumour immunity. *Int. J. Hyperth.* 2013, 29, 464–473. [CrossRef] [PubMed]
143. Fisher DT, Appenheimer MM, Evans SS. The two faces of IL-6 in the tumor microenvironment. *Semin. Immunol.* 2014, 26, 38–47. [CrossRef]
144. Rose-John, S. Il-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: Importance for the proinflammatory activities of IL-6. *Int. J. Biol. Sci.* 2012, 8, 1237–1247. [CrossRef].
145. Grivennikov SI, Greten F R, Karin M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* 2010, 140, 883–899. [CrossRef]
146. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 2011, 331, 1565–1570. [CrossRef]
147. Aung TN, Qu Z, Kortschak RD, Adelson DL. Understanding the effectiveness of natural compound mixtures in cancer through their molecular mode of action. *Int J Mol Sci.* 2017;18(3).
148. Michalak B, Piwowarski JP, Granica S, Waltenberger B, Atanasov AG, Khan SY, et al. Eupatoriopicrin inhibits pro-inflammatory functions of neutrophils via suppression of il-8 and tnf-Alpha production and p38 and erk 1/2 map kinases. *J Nat Prod.* 2019;82(2):375–85.
149. Robson RL, Westwick J, Brown Z. Interleukin-1-induced IL-8 and IL-6 gene expression and production in human mesangial cells is differentially regulated by cAMP. *Kidney Int.* 1995, 48, 1767–1777.
150. Gutiérrez M, Santamaría R, Gómez-Reyes JF, Guzmán HM, Ávila-Román J, Motilva V, et al. New Eunicellin-Type Diterpenes from the Panamanian Octocoral *Briareum Asbestinum*. *Mar Drugs.* 2020;
151. Huang TT, Ojcius DM, Young JD, Wu YH, Ko YF, Wong TY, et al. The anti-tumorigenic mushroom *agaricus blazei murill* enhances IL-1 β production and activates the NLRP3 inflammasome in human macrophages. *PLoS One.* 2012.
152. Raghuwanshi SK, Su Y, Singh V, Haynes K, Richmond A, Richardson RM. The Chemokine Receptors CXCR1 and CXCR2 Couple to Distinct G Protein-Coupled Receptor Kinases to Mediate and Regulate Leukocyte Functions. *J. Immunol.* 2012, 189, 2824–2832.
153. David JM, Dominguez C, Hamilton DH, Palena C. The IL-8/IL-8R axis: A double agent in tumor immune resistance. *Vaccines.* 2016.
154. Mosmann T R, Coffman R L. TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 1989, 7, 145–173.
155. Nishimura T, Iwakabe K, Sekimoto M, Ohmi Y, Yahata T, Nakui M, Sato T, Habu S, Tashiro H, Sato M.; et al. Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (Th1) and Th2 cells in tumor eradication in vivo. *J. Exp. Med.* 1999, 190, 617–627. [CrossRef]
156. Garbett N C, Graves D E. Extending nature's leads: The anticancer agent ellipticine. *Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents* 2004, 149 –172.

9. ANEXOS E APÊNDICES

9.1 Artigo publicado na revista molecules

Molecules 2020, 25, 2130; doi:10.3390/molecules25092130

9.2 Artigo aceito para publicação na revista PLOS ONE

PONE-D-20-06981R2 -[EMID:3d312c22caafe12]

Article

Anticancer and Immunomodulatory Activities of a Novel Water-Soluble Derivative of Ellipticine

Regiane Costa de Oliveira ¹ , Gemilson Soares Pontes ^{1,2}, Aleksandr Kostyuk ³, Gabriel B. Coutinho Camargo ¹, Anamika Dhyani ², Tetiana Shvydenko ^{3,4,*}, Kostiantyn Shvydenko ^{3,4} and Andriy Grafov ⁵ 

¹ Programa de Pós-Graduação em Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas, Av. Djalma Batista, 3578-Flores, Manaus-AM, Brazil; regiane.costa17@gmail.com (R.C.d.O.); gemilson.pontes@inpa.gov.br (G.S.P.); CoutinhoCamargo@gmail.com (G.B.C.C.)

² Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Av. André Araújo, 2.936-Petrópolis-Manaus-AM, Brazil; Dhyani@gmail.com

³ Institute of Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Murmanska Str. 5, 02660 Kyiv, Ukraine; a.kostyuk@yahoo.com (A.K.); shved1977@ua.fm (K.S.)

⁴ JSC "Farmak", Kyrylivska str. 63, 04080 Kyiv, Ukraine

⁵ Department of Chemistry, University of Helsinki, 00014 Helsinki, Finland; andriy.grafov@helsinki.fi

* Correspondence: shvidenko_t@yahoo.com.ua

Received: 23 March 2020; Accepted: 22 April 2020; Published: 1 May 2020



Abstract: Cancer still remains a major public health concern around the world and the search for new potential antitumor molecules is essential for fighting the disease. This study evaluated the anticancer and immunomodulatory potential of the newly synthesized ellipticine derivate: sodium bromo-5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]carbazole-7-sulfonate (Br-Ell-SO₃Na). It was prepared by the chlorosulfonation of 9-bromoellipticine. The ellipticine-7-sulfonic acid itself is not soluble, but its saponification with sodium hydroxide afforded a water-soluble sodium salt. The cytotoxicity of Br-Ell-SO₃Na was tested against cancerous (K562 cell line) and non-cancerous cells (Vero cell line and human peripheral blood mononuclear cells (PBMC)) using a Methylthiazolotetrazolium (MTT) assay. Cell cycle arrest was assessed by flow cytometry and the immunomodulatory activity was analyzed through an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results showed that the Br-Ell-SO₃Na molecule has specific anticancer activity (IC₅₀ = 35 μM) against the K562 cell line, once no cytotoxicity effect was verified against non-cancerous cells. Cell cycle analysis demonstrated that K562 cells treated with Br-Ell-SO₃Na were arrested in the phase S. Moreover, the production of IL-6 increased and the expression of IL-8 was inhibited in the human PBMC treated with Br-Ell-SO₃Na. The results demonstrated that Br-Ell-SO₃Na is a promising anticancer molecule attested by its noteworthy activity against the K562 tumor cell line and immunomodulatory activity in human PBMC cells.

Keywords: ellipticine; 9-bromoellipticine; sodium 9-bromo-5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]carbazole-7-sulfonate; immunomodulation; antitumor molecule

1. Introduction

Pharmaceutical companies continue to pursue antineoplastic medicines rigorously, on account of the increasing global cancer burden [1]. Despite the development of more selective therapies, treatments comprising of cytotoxic drugs are broadly used [2]. As a result, the demand for new, less toxic, and more efficient anticancer agents is of the utmost importance.

Recently, monoterpene indole alkaloid ellipticine and its derivatives have been thoroughly studied as therapeutic agents against different types of cancer [3]. Ellipticine is one of the simplest naturally

occurring alkaloids with a planar structure, which has been the center of attention of many research groups because of its antitumor activity. It was first isolated from the leaves of a tropical plant *Ochrosia elliptica* by S. Goodwin et al. [4]. Ellipticine exhibits rather limited toxic side effects and a complete absence of hematological toxicity [5]. Subsequently, ellipticine was isolated from several other plants of the *Ochrosia* genus, such as *O. vieillardii*, *O. acuminata*, and *O. moorei*, as well as from *Strychnos dinkagei* (Loganiaceae family). Now, ellipticine of a plant origin represents the largest proportion of commercially available products. Different hypotheses on ellipticine action mechanisms have been proposed [6]. In the last decade, evidence of the distinct cell-cycle effects of ellipticine have come to light [7].

Particularly, ellipticine can interact with the p53 tumor suppressor protein, Akt-kinase, and c-Kit kinase, while its effect on other cellular proteins remains unclear. Thus, ellipticine exhibits a multimodal cytotoxic activity, which is not clearly specified. A biooxidation pathway was originally proposed [8], suggesting that ellipticine could serve as a substrate for peroxidases in vivo. Stiborová's group demonstrated that ellipticine covalently binds to DNA after being enzymatically activated with cytochromes P450 or peroxidases [9]. Ellipticine derivatives such as 9-hydroxy-2-methylellipticinium acetate (NHME) had been introduced into the market, but were later withdrawn. [6] The search for other ellipticine derivatives is under way [10–16]. However, low water solubility of ellipticine derivatives is a crucial obstacle for the wide practical application in cancer therapies.

The aim of this study was to prepare a new water soluble ellipticine derivate, sodium 9-bromo-5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]carbazole-7-sulfonate (Br-Ell-SO₃Na), and investigate its antitumor and immunomodulatory potential.

2. Results

2.1. Synthesis of Sodium 9-bromo-5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]carbazole-7-sulfonate (2)

9-Bromoellipticine (1) was prepared in gram quantities according to Cranwell and Saxton's procedure [17], further optimized by the group. A detailed description of the synthetic procedures as well as NMR spectra are given in the Supporting Information. Sodium 9-bromo-5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]carbazole-7-sulfonate (2) was obtained as shown in Figure 1, by reacting bromoellipticine 1 with an excess of chlorosulfonic acid, followed by treatment with aqueous sodium hydroxide to yield the sodium salt (Figure 1).

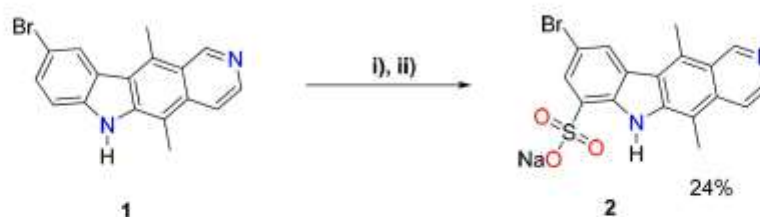


Figure 1. Synthesis of sodium 9-bromo-5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]carbazole-7-sulfonate (2)-Br-Ell-SO₃Na. (i) ClSO₃H, 0 °C for 5 min, then r.t. for 2 h; ii) chilled aqueous NaOH ~20%. The precipitate of (2) was washed with cool water.

2.2. Cytotoxic Effect

The compound Br-Ell-SO₃Na exhibited anticancer activity against the leukemic cell line K562 with an IC₅₀ value of 35 μM. However, the compound gradually lost its anticancer activity after 24 h treatment (Figure 2A). Thus, our findings demonstrated that the Br-Ell-SO₃Na had effective anticancer activity against the cell line K562, which was limited to the 24 h-treatment period. Toxicity of the Br-Ell-SO₃Na across non-cancerous cells was assessed using the Vero cell line and Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Our findings showed no cytotoxicity action at the concentrations

tested (Figure 2C,D), which indicates the selective cytotoxicity activity of the Br-Ell-SO₃Na against the K562 cell line.

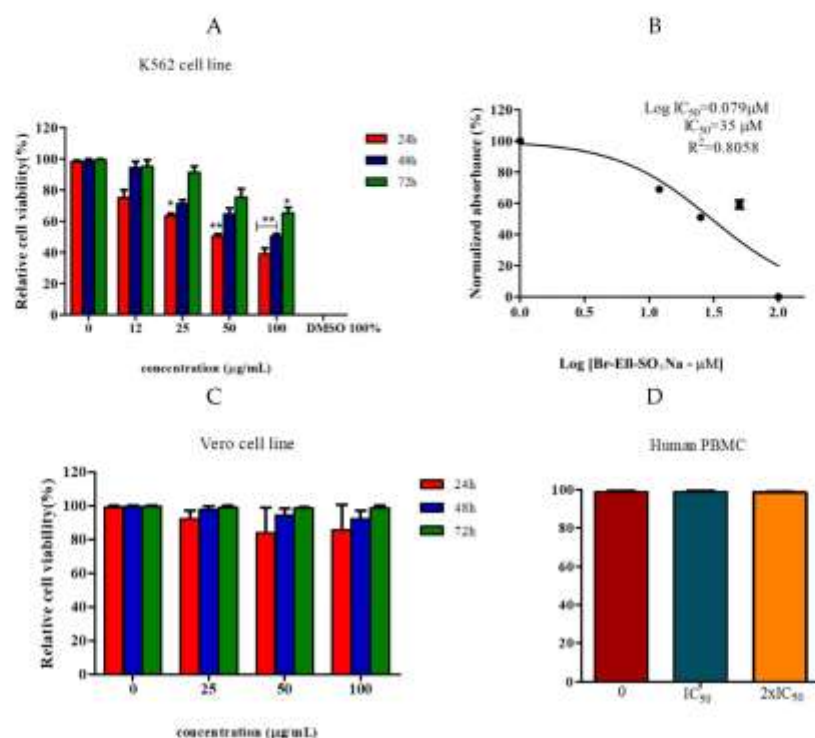


Figure 2. Cytotoxicity effect of Br-Ell-SO₃Na on cancerous and non-cancerous cells. (A) K562 cell viability after 24–72 h treatment with different concentrations of Br-Ell-SO₃Na (12–100 µg/mL). (B) IC₅₀ estimation using nonlinear regression (GraphPad Prism 5 software). The absorbance values were measured at 570 nm wavelength and the mean values + SD of three experiments are displayed along with a representative IC₅₀ curve. Vero (C) and human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (D) cell viability after 24–72 h treatment with different concentrations of Br-Ell-SO₃Na. The Methylthiazole tetrazolium (MTT) assay was performed to estimate the cell viability/cytotoxicity. * $p = 0.01$; ** $p = 0.001$.

2.3. Cell Cycle Analysis

As mentioned earlier, the K562 cells were treated for 24 h with IC₅₀ (35 µM) and 2 × IC₅₀ (70 µM) of Br-Ell-SO₃Na and then the cell cycle phase was analyzed. Upon treatment with 35 µM, the S phase distribution increased significantly (53%), when compared to the control. No cells in the G2 phase were found, thus suggesting the cell cycle arrests at the S phase. This means that the Br-Ell-SO₃Na inhibits the cell cycle progression (Figure 3). These results are concomitant with the MMT assay, where the 25 µg/mL and 50 µg/mL treatment showed a moderate antiproliferative activity after the 48 h treatment period. The cell cycle arrest remained at the S-phase, upon doubling the concentration to 70 µM; however, a slight increase in the G2/M phase (9.39%) was also observed.

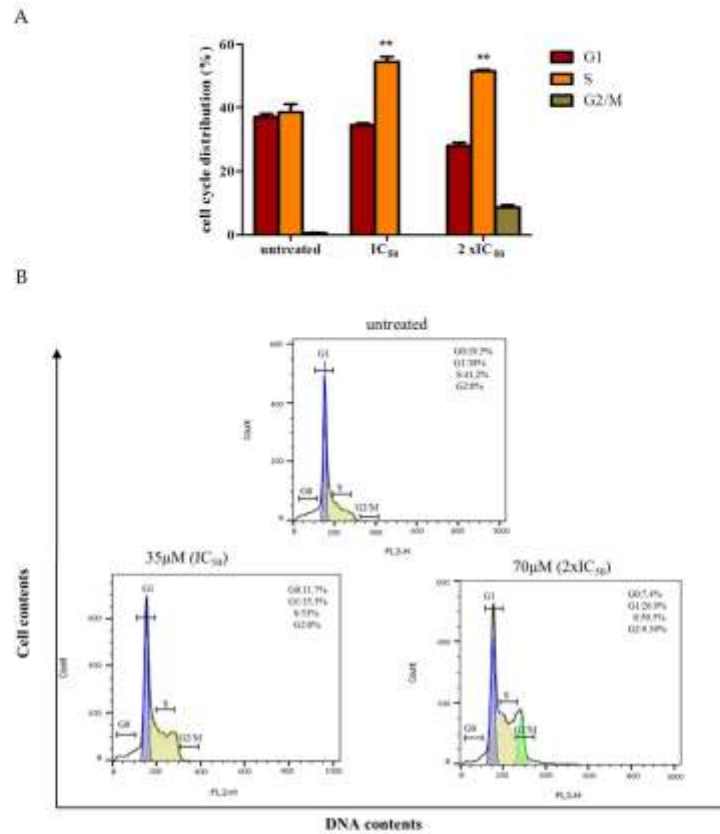


Figure 3. Cell cycle analysis of K562 cells treated with Br-EII-SO₃Na. **(A)** Analysis of the cell cycle arrest distribution in untreated (control) and treated (IC₅₀ and 2 × IC₅₀) K562 cells. **(B)** Representative cell cycle micrographs of K562 sensitive cells, depicting G0, G1, S and G2/M cell populations in untreated and treated K562 cells. ** $p = 0.001$.

2.4. Immunomodulatory Activity

To investigate the potential of Br-EII-SO₃Na in modulating the immune system, the levels of IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, and IL-10 were assessed for the K562 cell line in the supernatant of human PBMC treated with (2) at the IC₅₀ = 35 µM concentration. The results demonstrated that Br-EII-SO₃Na stimulated the IL-6 production ($p = 0.0001$), but inhibited the expression of IL-8 ($p = 0.02$) in comparison with untreated human PBMCs used as the control (Figure 4). No immunomodulatory activity related to IL-4, IL-2, and IL-10 was observed.

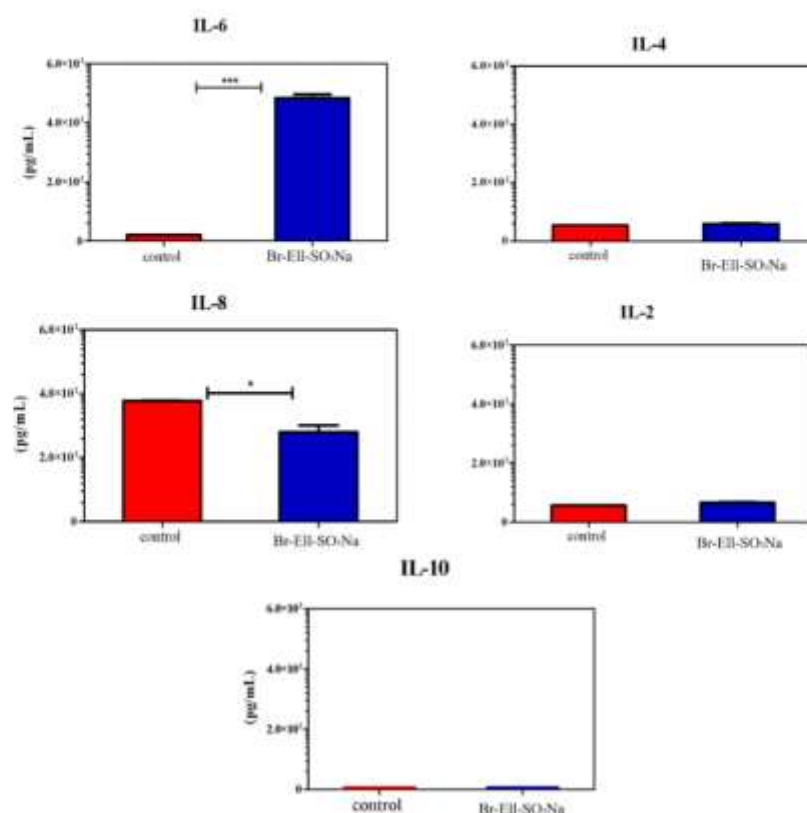


Figure 4. Effect of Br-ElI-SO₃Na on modulation of the immune system. Levels of IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, and IL-10 were assessed by ELISA in supernatant of human PBMCs treated with Br-ElI-SO₃Na (35 μ M). Controls represent the supernatant of untreated PBMCs. * $p = 0.01$; *** $p = 0.001$.

3. Discussion

Mortality from cancer has steadily increased over time across the world, turning this non-communicable disease into the second leading cause of death globally [18]. Although substantial advances in cancer treatment have been achieved over the past decades, critical issues such as high toxicity, drug solubility and bioavailability, cost-benefit assessment, and efficacy remain the major bottlenecks in anticancer drug development.

Taking into account the wide interest in ellipticine, various synthetic routes to the main molecule and its derivatives have been developed, starting from R. Woodward's approach [19]. Amongst a number of these available synthetic routes, the method originally proposed by Cranwell and Saxton appeared to be the most practical one [17]. The synthesis starts from appropriately substituted indoles or carbazoles. Since then, various improvements have been proposed to make it more convenient and to increase the total yield. We have also used this approach, starting from 5-bromoindole. It should be noted that the method is reproducible and was used to obtain many different substituted ellipticines. We carried out the multi-step synthesis several times in order to prepare the starting product 9-bromoellipticine in gram quantities. In addition, several improvements at different stages were proposed, to increase the total yield and to avoid column-chromatography at the isolation and purification steps (see the Supporting Information).

The low solubility of ellipticine derivatives hinders their use in medicine. As a solution, we decided to introduce an acidic group into the ellipticine scaffold. The ellipticine is susceptible to electrophilic attacks and has two electron-rich sites at the 7th and 9th positions. Only very strong electrophilic reagents can react at both positions; for example, upon bromination [20]. There are a scarce number of derivatives prepared by modification of the scaffold. The majority of those modifications relate to reactions at nitrogen atoms, electrophilic reactions at the 9th position, and modification at the 1st position. Our idea was to prepare 9-bromoellipticine, where the 9th position was blocked for an electrophilic reaction. Thus, the only position available for the electrophilic attack would be at the C7. Carbazoles are known to react with chlorosulfonic acid, hence we used an analogous procedure for the introduction of a sulfonic group into ellipticine [21]. Upon the addition of chlorosulfonic acid, 9-bromoellipticine reacted at the 7th position, giving rise to a sulfochloride derivative. The hydrolysis of the latter yielded the corresponding sulfonic acid. Since it was not soluble in water or common organic solvents, it was impossible to analyze and confirm the molecular structure of the compound. The saponification of the acid with sodium hydroxide produced the sodium sulfonate **2**. The compound is readily soluble in water and was fully characterized.

The antitumor activity of ellipticine and its derivatives have been widely demonstrated over the years [22–24]. However, very low solubility combined with severe side effects have been the major limitation of these compounds [22,25]. The water-soluble ellipticine derivative Br-Ell-SO₃Na, presented by this study, inhibited the K562 cells proliferation with the IC₅₀ value of 35 μM and showed no cytotoxicity to non-cancerous cells. Considering that tumorous cells stimulate their own growth by constraining inhibitory signals that control cell proliferation, it was important to verify the effect of Br-Ell-SO₃Na on cell cycle arrest. Our findings showed that most of the cells were significantly arrested on the phase S, upon Br-Ell-SO₃Na treatment at both 35 μM and 70 μM doses. As mentioned earlier, the anticancer potential of ellipticine and its derivatives has already been reported elsewhere, but usually those substances induce the cell arrest at the phase G2 of the cell cycle [26–28]. Our data demonstrated that the mechanism of action of Br-Ell-SO₃Na on the cell cycle differs from previously reported ellipticine derivatives.

The regulation of cell proliferation is an orchestrated process that is operated by various control points at different phases of the cell cycle [29]. Any mistake at those control points may lead to the cell death. Furthermore, the physiological arrest at cell cycle check points allows a repair of cellular damage, dismissal of exogenous stress, and accessibility of nutrients [30]. However, when a negative regulation of the phase S is induced by a substance such as Br-Ell-SO₃Na, it means that (2) is leaving the cell unable to duplicate its DNA by causing DNA-damage or replicative stress [29]. Indeed, intercalation into the DNA and the inhibition of a DNA topoisomerase II activity are elicited as the key mechanisms by which ellipticine employs its cytotoxicity activity [22,31]. The intercalation in DNA is believed to be facilitated by the similarity of the purine-pyrimidine base paired with the size and planar molecular structure of ellipticine [31]. The hydrophobic interaction fostered by the DNA bases and the polycyclic aromatic ring of ellipticine heightens this intercalation, which eventually results in DNA damage and cell death [32]. Although these data suggest that the Br-Ell-SO₃Na action mechanism is related to the impairment of DNA synthesis in cancerous cells, we did not check the direct influence of Br-Ell-SO₃Na on the intercalation of DNA or DNA topoisomerase II activity in this study.

The pathogenesis and treatment of cancer are directly interrelated with the immune system [33]. For instance, the immune-suppressive status usually induced by tumor-pathogenesis can be switched to immune-active by the immunomodulating effects of anticancer drugs, such as immune checkpoints inhibitors [34,35]. In this sense, the most promising chemical agents in the battle against cancer are the ones that can modulate the immune system through the suppression or enhancement of immune response by altering its type, scope or duration [36,37]. We assessed the immunomodulatory potential of Br-Ell-SO₃Na, by checking the production of IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 and IL-10 in human PBMC treated with the substance. Our results demonstrated that the Br-Ell-SO₃Na up-regulated the expression of IL-6. Previous reports have indicated the IL-6 as a crucial player in mobilizing anti-tumor T cell

immune response, and in the activation, proliferation and survival of lymphocytes during active immune responses [38,39]. Most importantly, the IL-6 signaling can also reframe the T cell immune response, converting it from a suppressive to a responsive state that is important to fight tumors [40]. On the other hand, this cytokine has been broadly linked to tumor progression and metastasis [41,42]. Thus, the role of the IL-6 trans-signaling in the context of cancer might be dependent on many factors of the tumor microenvironment, such as cell type, tumor location or severity of cancer [39].

Surprisingly, the compound Br-Ell-SO₃Na downregulated the expression of IL-8, compared to the control. Although IL-8 and IL-6 are pro-inflammatory biomarkers that are usually stimulated together in the scenario of disease, their expression and production can be likewise differentially regulated by substances (via cAMP), as occurred in the case of Br-Ell-SO₃Na [43]. IL-8, also known as CXCL8, is a proinflammatory CXC chemokine. The IL-8 mediates its biological activity through the binding to two G protein-coupled receptors, named CXCR1 and CXCR2 [44]. In the microenvironment of cancer cells, the IL-8 has been associated with metastasis, angiogenic response, and inducing the proliferation, survival, and migration of vascular endothelial cells [45]. The Br-Ell-SO₃Na had no effect on the levels of IL-2, IL-4 and IL-10. The main source of IL-2 is the Th1 (cellular) immune response, whereas IL-4 and IL-10 are Th2 (humoral) cytokines [46]. The Th1/Th2 balance is critically mediated by these cytokines, which are directly involved in the inflammation-driven carcinogenesis process [47]. Our findings suggest that the immunomodulatory activity of Br-Ell-SO₃Na is related to the balance between the stimulation and suppression of immune response in the tumor microenvironment, but not to the specific induction of Th1/Th2 immune responses. However, it is important to perform more tests to verify the influence of Br-Ell-SO₃Na on the modulation of immune system.

Subsequently, this study demonstrated that the water-soluble Br-Ell-SO₃Na substance synthesized by our group has anticancer and immunomodulatory potential, with no cytotoxicity activity observed against non-cancerous cells. Thus, this compound may be a good candidate to be explored as an anticancer bioactive substance in medical and pharmaceutical research.

4. Materials and Methods

4.1. General Experimental Procedures

¹H NMR spectra were recorded with a Varian VXR-300 (299.9 MHz) spectrometer. ¹³C NMR spectra were recorded with a Bruker Avance DRX 500 (125.75 MHz) spectrometer. Chemical shifts (δ) are given in ppm downfield relative to internal tetramethylsilane (TMS) for ¹H and ¹³C. Chromatography was performed on Gerudan SI 60 silica gel. Elemental analyses were performed at the analytical laboratory of the Institute of Organic Chemistry, National Academy of Sciences in Ukraine. The analytical grade solvents and commercially available reagents were used without further purification. Melting points were determined with an electrothermal capillary melting point apparatus.

4.2. Preparation of 9-bromo-5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]carbazole (1)

The compound (1) was prepared by the method described [17] (see Supplementary materials and Figure 5). We proposed some practical improvements. For the reaction between 5-bromoindole (3) and acetylacetone, the change of ethanol to toluene, and refluxing the reagents with Dean-Stark apparatus, gave a higher yield and simplified the isolation of 6-bromo-1,4-dimethylcarbazole (4). At the formylation stage, we used *N*-dimethylformamide and POCl₃ in chlorobenzene. The aldehyde (5) was isolated in a 75% yield without any additional purification. The use of a slight excess of aminoacetaldehyde dimethyl acetal allowed us to isolate the corresponding imine (6) in an almost quantitative yield. Subsequently, the imine (6) was reduced to aminoacetal (7) by excess of sodium borohydride in methanol. The yield at that step increased to 85%. Our tosylation procedure gave an almost quantitative yield (8). At the final cyclization stage to 9-bromoellipticine (1), we used dioxane in the presence of HCl, which allowed us to avoid the chromatographic purification and to increase

the cyclization yield significantly, up to 76%. Detailed information on the synthesis is given in the Supporting Information.

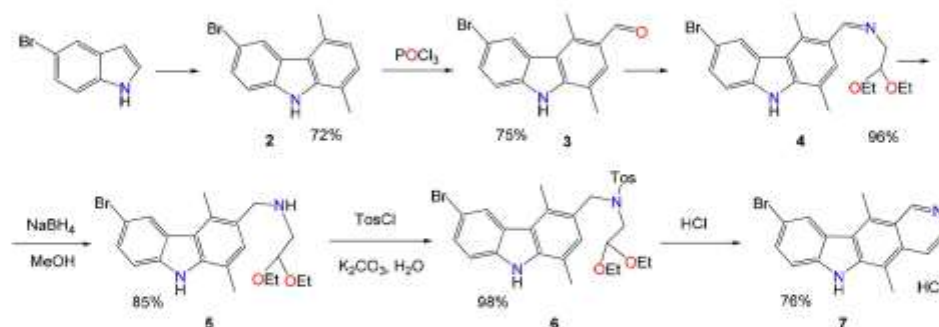


Figure 5. Synthesis of 9-bromoellipticine.

4.3. Preparation of Sodium 9-bromo-5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]carbazole-7-sulfonate (2)

Chlorosulfonic acid (3 mL) was added dropwise to 9-bromoellipticine (0.1 g) at 0 °C and stirred for 5 min. The reaction mixture was continually stirred at room temperature for 2 h. The obtained brown solution was added portionwise into crashed ice, and stirred for 10 min. The yellow precipitate was filtered, washed with water (2 × 20 mL) and dried. An aqueous solution of sodium hydroxide ~20% was chilled and added carefully dropwise to the obtained 9-bromo-5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]carbazole-7-sulfonic acid, until the pH of the product suspension reached 9. The beige precipitate was collected and washed with chilled water (2 × 1 mL). Yield 24%.

M.p. > 300 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): 2.73 (3 H, s, C(5) CH₃), 3.22 (3 H, s, C(11) CH₃), 7.76–7.77 (1H, m, C(8)H), 7.94 (1 H, d, J = 6 Hz, C(4)H), 8.44–8.46 (2 H, m, C(10)H and C(3)H), 9.71 (1 H, s, C(1)H), 10.01 (1 H, s, NH). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆): 12.1, 14.7, 109.0, 111.0, 116.5, 122.1, 122.6, 126.5, 126.9, 127.1, 129.7, 131.7, 133.4, 137.0, 139.9, 141.5, 150.4. MS (ESI): 404 (M⁻). Anal. Calcd for C₁₇H₁₂BrN₂NaO₃S: C, 47.79; H, 2.83; Br, 18.70; N, 6.56. Found: C, 47.89; H, 3.02; Br, 18.42; N, 6.47.

4.4. Cell Culture

The anticancer activity of Br-Ell-SO₃Na was evaluated against the human leukemic cell K562 (ATCC® CCL-243TM—human chronic myelogenous leukemia), since the anticancer potential of ellipticine against this cell lineage has already been reported elsewhere [48]. The selective cytotoxicity of the substance was assessed using the non-cancerous cell line Vero and human PBMCs. K562 and PBMC cells were cultured in RPMI (RPMI medium 1640/Gibco, Rockville, MD) medium supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS; Gibco), 100 µg/mL Penicillin and 100 µg/mL Streptomycin (Gibco). All cells were maintained at 5% CO₂ and 37 °C in a CO₂ incubator. The Vero cell line were cultured in DMEM medium (with 10% FBS, penicillin-streptomycin and amphotericin B), under the same conditions described above. The cells of the K562 line were acquired from the Molecular Biology Laboratory- UNICAMP, where the cell lines had already been established and maintained. Upon written consent and after approval of the Ethical Board of the Foundation of Hematology and Hemotherapy of Amazonas (HEMOAM, approval number: 3.138.343), the PBMCs cells were obtained from the peripheral blood of healthy blood donor volunteers by density gradient centrifugation using Ficoll-hypaque (GE healthcare). Freshly isolated PBMC were used in all experiments.

4.5. Cytotoxicity Assay

Cytotoxicity activity of Br-Ell-SO₃Na was determined by the Methylthiazolotetrazolium MTT assay as described elsewhere with few modifications [49]. The cell lines K562 and Vero (10⁴ cells/well) as well as PBMCs (10⁵ cells/well) were seeded into a 96-well plate and incubated for 24 h to allow the formation of the sub-confluent monolayer. After that, different concentrations of Br-Ell-SO₃Na (12–100 µg/mL) were added into the plate wells in triplicates and incubated for 24, 48 and 72 h under the same conditions described earlier [49]. After each incubation period, 10 µL of a 5 mg/mL solution of MTT was added to the wells and incubated for 4 h. The reaction was stopped by the addition of 100 µL of 0.1 N HCl in anhydrous isopropanol. Cell growth was evaluated by measuring the absorbance at 570 nm, using an automated plate reader. Non-treated cells and 100% DMSO were used as negative and positive controls, respectively. The relative viability of cells was estimated using the following equation:

$$\text{Cell viability} = \frac{\text{A570 of treated sample}}{\text{A570 of untreated sample}} \times 100\% \quad (1)$$

4.6. Cell Cycle Analysis

For determination of the cell cycle, K562 cells were seeded in a 6-well culture plate and incubated for 24 h with the compound Br-Ell-SO₃Na at concentrations of the IC₅₀ and 2 × IC₅₀, determined by the cytotoxicity assay. The cells were harvested after incubation, washed with sterile phosphate buffer saline (PBS), and fixed with ice-cold 70% ethanol for 24 h at 4 °C. After washing with PBS, the cells fixed in ethanol were incubated with 100 µL of Ribonuclease inhibitor (RNase A; 1 mg/mL) and 100 µL of propidium iodide (PI, 400 µg/mL) in an atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C for 30 min. The cells were then passed through a fluorescence activated cell sorter (FACS Calibur, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) using the doublet discrimination module. Data were acquired using Cell Quest (BD Biosciences) software. The cell cycle was modelled using ModFit software (Venty Software, Topsham, ME, USA) and percentages of the cells in S, G1, and G2M phases were calculated directly by the software.

4.7. Cytokine Analysis

Immunomodulatory activity was assessed as described in [50] with modifications. Isolated PBMC cells were cultured in RPMI-1640 medium in a 96-well plate and incubated with different concentrations of the compound Br-Ell-SO₃Na (IC₅₀ and 2 × IC₅₀) for 18 h in the CO₂ incubator. Supernatants were collected for cytokine assays after the incubation. Concentration of the IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 and IL-10 cytokines was evaluated by ELISA (BD Pharmingen OptEIA kits, San Diego, CA, USA), following the manufacturer's instructions.

4.8. Statistical Analysis

All tests were performed in triplicate. Statistical analysis was conducted through Student's t-test and ANOVA. A probability value of less than 0.05 was chosen as a criterion of statistical significance. The IC₅₀ value was calculated by a non-linear regression.

Supplementary Materials: The following are available online, Figure S1: ¹H and ¹³C spectra of compound (2) (Br-Ell-SO₃Na), Synthesis of bromoellipticine.doc—chemical procedures for 9-bromoellipticine.

Author Contributions: Conceptualization, R.C.d.O., G.S.P., A.G. and A.D.; methodology, G.B.C.C., R.C.d.O., A.D. and G.S.P.; software, validation, G.S.P., A.D. and A.G.; formal analysis, investigation, R.C.d.O., G.S.P.; resources; data curation, G.S.P., K.S. and T.S.; writing—original draft preparation, G.S.P., A.K. and A.G.; writing—review and editing, G.S.P. and A.G.; visualization, G.S.P., A.K., R.C.d.O., G.B.C.C. and A.G.; supervision, G.S.P.; project administration, A.G.; funding acquisition, A.G.; synthesis of ellipticine and its derivatives—K.S. and T.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by EU-project H2020-MSCA-RISE-2016-734759 (VAHVISTUS).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. The International Agency for Research on Cancer (IARC). Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. *Int. Agency Res. Cancer* **2018**, *263*, 1–3.
2. Zugazagoitia, J.; Guedes, C.; Ponce, S.; Ferrer, I.; Molina-Pinelo, S.; Paz-Ares, L. Current Challenges in Cancer Treatment. *Clin. Ther.* **2016**, *38*, 1551–1566. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Zsila, F. The anticancer agent ellipticine binds to glycosaminoglycans at mildly acidic pH characteristic of the extracellular matrix of tumor tissues. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 810–814. [[CrossRef](#)]
4. Goodwin, S.; Smith, A.F.; Horning, E.C. Alkaloids of *Ochrosia elliptica* Labill. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 1903–1908. [[CrossRef](#)]
5. Auclair, C. Multimodal action of antitumor agents on DNA: The ellipticine series. *Arch. Biochem. Biophys.* **1987**, *259*, 1–14. [[CrossRef](#)]
6. Auclair, C.; Paoletti, C. Bioactivation of the antitumor drugs 9-hydroxyellipticine and derivatives by a peroxidase-hydrogen peroxide system. *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 289–295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Aimova, D.; Svobodova, L.; Kotrbova, V.; Mrazova, B.; Hodek, P.; Hudecek, J.; Vaclavikova, R.; Frei, E.; Stiborova, M. The anticancer drug ellipticine is a potent inducer of rat cytochromes P450 1A1 and -1A2, thereby modulating its own metabolism. *Drug Metab. Dispos.* **2007**. [[CrossRef](#)]
8. Avendaño, C.; Menéndez, J.C. Chapter 7—Other Anticancer Drugs Targeting DNA and DNA-Associated Enzymes. In *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*, 2nd ed.; Avendaño, C., Menéndez, J.C.B.T.-M., Eds.; Elsevier: Boston, MA, USA, 2015; pp. 273–323, ISBN 978-0-444-62649-3.
9. O’Sullivan, E.C.; Miller, C.M.; Deane, F.M.; McCarthy, F.O. Chapter 6—Emerging Targets in the Bioactivity of Ellipticines and Derivatives. In *Studies in Natural Products Chemistry*; Atta-ur-Rahman, B.T.-S., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2013; Volume 39, pp. 189–232, ISBN 1572-5995.
10. Bramhananda Reddy, N.; Burra, V.R.; Ravindranath, L.K.; Naresh Kumar, V.; Sreenivasulu, R.; Sadanandam, P. Synthesis and biological evaluation of benzimidazole fused ellipticine derivatives as anticancer agents. *Monatshefte für Chemie Chem. Mon.* **2016**, *147*, 599–604. [[CrossRef](#)]
11. Horváth, D.V.; Domonyi, F.; Palkó, R.; Lomoschitz, A.; Soós, T. Regioexhaustive Functionalization of the Carbocyclic Core of Isoquinoline: Concise Synthesis of Oxoaporphine Core and Ellipticine. *Synthesis* **2018**, *50*, 2181–2190. [[CrossRef](#)]
12. Obaza-Nutaitis, J.; Gribble, G. Synthesis and Cytotoxicity of Novel Bis-Ellipticines and Bis-Isoellipticines. *Heterocycles* **2019**, *99*, 171–187. [[CrossRef](#)]
13. Miller, C.M.; O’Sullivan, E.C.; McCarthy, F.O. Novel 11-Substituted Ellipticines as Potent Anticancer Agents with Divergent Activity against Cancer Cells. *Pharmaceuticals* **2019**, *12*, 90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Sumalatha, S.; Namrata, V.; Lakshmi, M.; Sridhar, G. Synthesis and Anticancer Activity of Oxadiazole Incorporated Ellipticine Derivatives. *Russ. J. Gen. Chem.* **2019**, *89*, 505–510. [[CrossRef](#)]
15. Dilek, Ö.; Patir, S.; Tilki, T.; Ertürk, E. Total Synthesis of Olivacine and Ellipticine via a Lactone Ring-Opening and Aromatization Cascade. *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 7901–7916. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Kuskucu, M.; Akyildiz, V.; Kulmány, Á.; Ergün, Y.; Zencir, S.; Zupko, I.; Durdagi, S.; Zaka, M.; Sahin, K.; Orhan, H.; et al. Structural modification of ellipticine derivatives with alkyl groups of varying length is influential on their effects on human DNA topoisomerase II: A combined experimental and computational study. *Med. Chem. Res.* **2020**, *29*, 189–198. [[CrossRef](#)]
17. Cranwell, P.A.; Saxton, J.E. 683. A synthesis of ellipticine. *J. Chem. Soc.* **1962**, 3482–3487. [[CrossRef](#)]
18. Globocan Observatory, W. Cancer Today—World. *Int. Agency Res. Cancer* **2019**, *1*, 1–2.
19. Woodward, R.B.; Iacobucci, G.A.; Hochstein, I.A. The Synthesis of Ellipticine. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 4434–4435. [[CrossRef](#)]
20. Montoia, A.; Rocha e Silva, L.F.; Torres, Z.E.; Costa, D.S.; Henrique, M.C.; Lima, E.S.; Vasconcellos, M.C.; Souza, R.C.Z.; Costa, M.R.F.; Grafov, A.; et al. Antiplasmodial activity of synthetic ellipticine derivatives and an isolated analog. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 2631–2634. [[CrossRef](#)]

21. Rubio, O.H.; Fuentes de Arriba, Á.L.; Monleón, L.M.; Sanz, F.; Simón, L.; Alcázar, V.; Morán, J.R. Bifunctional organocatalysts based on a carbazole scaffold for the synthesis of the Hajos–Wiechert and Wieland–Miescher ketones. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 1297–1303. [\[CrossRef\]](#)
22. Garbett, N.C.; Graves, D.E. Extending nature's leads: The anticancer agent ellipticine. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents* **2004**, *4*, 149–172. [\[CrossRef\]](#)
23. Pangilinan, R.; Tice, A.; Tillotson, G. Topical antibiotic treatment for uncomplicated skin and skin structure infections: Review of the literature. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2009**, *7*, 957–965. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Paoletti, C.; Le Pecq, J.B.; Dat-Xuong, N.; Juret, P.; Garnier, H.; Amiel, J.L.; Rouesse, J. Antitumor activity, pharmacology, and toxicity of ellipticines, ellipticinium, and 9-hydroxy derivatives: Preliminary clinical trials of 2-methyl-9-hydroxy ellipticinium (NSC 264-137). *Recent Results Cancer Res.* **1980**, *74*, 107–123. [\[PubMed\]](#)
25. Anderson, G.; Clavel, M.; Smyth, J.; Giaccone, G.; Gracia, M.; Planting, A.S.; Dalesio, O.; Kirkpatrick, A.; McVie, G. Phase II study of 9-hydroxy-2-methyl-ellipticinium acetate (ellipticinium) in patients with advanced carcinoma of the lung. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **1989**, *25*, 909–910. [\[CrossRef\]](#)
26. Russell, E.G.; O'Sullivan, E.C.; Miller, C.M.; Stanicka, J.; McCarthy, F.O.; Cotter, T.G. Ellipticine derivative induces potent cytostatic effect in acute myeloid leukaemia cells. *Investig. New Drugs* **2014**, *32*, 1113–1122. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Tao, S.; Meng, S.; Zheng, X.; Xie, L. ATM participates in the regulation of viability and cell cycle via ellipticine in bladder cancer. *Mol. Med. Rep.* **2017**, *15*, 1143–1148. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Sailer, B.L.; Valdez, J.G.; Steinkamp, J.A.; Darzynkiewicz, Z.; Crissman, H.A. Monitoring uptake of ellipticine and its fluorescence lifetime in relation to the cell cycle phase by flow cytometry. *Exp. Cell Res.* **1997**, *236*, 259–267. [\[CrossRef\]](#)
29. Pietenpol, J.A.; Stewart, Z.A. Cell cycle checkpoint signaling: Cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology* **2002**, *181*, 475–481. [\[CrossRef\]](#)
30. Hartwell, L.H.; Weinert, T.A. Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* **1989**, *246*, 629–634. [\[CrossRef\]](#)
31. Monnot, M.; Mauffret, O.; Simon, V.; Lescot, E.; Psaume, B.; Saucier, J.M.; Charra, M.; Belehradek, J.; Femandjian, S. DNA-drug recognition and effects on topoisomerase II-mediated cytotoxicity. A three-mode binding model for ellipticine derivatives. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 1820–1829.
32. Poljaková, J.; Eckschlager, T.; Hraběta, J.; Hřebočková, J.; Smutný, S.; Frei, E.; Martínek, V.; Kizek, R.; Stiborová, M. The mechanism of cytotoxicity and DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine in human neuroblastoma cells. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *77*, 1466–1479. [\[CrossRef\]](#)
33. Shurin, M. Cancer as an immune-mediated disease. *ImmunoTargets Ther.* **2012**, *1*, 1–6. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Wahid, B.; Ali, A.; Rafique, S.; Waqar, M.; Wasim, M.; Wahid, K.; Idrees, M. An overview of cancer immunotherapeutic strategies. *Immunotherapy* **2018**, *10*, 999–1010. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Ribas, A.; Wolchok, J.D. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science* **2018**, *359*, 1350–1355. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Weiden, J.; Tel, J.; Figdor, C.G. Synthetic immune niches for cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **2018**, *18*, 2012–2019. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Hegmans, J.P.J.; Aerts, J.G.J.V. Immunomodulation in cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2014**, *17*, 17–21. [\[CrossRef\]](#)
38. Mikucki, M.E.; Fisher, D.T.; Ku, A.W.; Appenheimer, M.M.; Muhitch, J.B.; Evans, S.S. Preconditioning thermal therapy: Flipping the switch on IL-6 for anti-tumour immunity. *Int. J. Hyperth.* **2013**, *29*, 464–473. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Fisher, D.T.; Appenheimer, M.M.; Evans, S.S. The two faces of IL-6 in the tumor microenvironment. *Semin. Immunol.* **2014**, *26*, 38–47. [\[CrossRef\]](#)
40. Rose-John, S. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: Importance for the proinflammatory activities of IL-6. *Int. J. Biol. Sci.* **2012**, *8*, 1237–1247. [\[CrossRef\]](#)
41. Grivennikov, S.I.; Greten, F.R.; Karin, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* **2010**, *140*, 883–899. [\[CrossRef\]](#)
42. Schreiber, R.D.; Old, L.J.; Smyth, M.J. Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* **2011**, *331*, 1565–1570. [\[CrossRef\]](#)

43. Robson, R.L.; Westwick, J.; Brown, Z. Interleukin-1-induced IL-8 and IL-6 gene expression and production in human mesangial cells is differentially regulated by cAMP. *Kidney Int.* **1995**, *48*, 1767–1777. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Raghuvanshi, S.K.; Su, Y.; Singh, V.; Haynes, K.; Richmond, A.; Richardson, R.M. The Chemokine Receptors CXCR1 and CXCR2 Couple to Distinct G Protein-Coupled Receptor Kinases to Mediate and Regulate Leukocyte Functions. *J. Immunol.* **2012**, *189*, 2824–2832. [[CrossRef](#)]
45. Liu, Q.; Li, A.; Tian, Y.; Wu, J.D.; Liu, Y.; Li, T.; Chen, Y.; Han, X.; Wu, K. The CXCL8-CXCR1/2 pathways in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2016**, *31*, 61–71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Mosmann, T.R.; Coffman, R.L. TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* **1989**, *7*, 145–173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Nishimura, T.; Iwakabe, K.; Sekimoto, M.; Ohmi, Y.; Yahata, T.; Nakui, M.; Sato, T.; Habu, S.; Tashiro, H.; Sato, M.; et al. Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (Th1) and Th2 cells in tumor eradication in vivo. *J. Exp. Med.* **1999**, *190*, 617–627. [[CrossRef](#)]
48. Schwaller, M.A.; Sureau, F.; Turpin, P.Y.; Aubard, J. Intracellular distribution of ellipticine, an antitumor alkaloid in K562 leukemia cells. A microspectrofluorometric study. *J. Lumín.* **1991**, *48*, 419–424. [[CrossRef](#)]
49. Moreira da Silva, T.; Pinheiro, C.D.; Puccinelli Orlandi, P.; Pinheiro, C.C.; Soares Pontes, G. Zerumbone from *Zingiber zerumbet* (L.) smith: A potential prophylactic and therapeutic agent against the cariogenic bacterium *Streptococcus mutans*. *BMC Complement. Altern. Med.* **2018**, *18*, 301. [[CrossRef](#)]
50. Yue, G.G.L.; Chan, B.C.L.; Hon, P.M.; Lee, M.Y.H.; Fung, K.P.; Leung, P.C.; Lau, C.B.S. Evaluation of in vitro anti-proliferative and immunomodulatory activities of compounds isolated from *Curcuma longa*. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 2011–2020. [[CrossRef](#)]

Sample Availability: Samples of the compound **2** are available can be ordered from the authors.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

9.2 Artigo aceito para publicação na revista PLOS ONE PONE-D-20-06981R2 - [EMID:3d312c22caafe12]

17/09/2020

Gmail - Notification of Formal Acceptance for PONE-D-20-06981R2 - [EMID:3d312c22caafe12]



Regiane Costa
<regiane.costa17@gmail.com>

Notification of Formal Acceptance for PONE-D-20-06981R2 - [EMID:3d312c22caafe12]

1 mensagem

PLOS ONE <em@editorialmanager.com>
setembro de 2020 14:53 Responder a: PLOS ONE <plosone@plos.org>
Para: Regiane Costa de Oliveira <regiane.costa17@gmail.com>

17 de

You are being carbon copied ("cc:'d") on an e-mail "To" "Andriy Grafov" andriy.grafov@helsinki.fi
CC: "Andrii Kyrylchuk" iamkaant@gmail.com, "Ingrity Suelen Costa Sá" ingrity.scosta@gmail.com,
"Gabriel Coutinho Borges Camargo" gabrielcamargo.manaus@gmail.com, "Gemilson Soares
Pontes" pontesbm1@gmail.com, "Felipe Moura Araújo da Silva" felipemas@ufam.edu.br, "Rita de
Cássia Saraiva Nunomura" ritasnunomura@gmail.com, "Rochelly da Silva Mesquita"
rochellymesquita@gmail.com, "Regiane Costa de Oliveira" regiane.costa17@gmail.com

PONE-D-20-06981R2

Alkaloids of *Abuta panurensis* Eichler: *in silico* and *in vitro* study of
acetylcholinesterase inhibition, cytotoxic and immunomodulatory activities

Dear Dr. Grafov:

I'm pleased to inform you that your manuscript has been deemed suitable for
publication in PLOS ONE. Congratulations! Your manuscript is now with our
production department.

If your institution or institutions have a press office, please let them know about your upcoming
paper now to help maximize its impact. If they'll be preparing press materials, please inform our
press team within the next 48 hours. Your manuscript will remain under strict press embargo until 2
pm Eastern Time on the date of publication. For more information please contact
onepress@plos.org.

If we can help with anything else, please email us at plosone@plos.org.

Thank you for submitting your work to PLOS ONE and

supporting open access. Kind regards,
PLOS ONE Editorial Office Staff

on behalf of
Dr.
Alexandre
G. de
Bevern
Academic
Editor
PLOS ONE

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal
registration details at
any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/pone/login.asp?a=r>).
Please contact the publication office if you have any questions.

<https://mail.google.com/mail/u/0?ik=f2366ee078&view=pt&search=all&permthid=thread-f%3A1678104561499279193&simpl=msg-f%3A1678104>

9.3 Termo de consentimento livre e esclarecido – TCLE

TÍTULO DA PESQUISA: Avaliação *in vitro* da atividade anticancerígena de compostos naturais e semissintéticos contra neoplasias hematológicas.

Convidamos o (a) Sr (a) para participar desta pesquisa sob a responsabilidade da pesquisadora Regiane Costa de Oliveira. Abaixo seguem os dados para sua informação referentes ao estudo que o Sr (a) está sendo convidado para participar de forma voluntária.

Objetivo: Investigar a atividade anticancerígena *in vitro* de substâncias naturais contra células tumorais oriundas de neoplasias hematológicas. **Justificativa:** Presente estudo visa contribuir cientificamente para a utilização terapêutica de biomoléculas naturais e semissintéticas por meio de análise *in vitro* do seu potencial anticancerígeno. Tais informações podem servir de base para o desenvolvimento de formulações terapêuticas que poderão futuramente auxiliar o tratamento de diversas neoplasias hematológicas. **Metodologia:** Após aprovação do comitê de ética e a assinatura do TCLE, o sangue periférico será coletado de pacientes portadores de leucemia e doadores saudáveis que são rotineiramente atendidos no HEMOAM. As células mononucleares de sangue periférico (PBMC) serão isoladas por meio de centrifugação gradiente de densidade utilizando Ficoll-Hypaque (GE Healthcare) ou Histopaque-1077 (Sigma). Em seguida, as células mononucleares serão coletadas e lavadas três vezes em RPMI antes de serem cultivadas com diferentes substâncias para a avaliação das atividades anticancerígena e imunomoduladora contra células tumorais transformadas (obtidas comercialmente) e primárias (obtidas dos pacientes), ambas de linhagens de neoplasias hematológicas. **Garantia de manutenção do sigilo e da privacidade do participante:** Asseguramos ao participante da pesquisa confidencialidade, bem como o direito de recusar-se a participar. Todas as informações geradas pelo presente estudo serão conduzidas no mais absoluto sigilo e os pacientes terão acessos aos dados gerados pelo estudo sempre que desejarem. **Desconfortos, riscos:** Os riscos serão mínimos uma vez que as amostras de sangue periférico serão coletadas por profissional devidamente treinado e em caso de acidente, o paciente terá a devida assistência médica na própria instituição. **Forma de acompanhamento, assistência e garantia de indenização:** No caso de haver algum incidente em decorrência do processo de coleta das amostras sanguíneas, o pesquisador responsável garante assistência médica e indenização adequada, caso seja necessário. **Benefícios:** O projeto terá como principal benefício a identificação de biomoléculas naturais e semissintéticas que possam ter atividade anticancerígena, trazendo assim, benefícios científicos, sociais, tecnológicos e possivelmente econômico para região a médio e longo prazo. **Garantia de plena liberdade ao participante da pesquisa:** Sua participação é voluntária e se dará por meio da assinatura deste termo onde sua participação será oficializada e confirmada. Se depois de consentir em sua participação o Sr (a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa.

O (a) Sr (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com o pesquisador Gemilson Soares Pontes sempre que desejar no endereço Av. André Araújo, – Aleixo Av. André Araújo, 2936 - Petrópolis, Manaus - AM, 69067-375 Manaus - AM, pelo telefone (92) 3643-3288.

Consentimento

Pós-Informação

Eu, _____, discuti com o pesquisador sobre a minha decisão em participar nesse estudo e acredito ter sido suficientemente esclarecido a respeito das informações sobre o estudo acima citado que li ou que foram lidas para mim. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia

de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou prejuízos e sem a perda de atendimento nesta Instituição ou de qualquer benefício que eu possa ter adquirido. Eu receberei uma cópia desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e a outra ficará com o pesquisador responsável por essa pesquisa. Além disso, estou ciente de que eu (ou meu representante legal) e o pesquisador responsável deveremos rubricar todas as folhas desse TCLE e assinar na última folha.

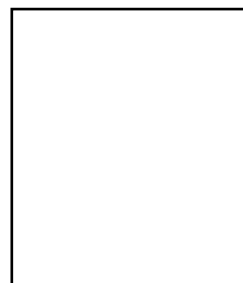
Nome do participante da Pesquisa

Assinatura do participante

Nome do Pesquisador Responsável

Assinatura do Pesquisador Responsável

Telefone do participante:



Data: ____/____/____

Impressão do dedo polegar. Caso não saiba assinar

9.4 Termo de assentimento

Você está sendo convidado para participar da pesquisa: “Avaliação in vitro da atividade anticancerígena de biomoléculas naturais contra neoplasias hematológicas)”

EXPLICAÇÃO BREVE SOBRE O PROJETO

Os pacientes que irão participar dessa pesquisa serão portadores de leucemias e doadores saudáveis que são atendidos na FHMOAM. Você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu, não terá nenhum problema se desistir.

Se você quiser participar, será colhida uma amostra de sangue da veia do braço (no máximo 5ml) com seringa e agulha. O objetivo primário é investigar a atividade anticancerígena in vitro de substâncias naturais contra células tumorais oriundas de neoplasias hematológicas. Tendo como objetivos secundários: (i) Avaliar a atividade citotóxica in vitro de biomoléculas naturais e semissintéticas contra células cancerígenas de linhagem primária e permanente; (ii) Analisar a atividade imunomoduladora de biomoléculas naturais com potencial anticancerígeno; (iii) Caracterizar a expressão gênica resultante da atividade anticancerígena induzida por biomoléculas naturais e semissintéticas; (iv) Avaliar citotoxicidade de biomoléculas naturais dirigida contra células de linhagem hematológicas normais.

Durante a coleta de sangue você poderá sentir leve dor ou apresentar (pequenos hematomas) no local da picada após a coleta. Para amenizar estes possíveis desconfortos a coleta de sangue será realizada por profissionais bastante treinado.

O sangue periférico será coletado através da utilização de materiais novos, estéreis e descartáveis, por profissionais habilitado e especializado. As amostras para cultivo celular serão retiradas das mesmas amostras coletadas para o diagnóstico, sem a necessidade de coletas extras.

Todavia, há coisas boas que podem acontecer se você participar da pesquisa. Caso permita a coleta e sua participação, um grande benefício é a contribuição para o conhecimento científico que podem servir de base para o desenvolvimento de formulações terapêuticas que poderão futuramente auxiliar o tratamento de diversas neoplasias hematológicas

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der.

Os resultados da pesquisa serão publicados e também fornecidos as autoridades de saúde da sua cidade e seu estado, mas sem identificar os participantes que participaram da pesquisa.

Polegar
Direito ou
Rubrica

Rubrica

Se você tiver alguma dúvida é só nos procurar pelos seguintes telefones:

Dr. Gemilson Soares Pontes-Coordenador do projeto – Laboratório de Virologia e Imunologia do INPA – Contato: (92) 3643-3288/ (92)982567382 Regiane Costa de Oliveira – Coordenador do projeto – Laboratório de Virologia e Imunologia do INPA – Contato: (92) 994648188

Caso você não tenha entendido alguma parte deste documento/explicação, pergunte ao investigador antes de assinar.

Consentimento Pós-Informação

Eu, _____, discuti com o pesquisador sobre a minha decisão em participar nesse estudo e acredito ter sido suficientemente esclarecido a respeito das informações sobre o estudo acima citado que li ou que foram lidas para mim. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou prejuízos e sem a perda de atendimento nesta Instituição ou de qualquer benefício que eu possa ter adquirido. Eu receberei uma cópia desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e a outra ficará com o pesquisador responsável por essa pesquisa. Além disso, estou ciente de que eu (ou meu representante legal) e o pesquisador responsável deveremos rubricar todas as folhas desse TCLE e assinar na última folha.

Local, Data (dia/mês/ano)

Assinatura do participante

Assinatura do pesquisador(a)

Impressão Datiloscópica:

Assinatura do Coordenador da pesquisa



9.5 Aprovação aspecto ético

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação in vitro da atividade anticancerígena de biomoléculas naturais contra neoplasias hematológicas

Pesquisador: Regiane Costa de Oliveira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 00547018.8.0000.0009

Instituição Proponente: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.138.343

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo exploratório laboratorial, com a proposta de utilizar substâncias naturais com potencial de inibição de neoplasias hematológicas. Anticancerígenas e imunomoduladoras. Apresenta Hipótese: Biomoléculas naturais apresentam potencial anticancerígeno e imunomodulador que podem ser explorados como nova estratégia terapêutica antitumoral contra neoplasias hematológicas.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar a atividade anticancerígena in vitro de substâncias naturais contra células tumorais oriundas de neoplasias hematológicas.

Avaliar a atividade citotóxica in vitro de biomoléculas naturais contra células cancerígenas de linhagem primária e permanente;

Analisar a atividade imunomoduladora de biomoléculas naturais com potencial anticancerígeno;

Caracterizar a expressão gênica resultante da atividade anticancerígena induzida por biomoléculas naturais;

Avaliar citotoxicidade de biomoléculas naturais dirigida contra células de linhagem hematológicas normais.

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 Bl.D Dir Ens Pesq

Bairro: Chapada

CEP: 69.050-002

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3655-0114

Fax: (92)3655-0112

E-mail: cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 3.138.343

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Indica possíveis riscos e medidas mitigadoras.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto é exequível, relevante e apresenta potencial para ampliar as discussões acerca da terapêutica advinda de pesquisas de substâncias naturais para promoção de saúde.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos estão adequados.

Recomendações:

Não há recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendência. O projeto pode ser desenvolvido.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1164724.pdf	01/10/2018 16:14:11		Aceito
Cronograma	CRONOGRAMAA.pdf	01/10/2018 16:10:29	Regiane Costa de Oliveira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termoderesponsabilidade.pdf	16/09/2018 22:57:54	Regiane Costa de Oliveira	Aceito
Outros	Equipee suasfuncoes.pdf	16/09/2018 22:49:25	Regiane Costa de Oliveira	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	TermodeanuenciaHEMOAM.pdf	16/09/2018 22:47:06	Regiane Costa de Oliveira	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	AnuencialNPA.pdf	16/09/2018 22:46:12	Regiane Costa de Oliveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCEPRegianeCosta.pdf	16/09/2018 22:42:05	Regiane Costa de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLE.pdf	16/09/2018 22:40:30	Regiane Costa de Oliveira	Aceito

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 Bl.D Dir Ens Pesq

Bairro: Chapada

CEP: 69.050-002

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3655-0114

Fax: (92)3655-0112

E-mail: cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 3.138.343

Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	16/09/2018 22:40:30	Regiane Costa de Oliveira	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderostoassinada.pdf	16/09/2018 22:06:57	Regiane Costa de Oliveira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	cartadeanuenciaAnamika.pdf	16/09/2018 21:59:28	Regiane Costa de Oliveira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	cartadeanuenciaGemilson.pdf	16/09/2018 21:58:01	Regiane Costa de Oliveira	Aceito
Outros	CartadeanuenciaDANNIEL.pdf	16/09/2018 21:57:16	Regiane Costa de Oliveira	Aceito
Outros	cartadeanuenciaPAULA.pdf	12/09/2018 00:15:06	Regiane Costa de Oliveira	Aceito
Outros	cartadeanuenciaCarlosEDUARDO.pdf	12/09/2018 00:12:26	Regiane Costa de Oliveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracaoinfraestrutura.pdf	12/09/2018 00:10:49	Regiane Costa de Oliveira	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	12/09/2018 00:10:23	Regiane Costa de Oliveira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 08 de Fevereiro de 2019

Assinado por:

**Sérgio Roberto Lopes Albuquerque
(Coordenador(a))**

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 Bl.D Dir Ens Pesq

Bairro: Chapada

CEP: 69.050-002

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3655-0114

Fax: (92)3655-0112

E-mail: cep@hemoam.am.gov.br