

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ANA LUIZA DE ARAÚJO BUTARELLI

**EFEITO ANTITUMORAL DA MOXIDECTINA E SEU POTENCIAL
SINÉRGICO À QUIMIOTERAPIA COM CISPLATINA**

SÃO LUÍS

2023

Ana Luiza de Araújo Butarelli

**EFEITO ANTITUMORAL DA MOXIDECTINA E SEU POTENCIAL
SINÉRGICO À QUIMIOTERAPIA COM CISPLATINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos

Co-orientador: Dr. André Alvares Marques Vale

SÃO LUÍS

2023

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Butarelli, Ana Luiza de Araújo.

EFEITO ANTITUMORAL DA MOXIDECTINA E SEU POTENCIAL
SINÉRGICO À QUIMIOTERAPIA COM CISPLATINA / Ana Luiza de
Araújo Butarelli. - 2024.

99 p.

Coorientador(a): André Alvares Marques Vale.

Orientador(a): Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luís, 2024.

1. Efeito antiproliferativo. 2. Lactona macrocíclica.
3. Potencial antineoplásico. 4. Reposicionamento de
drogas. 5. Tratamento combinado. I. dos Santos, Ana
Paula Silva de Azevedo. II. Vale, André Alvares Marques.
III. Título.

ANA LUIZA DE ARAUJO BUTARELLI

**EFEITO ANTITUMORAL DA MOXIDECTINA E SEU POTENCIAL
SINÉRGICO À QUIMIOTERAPIA COM CISPLATINA**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade Federal do Maranhão, como requisito
à obtenção do título de Mestre.

Aprovada em: 18/01/2024

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos
(Orientadora)

Prof^a. Dr^a. Sandra Fernanda Loureiro de Castro Nunes

Prof^a. Dr^a. Débora Luana Ribeiro Pessoa

Prof^a. Dr^a. Rachel Melo Ribeiro

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, pela vida e por ter me ajudado a chegar até aqui. Por todas as pessoas incríveis que colocou ao meu redor e por me permitir alcançar meus sonhos.

Aos meus pais, Ana Cristina e Edson, que me deram todo o amor, zelo e apoio do mundo. Obrigada por sonharem junto comigo, por todos os abraços e consolos nos momentos em que nada parecia dar certo e por serem os melhores pais que eu poderia ter. Amo vocês incondicionalmente.

À minha melhor amiga, Ana Carolina, que coincidentemente também é a minha irmã. Você é a pessoa que eu mais confio e acredito no mundo. Obrigada por ser incrível, por me inspirar tanto na vida quanto na profissão, por me incentivar a ser a melhor versão de mim, por ser tão especial, dedicada e por sempre acreditar no meu potencial. Te amo. Você merece tudo e muito mais.

À minha orientadora, que é uma das pessoas mais inteligentes e inspiradoras que eu conheço. Muito obrigada por todos os ensinamentos, puxões de orelha, paciência e apoio. A admiro imensamente. Prometo tentar ser menos dramática (algum dia eu consigo).

Ao meu co-orientador e amigo, que esteve comigo em todos os momentos da elaboração deste trabalho. Agradeço por sempre me ensinar como ser uma boa cientista e uma boa pessoa, por me lembrar o motivo de ter escolhido essa profissão e por sempre me mostrar o lado bonito das coisas. Obrigada, André.

Ao professor Lívio que foi quem abriu as portas do mundo da Moxidectina para mim. Muito obrigada pela confiança e pelo incentivo desde a graduação. Um agradecimento especial à Dauana, que se tornou uma grande amiga e com quem pude dividir meus sentimentos de angústia e preocupação. Seu apoio e encorajamento sempre me deram força.

Aos meus amigos e colegas de profissão do LIAC que foram imprescindíveis para a realização deste trabalho. Agradeço pela gentileza, por tornarem os dias mais leves, por me ajudarem de todas as formas possíveis, por me alegrarem mesmo quando todos os experimentos davam errado e por me incentivarem a seguir em frente. André, Sulayne, Mirtes, Danrley, Bianca, Larissa, Luna, Sofia, Gabriel e Gustavo, tenho muito carinho e orgulho de todos vocês.

Agradeço também à Prof^a Thiare, por sempre se fazer presente e tornar tudo mais divertido.

Aos meus colegas de turma por fazerem parte da minha jornada na pós-graduação e também por dividirem comigo momentos importantes. Agradeço especialmente à Bianca, que, além de colega de turma e laboratório, se tornou minha amiga e confidente. Obrigada por sempre estar ao meu lado, por dividir comigo o seu percurso, por acreditar em mim e sempre me apoiar. Você é uma pessoa e profissional maravilhosa.

Aos meus amigos, que tanto me apoiaram e me encorajaram a seguir meus sonhos e a fazer o que me faz feliz. Nos meus momentos mais difíceis, ansiosos e solitários vocês me deram a força e o apoio que eu precisava para seguir em frente. Thauana, Winnie e Leo, obrigada por tudo.

À todos os professores e colaboradores do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da UFMA, agradeço os ensinamentos e sugestões que permitiram que este projeto fosse executado. À todos os servidores e alunos do Prédio de Pós-Graduação do Centro de Ciências da Saúde da UFMA, por todo o comprometimento, amizade e dedicação.

Aos laboratórios LIF, LPI, LCC, Labiomol e LEFISIO pela infraestrutura, companheirismo e aprendizado.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

RESUMO

O reposicionamento de medicamentos como alternativa terapêutica para o câncer tem tido destaque pela utilização de drogas com aprovação em ensaios pré-clínicos e clínicos, atenuando os gastos e o tempo de desenvolvimento de novos fármacos. Nesse contexto, a Moxidectina (MOX) é um anti-helmíntico de amplo espectro pertencente à família das lactonas macrocíclicas que, diferente de outros fármacos da mesma família, carece de estudos que explorem seu potencial terapêutico. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial antitumoral da MOX sobre linhagens de câncer de colo uterino (HeLa e SiHa) e de mama (MCF-7 e MDA-MB-231). A viabilidade celular foi avaliada após 24 e 48 horas de tratamento com a MOX (0,48 a 62 μ M) através do ensaio de redução do MTT, para determinação da IC_{50} e do índice de seletividade. A capacidade proliferativa foi avaliada no ensaio de formação de colônias, bem como a morfologia das células tratadas. Para a avaliação do possível mecanismo de ação foram avaliados os processos de morte (apoptose e necrose) e ciclo celular, onde também foi verificado o efeito da MOX associada à cisplatina. Os resultados demonstram que a MOX reduziu a viabilidade celular seletivamente em todas as linhagens avaliadas, exceto na HeLa. As linhagens celulares MDA-MB-231 e SiHa foram mais sensíveis ao tratamento. Os valores de IC_{50} variaram entre 1,055 e 4,030 μ M, sugerindo toxicidade tempo-dependente. Além disso, a MOX reduziu significativamente a habilidade de formação de novas colônias em todas as células tratadas. Os dados mostraram que a MOX induziu apoptose nas células tumorais com efeito sinérgico a cisplatina, aumentando em mais de 80% a morte celular. O tratamento combinado na linhagem MCF-7 resultou em efeito aditivo na indução da apoptose e no aprisionamento na fase S do ciclo celular (49,2% das células), sugerindo o mecanismo de parada do ciclo celular como a via pró-apoptótica. Esses resultados foram corroborados pelas mudanças morfológicas observadas nas células tratadas, incluindo núcleos condensados, perda de volume citoplasmático e perda de adesão celular. Por outro lado, nas demais linhagens celulares, a MOX não provocou alterações significativas no ciclo celular. Em conjunto, os dados ressaltam a atividade antitumoral da MOX, contribuindo para seu reposicionamento em

esquemas terapêuticos como coadjuvante farmacológico na quimioterapia antitumoral.

Palavras-chave: Lactona macrocíclica, reposicionamento de drogas, potencial antineoplásico, efeito antiproliferativo, tratamento combinado.

ABSTRACT

The repositioning of drugs as a therapeutic alternative for cancer has gained prominence through the use of medicines approved in preclinical and clinical trials, reducing expenses and the development time of new pharmaceuticals. In this context, Moxidectin (MOX) is a broad-spectrum anthelmintic belonging to the macrocyclic lactone family. Unlike other drugs in the same family, there is a lack of studies exploring its therapeutic potential. Therefore, the aim of this study was to evaluate the antitumor potential of MOX on cervical cancer cell lines (HeLa and SiHa) and breast cancer cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231). Cell viability was assessed after 24 and 48 hours of MOX treatment (0.48 to 62 μ M) using the MTT reduction assay to determine the IC_{50} and selectivity index. Proliferative capacity was evaluated in the colony formation assay, as well as the morphology of treated cells. To assess the possible mechanism of action, cell death processes (apoptosis and necrosis) and cell cycle were examined, including the effect of MOX in combination with cisplatin. Results demonstrate that MOX selectively reduced cell viability in all evaluated cell lines, except for HeLa. MDA-MB-231 and SiHa cell lines were more sensitive to treatment, with IC_{50} values ranging from 1.055 to 4.030 μ M, suggesting time-dependent toxicity. Additionally, MOX significantly reduced the ability to form new colonies in all treated cells. Data showed that MOX induced apoptosis in tumor cells with a synergistic effect with cisplatin, increasing cell death by over 80%. Combined treatment in the MCF-7 cell line resulted in an additive effect on apoptosis induction and cell cycle arrest in the S phase (49.2% of cells), suggesting cell cycle arrest as the pro-apoptotic pathway. These findings were supported by morphological changes observed in treated cells, including condensed nuclei, loss of cytoplasmic volume, and loss of cell adhesion. Conversely, in other cell lines, MOX did not induce significant changes in the cell cycle. Overall, the data highlight the antitumor activity of MOX, contributing to its repositioning in therapeutic regimens as a pharmacological adjuvant in antitumor chemotherapy.

Keywords: Macrocyclic lactone, drug repositioning, antineoplastic potential, antiproliferative effect, combined treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estimativa global de casos incidentes de câncer no mundo, com foco na população feminina de todas as idades (excluindo câncer de pele não melanoma).	23
Figura 2- Mecanismo de ação das LMs.	32
Figura 3- Comparação da estrutura química da MOX e IVM.	35
Figura 4- Representação esquemática das principais vias biológicas envolvidas no mecanismo antitumoral da Moxidectina (Autoria própria, criado no BioRender).	38
Figura 5- Representação esquemática das linhagens celulares utilizadas no presente estudo (Autoria própria, criado no BioRender).	43
Figura 6- Método de caracterização utilizado para identificar o estado das células coradas no ensaio de fluorescência por laranja de acridina e brometo de etídio, proposto por Smith et al. (2012) com modificações.	47
Figura 7- Esquema de análise do ciclo celular.	48
Figura 8- MOX reduz a viabilidade das linhagens celulares testadas após 24h.	50
Figura 9- MOX reduz a viabilidade das linhagens celulares testadas após 48h.	52
Figura 10- Curvas dose-resposta das linhagens celulares tratadas com MOX.	55

Figura 11- MOX reduz a capacidade das linhagens tumorais de formar colônias.....	57
Figura 12- MOX reduz o número de colônias após o tratamento em 48 horas.....	58
Figura 13- MOX altera a morfologia das células tratadas.....	59
Figura 14- MOX induz as linhagens tumorais à apoptose.....	61
Figura 15- MOX reduz o quantitativo de células tumorais e as induz à apoptose.....	63
Figura 16- MOX induz a apoptose e reduz o quantitativo de células da linhagem MDA-MB-231.....	66
Figura 17- MOX induz a apoptose e reduz o quantitativo de células da linhagem MCF-7.....	67
Figura 18- MOX induz a apoptose e reduz o quantitativo de células da linhagem SiHa.	68
Figura 19- MOX induz a apoptose e reduz o quantitativo de células da linhagem HeLa.....	69
Figura 20- A MOX exerce diversos efeitos sobre o ciclo celular de células tumorais.....	71
Figura 21- Representação esquemática dos principais achados do presente estudo.....	79

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1- Linhagens celulares e suas respectivas características de acordo com o banco de dados do ATCC (*American Type Culture Collection*). 26

Tabela 1- Concentração inibitória média (IC_{50}) da MOX nas linhagens GM 07492A, MDA-MB-231, MCF-7, HeLa e SiHa nos tempos de tratamento de 24 e 48 horas.
.....48

Tabela 2- Índice de seletividade das linhagens tumorais tratadas com MOX.
.....56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATB	Antibiótico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Atg 5	<i>Autophagy Related 5</i>
ATP	Adenosina trifosfato
Bcl-2	Linfoma de células B 2
CN	Controle negativo
CO₂	Dióxido de carbono
CP	Controle positivo
CPT	Cisplatina
CYP450	Citocromo P450
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRM	Doramectina
GABA-A	Receptor do ácido gama-aminobutírico tipo A
HMGB1	<i>High mobility group Box 1</i>
h.	Hora (s)
IC₅₀	Concentração inibitória média
IS	Índice de seletividade
IVM	Ivermectina
LMs	Lactonas macrocíclicas
MDR	Multirresistência a drogas
MDR-1	Resistência Múltipla a Drogas Tipo 1
mg/ml	Microgramas por mililitro
min.	Minutos
ml	Mililitro
MOX	Moxidectina
MRP-1	Proteína 1 associada à resistência a múltiplas drogas
MRPs	Proteínas associadas a multirresistência
MTT	3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio
nm	Nanômetro
PBS	Tampão Fosfato Salino

rpm	Rotações por minuto
SFB	Soro fetal bovino
TMEM16A	Proteína transmembrana 16A
μl	Microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
2.1 Reposicionamento de fármacos.....	20
2.2 Câncer.....	21
2.2.1 Tratamento de neoplasias.....	24
2.2.1.1 Cisplatina: mecanismos de ação e resistência.....	25
2.3 Modelo <i>in vitro</i>	27
2.4 Lactonas macrocíclicas e sua importância farmacológica.....	32
2.5 Moxidectina.....	34
2.5.1 Caracterização química.....	34
2.5.2 Aplicações terapêuticas.....	36
2.5.3 Potencial antitumoral.....	36
3. OBJETIVOS.....	41
3.1 Objetivo geral.....	41
3.2 Objetivos específicos.....	41
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1 Preparação da MOX e quimioterápico.....	42
4.2 Cultura das linhagens celulares.....	42
4.3 Ensaio de triagem.....	43
4.3.1 Ensaio de MTT para definição de citotoxicidade, IC ₅₀ e seletividade.....	43
4.3.2 Ensaio de formação de colônias.....	44
4.3.3 Avaliação da morfologia celular.....	45
4.4 Ensaio para avaliação de mecanismo.....	46
4.4.1 Ensaio de apoptose e necrose.....	46
4.4.2 Ciclo celular.....	47
4.5 Análise estatística.....	48
5. RESULTADOS.....	49
5.1 MOX reduz a viabilidade das linhagens tumorais.	49
5.2 MOX apresenta efeito seletivo.	55
5.3 MOX reduz a capacidade proliferativa das células.....	56
5.4 MOX altera a morfologia e induz as células tumorais à apoptose....	58

5.5 MOX possui efeito linhagem dependente no ciclo celular.....	70
6. DISCUSSÃO.....	73
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um conjunto de mais de 100 doenças que possuem em comum o crescimento rápido e invasivo de células mutadas. Essas alterações na expressão ou função de genes essenciais para a manutenção da homeostasia celular provocam a aquisição de características malignas. Entre elas, podemos citar a perda de controle nos mecanismos de proliferação, diferenciação e morte. Essas aquisições levam a autonomia do crescimento e proliferação celular, tornando esses eventos independentes de controles externos e internos (Freitas *et al.*, 2010; Groelly *et al.*, 2022). O tratamento das neoplasias é realizado, de forma mais frequente, a partir de cirurgia, radioterapia e/ou quimioterapia. Entretanto, as alternativas farmacológicas usuais não apresentam grande seletividade, podem possuir baixa solubilidade, estabilidade limitada, baixa biodisponibilidade e efeitos secundários graves, o que afeta de forma significativa o bem-estar dos pacientes (De Oliveira *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2023).

Além da considerável inespecificidade de alguns medicamentos antitumorais, outro obstáculo clínico enfrentado no tratamento dos cânceres é a responsividade parcial ou inexistente das células tumorais a drogas quimioterápicas. Esse fenômeno de resistência explica parte da variação da eficácia dos tratamentos nos pacientes (Lage *et al.*, 2008; Chu; Sartorelli, 2018; Yan *et al.*, 2023).

Somadas a esse quadro de falha terapêutica, as estatísticas globais apontam que em 2030 mais de 25 milhões de pessoas serão diagnosticadas com câncer em todo o mundo (Santos *et al.*, 2023). Dentre os tumores que mais afetam a população feminina global estão o câncer de mama e o câncer de colo uterino. Eles são responsáveis por altas taxas de incidência e mortalidade em países desenvolvidos e em desenvolvimento (Arbyn *et al.*, 2020; Britt *et al.*, 2020; Hull *et al.*, 2020; Bouvard *et al.*, 2021; IARC, 2023; Viveros-Carreño *et al.*, 2022). O tratamento quimioterápico utilizado em ambos os casos carece de especificidade e podem prejudicar as células saudáveis das pacientes, resultando em efeitos colaterais graves.

Desta forma, a busca por novos agentes terapêuticos capazes de tratar as neoplasias com especificidade, segurança e baixo custo têm sido um dos grandes objetivos dos pesquisadores da área da oncologia. Entretanto, o processo de criação e testagem de uma nova droga demanda tempo e investimento, o que é

convertido em altos preços, tornando muitas das novas drogas inacessíveis (Sleire *et al.*, 2017).

Além dos desafios financeiros, os diagnósticos de câncer ocorrem em sua maioria em estágios mais avançados devido à falta de sintomas específicos em estádios iniciais. O desenvolvimento de resistência adquirida aos medicamentos também reduz o número de terapias acessíveis e eficazes. Estes problemas relacionados ao tratamento clínico do câncer potencializam a necessidade de desenvolver estratégias alternativas (Qin *et al.*, 2020; Weng *et al.*, 2023).

Com o intuito de promover soluções mais acessíveis, o reposicionamento de fármacos começou a ser estudado. Esse conceito visa aplicar um fármaco em um tratamento diferente daquele para o qual foi originalmente aprovado. A realocação de drogas tem levantado interesse como alternativa para a síntese de novas drogas (Pantziarka *et al.*, 2018; Weng *et al.*, 2023). Dessa forma, há a vantagem de contar com uma ampla gama de dados disponíveis na literatura, minimizando a necessidade de estudos adicionais sobre farmacocinética e toxicidade (Sleire *et al.*, 2017).

Nessa conjuntura, o reposicionamento de fármacos pode representar uma nova possibilidade para pacientes com cânceres não responsivos aos tratamentos convencionais, podendo também aumentar a eficácia da terapia através da combinação de medicamentos (Weng *et al.*, 2023). Um exemplo notável de sucesso no reposicionamento de medicamentos é o trióxido de arsênio, que, inicialmente reconhecido por sua toxicidade, hoje é aprovado pelo FDA para o tratamento da leucemia promielocítica aguda (Abaza *et al.*, 2017; Sanz *et al.*, 2019).

Nesse contexto, destaca-se a Moxidectina (MOX), um endectocida de amplo espectro com atividade contra nematóides e artrópodes, pertencente à subfamília das milbemicinas (Cobb; Boeckh, 2009; Prichard *et al.*, 2012; Kura *et al.*, 2023). Devido às semelhanças farmacológicas e estruturais com outras drogas de seu grupo, como a Ivermectina (IVM), que demonstraram atividade antitumoral (Draganovet *et al.*, 2015; Juarez *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018; Markowska *et al.*, 2019; Güler; Akildiz, 2023), a MOX emerge como uma possível candidata ao reposicionamento no tratamento oncológico. Entretanto, são escassos os trabalhos que avaliam seu potencial antineoplásico e adjuvante (Song *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2020; Mao *et al.*, 2022).

Desta forma, nossa hipótese é que a MOX apresenta propriedades antitumorais seletivas e coadjuvantes ao tratamento quimioterápico. Sendo o foco da pesquisa em linhagens de tumores não estudados previamente pela literatura, como câncer de mama, a partir da utilização das linhagens celulares MDA-MB-231 e MCF-7, e de colo uterino, a partir da utilização das linhagens celulares SiHa e HeLa.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Reposicionamento de fármacos

Ao longo dos anos o conhecimento acerca das doenças humanas têm avançado de maneira exponencial, entretanto, a devolutiva terapêutica tem sido mais lenta do que o esperado (Pushpakom *et al.*, 2018). Para tal efeito é possível atribuir diversas causas como o maior tempo para disponibilizar novos medicamentos no mercado em algumas áreas terapêuticas, alterações nos requisitos regulamentares, que podem contribuir para custos mais elevados e os riscos financeiros que o desenvolvimento de um novo medicamento podem representar para os investidores da indústria farmacêutica (Ashburn; Thor, 2004; Pushpakom *et al.*, 2018).

Como alternativa para driblar os obstáculos existentes, o reposicionamento de fármacos é uma estratégia que tem como objetivo identificar novos usos para medicamentos aprovados ou em investigação que estão fora do escopo da indicação médica original (Ashburn; Thor, 2004; Pushpakom *et al.*, 2018; Park, 2019). Desta forma, os dados sobre a segurança, biodisponibilidade, propriedades farmacocinéticas e formulação da droga já são conhecidos, o que pode reduzir custos e tempo de pesquisa (Sleire *et al.*, 2017; Tan *et al.*, 2023).

A estratégia comumente utilizada para investigar o potencial reaproveitamento de um medicamento envolve três etapas: identificação de uma molécula candidata para uma aplicação específica, análise do mecanismo de ação da droga em modelos pré-clínicos e avaliação da eficácia em ensaios clínicos de fase II. Essa abordagem pressupõe a disponibilidade de dados de segurança suficientes provenientes de estudos de fase I conduzidos como parte da indicação original (Pushpakom *et al.*, 2018).

Para a realização das etapas mencionadas anteriormente podem ser adotadas diversas metodologias e abordagens, sendo elas abordagens experimentais ou computacionais. As abordagens experimentais envolvem triagem *in vitro* de alto rendimento ou modelos *in vivo* para triagem fenotípica, enquanto as abordagens computacionais envolvem a análise de fontes de dados existentes, incluindo estruturas químicas, dados de expressão gênica, dados proteômicos e

registros eletrônicos de saúde (Pushpakom *et al.*, 2018; Park, 2019; Ahmed *et al.*, 2023).

Atualmente existem diversos exemplos bem sucedidos de reposicionamento numa série de áreas terapêuticas como o citrato de sildenafil, inicialmente utilizado para o tratamento de hipertensão que foi posteriormente reposicionado para o tratamento da disfunção erétil (Breckenridge; Jacob, 2018; Ahmed *et al.*, 2023). A talidomida, é outro exemplo exitoso, sendo anteriormente utilizada como sedativo e antiemético, e atualmente receitada para o tratamento do mieloma múltiplo, um tipo de câncer (Sleire *et al.*, 2017; Amare *et al.*, 2023; Eatmann *et al.*, 2023).

Apesar de ser um doença altamente incidente, o câncer é um conjunto de doenças que enfrenta diversos desafios na sua terapêutica e que carece de tratamentos eficazes e de baixo custo. Sendo assim, o reposicionamento de fármacos pode ser uma estratégia interessante para a descoberta de novos medicamentos antitumorais.

2.2 Câncer

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2020), o câncer está entre as principais causas de mortalidade no mundo, com aproximadamente 20 milhões de novos casos e 9,9 milhões de mortes somente no ano de 2020. No Brasil, mais de 590 mil casos de câncer foram registrados somente no ano de 2020 (IARC, 2020; INCA, 2020). Devido a sua epidemiologia, as pesquisas sobre o câncer têm sido um dos principais focos da ciência nos últimos anos, investigando, além de tratamentos e meios de prevenção, os complexos mecanismos que envolvem a formação, desenvolvimento e estabelecimento de tumores (Duarte, 2010).

O câncer é um fenômeno que tem origem a partir de mutações na sequência de nucleotídeos no DNA que alteram vias cruciais responsáveis por regular a homeostase celular e tecidual (Visser *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2019). As alterações genéticas podem surgir de fatores intrínsecos, como mutações hereditárias e erros aleatórios na replicação do DNA. Também podem ser causadas por fatores extrínsecos, incluindo danos provocados por radiação, produtos químicos e infecções por patógenos com potencial oncogênico (Tannock, 2005; Singh *et al.*, 2019). Dessa forma, apenas 5 a 10 % de todos os cânceres são resultantes de defeitos genéticos hereditários. Sendo os fatores ambientais os

principais promotores e iniciadores do processo neoplásico. Entre eles podemos destacar o tabagismo, alcoolismo, raios ultravioleta, infecções oncogênicas e dieta não saudável (Anand *et al.*, 2008; Samadder *et al.*, 2019; Barańska *et al.*, 2023).

Apesar de existirem diversos fatores e diversos fenômenos moleculares e/ou ambientais que levam uma célula normal a se transformar em uma célula neoplásica, estes processos são englobados e denominados oncogênese ou carcinogênese (Hanahan; Weinberg, 2000). O padrão observado é quase sempre o mesmo: células com capacidade de multiplicação ilimitada, evasão de sinais supressores de crescimento, invasão de tecidos (metástase), resistência à morte celular programada (apoptose), estimulação da formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese), manutenção da sinalização proliferativa, reprogramação do metabolismo energético, evasão da vigilância e destruição imunológica, instabilidade genômica, processo inflamatório não resolutivo, plasticidade fenotípica, reprogramação não mutacional epigenética e microbioma associado polimórfico (Hanahan; Weinberg, 2011; Hanahan, 2022). Embora se tenha conhecimento de um vasto número de tipos e subtipos de cânceres, as características supracitadas são expressas de forma particular pela maioria dos tumores (Hanahan; Weinberg, 2011; Fouad; Aanei, 2017; Hanahan, 2022).

Dentre esses diversos tipos de tumores, os mais incidentes em todo o mundo são o câncer de mama, próstata, pulmão, colorretal, cérvix uterino, estômago, fígado, corpo uterino, ovário e tireóide, excluindo câncer de pele não melanoma (IARC, 2023). Na população feminina em especial, os números mostram alta prevalência e incidência dos cânceres de mama e de colo uterino, ocupando a primeira e a quarta posição do ranking, respectivamente (IARC, 2023) (Figura 1).

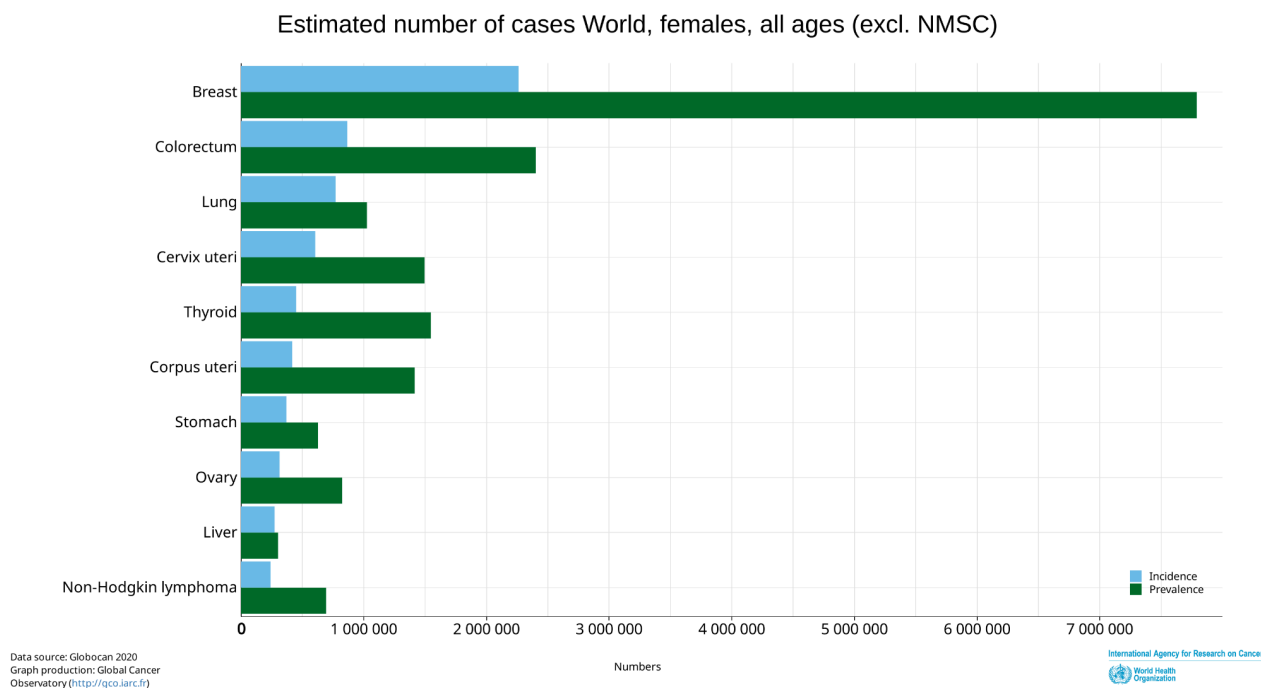


Figura 1- Estimativa global de casos incidentes de câncer no mundo, com foco na população feminina de todas as idades (excluindo câncer de pele não melanoma). Fonte: International Agency for Research on Cancer (IARC), 2023.

De acordo com a Global Burden Of Disease Cancer Collaboration (2018) uma a cada oito mulheres será afetada pelo câncer de mama em países de alta renda. No ano de 2020 as neoplasias mamárias se tornaram o tipo de câncer mais diagnosticado do mundo e são consideradas a maior causa de morte na população feminina (Britt *et al.*, 2020; IARC, 2023). O câncer de colo uterino, por sua vez, é o segundo mais comum e a segunda causa mais frequente de morte por neoplasias em mulheres em idade reprodutiva em todo o globo (Arbyn *et al.*, 2020). As maiores taxas de incidência e mortalidade são observadas em países com os menores Índices de Desenvolvimento Humano (IDH) e se relacionam com a alta prevalência de infecção pelo vírus do HPV (Papiloma Vírus Humano) (Hull *et al.*, 2020; Bouvard *et al.*, 2021).

A redução da mortalidade por esses dois tipos de tumores pode ser feita através da não exposição aos fatores de risco (como o HPV para o câncer de colo uterino), cultivo de hábitos saudáveis e o tratamento efetivo da doença, que pode abranger diversas abordagens terapêuticas (Britt *et al.*, 2020; Viveros-Carreño *et al.*, 2022).

2.2.1 Tratamento de neoplasias

Existem três tipos principais de tratamento para o câncer: ressecção cirúrgica, radioterapia e terapia medicamentosa. A terapia medicamentosa é ainda classificada em quimioterapia, terapia molecular direcionada e imunoterapia. A quimioterapia é usada isoladamente ou em combinação com ressecção cirúrgica, radioterapia ou outras terapias medicamentosas (Amaya *et al.*, 2023). A escolha da terapia é feita de acordo com as condições físicas do paciente, localização, status e estágio do tumor (Rani *et al.*, 2023).

Os agentes quimioterápicos podem ser utilizados no tratamento primário, na terapia adjuvante e na palição. A toxicidade dos fármacos quimioterápicos, em algumas circunstâncias, cria obstáculos no tratamento do câncer com base na oncologia atual (Mellor *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2023).

As drogas utilizadas no tratamento quimioterápico têm como alvo principal as células em proliferação constante e/ou rápida, características da maioria das células tumorais e de algumas populações de células normais. Os mecanismos de ação das drogas acabam por interferir nos programas bioquímicos responsáveis pela replicação e sobrevivência, levando à morte celular (Mellor *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2023). Muitos desses mecanismos de ação estão relacionados a processos redox, como a produção de espécies reativas de oxigênio, e a ligação do fármaco ao material genético. Esses eventos podem levar a apoptose e necrose celular (Baxter-Holland *et al.*, 2018). Outro mecanismo importante se dá sobre componentes do metabolismo, influenciando as atividades de diferentes enzimas necessárias ao processo de divisão (Vargas; Apetoh, 2017).

No entanto, apesar de eficazes contra células neoplásicas, a maioria dos quimioterápicos induz efeitos colaterais ao causar a morte de células saudáveis, ativando o processo apoptótico e podendo causar uma série de efeitos colaterais graves (Sak, 2012; Vargas; Apetoh, 2017; Yan *et al.*, 2023). Além da toxicidade, o tratamento antitumoral enfrenta outro desafio: a resistência a quimioterápicos presentes em alguns tumores (Romani, 2022). Um dos medicamentos que se enquadra nesses obstáculos é a Cisplatina, uma droga extensamente utilizada na terapia do câncer (Ranasinghe; Mathai; Zulli, 2022).

2.2.1.1 Cisplatina: mecanismo de ação e resistência

A cisplatina (CPT) é um derivado da platina amplamente utilizada para o tratamento quimioterápico de diversas neoplasias sólidas. Foi inicialmente caracterizada como um agente antibacteriano antes de ser reconhecida como um medicamento anticâncer (Bhattacharjee *et al.*, 2022). A absorção predominante desta substância ocorre por difusão passiva através da membrana celular. No entanto, especula-se que transportadores de cobre também possam desempenhar um papel relevante no seu transporte intracelular (Romani, 2022).

O mecanismo de ação da CPT se baseia em sua interação com o DNA para formar ligações cruzadas intra e intercadeia, impedindo a replicação das fitas, parando o ciclo celular e induzindo a apoptose pela via mitocondrial (Dasari; Tchounwou, 2014; Suberu *et al.*, 2014; Carneiro; El-Deiry, 2020; Tang *et al.*, 2022).

O processo apoptótico é uma forma altamente regulada de morte celular programada, desempenhando um papel crucial na homeostase de vários tecidos em resposta a diversos estímulos em organismos multicelulares (Bergantini *et al.*, 2005; Bras *et al.*, 2005; Carneiro; El-Deiry, 2020; Singh; Lim, 2022). É caracterizada por alterações no citoesqueleto que induzem contração celular, fragmentação do DNA, condensação da cromatina levando ao aparecimento de núcleos picnóticos, formação de vesículas sem perda de integridade da membrana e sem resposta inflamatória intensa (Duarte, 2010; Obeng, 2021).

Dentre as alterações morfológicas provocadas pela apoptose, destacam-se, na fase inicial, o encolhimento celular, que torna o citoplasma mais denso, e a formação de núcleos picnóticos. Esses eventos são resultado da condensação da cromatina, sendo esta a característica mais marcante do processo apoptótico. Na fase tardia, a formação de bolhas ou '*blebs*' na membrana plasmática, decorrente da perda da estabilidade do citoesqueleto, ocorre seguida da cariorrexe e separação de fragmentos celulares em corpos apoptóticos durante um processo denominado "brotamento". Os corpos apoptóticos consistem em materiais citoplasmáticos com organelas compactadas e que podem conter ou não um fragmento nuclear (Elmore *et al.*, 2007; Obeng, 2021).

No processo de morte celular programada existem duas vias principais: a via extrínseca ou do receptor de morte e a via intrínseca ou mitocondrial. A ativação da via intrínseca mediada pela mitocôndria é dirigida pelas proteínas da família

Bcl-2 é um dos principais mecanismos envolvidos na ação de drogas antitumorais. Bcl-2 é uma molécula efetora e uma potente supressora da apoptose. Bax/Bcl-2 regula a liberação do Citocromo C da mitocôndria para o citoplasma da célula, e o citocromo c, quando no citosol, inicia a ativação em cascata das caspases (como a caspase-3/9), o que leva à apoptose celular (Elmore *et al.*, 2007; Poon *et al.*, 2014; D'arcy *et al.*, 2019). A CPT, como já descrito anteriormente, é capaz de induzir a ativação da apoptose a partir da via mitocondrial.

Porém, apesar de demonstrar eficácia no tratamento de células neoplásicas, a terapia com a CPT pode enfrentar desafios relacionados à resistência medicamentosa e aos efeitos colaterais. A resistência à CPT pode se dar por diversos fatores como a diminuição da concentração intracelular do medicamento, aumento da reparação de danos no DNA, inativação da apoptose, ativação da transição epitelial-mesenquimal e alterações epigenéticas (Zhu *et al.*, 2016; Bhattacharjee *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2023).

Um dos mecanismos mais bem elucidados e estudados de resistência à CPT é a superexpressão de proteínas do tipo transportadores ABC (ATP-binding cassette). Essas proteínas transmembrana são capazes de realizar o efluxo de diversas moléculas para o meio extracelular, em consequência, diminuem a concentração do quimioterápico dentro da célula, o que permite que os mecanismos de reparo restaurem a integridade do DNA (Bhattacharjee *et al.*, 2022; Romani, 2022). Alguns exemplos de proteínas dessa família são MRP1, MRP2, MRP3, MRP5 e a Glicoproteína-P (P-gp) (Zhu *et al.*, 2016; Bhattacharjee *et al.*, 2022).

Além de desenvolver resistência ao tratamento, o uso da CPT pode ocasionar efeitos adversos significativos nas células saudáveis do organismo. Devido à sua eliminação ser predominantemente pelos rins, por meio de filtração glomerular e excreção tubular, a concentração desta droga no rim é mais elevada em comparação a outros órgãos. Esse acúmulo renal pode resultar em uma incidência significativa de nefrotoxicidade, tanto aguda quanto crônica (Tang *et al.*, 2023). Além de possuir toxicidade para o sistema renal, a CPT pode comprometer a saúde do trato gastrointestinal e cardiovascular, bem como diminuir a capacidade do sistema de defesa antioxidante (Dasari; Tchounwou, 2014; Romani, 2022).

Devido aos efeitos tóxicos da CPT, sua eficácia terapêutica se restringe a uma faixa de concentração bastante estreita, o que dificulta o tratamento em casos de resistência, já que não é possível aumentar a dose (Romani, 2022).

Diante desse cenário utilizam-se diversas metodologias de rastreio de novos medicamentos com maior eficácia, maior seletividade e menor toxicidade no tratamento oncológico, possibilitando a posterior utilização clínica. Alguns desses métodos de estudo são possíveis a partir de modelos *in vitro*, que permitem a triagem de novas drogas antes da aplicação de modelos *in vivo*, além de apresentarem boa reprodutibilidade e baixo custo (Kapałczyńska *et al.*, 2016).

2.3 Modelo *in vitro*

O modelo *in vitro* de cultura celular é uma técnica ampla que permite compreender vários processos biológicos. Entre eles a fisiologia, morfologia, processos patológicos, mecanismos farmacológicos e até mesmo a engenharia de tecidos (Sanyal, 2014). Tal ferramenta é constantemente utilizada nas pesquisas pré-clínicas de diversos medicamentos, entre eles os antitumorais, com o intuito de elucidar os processos celulares, moleculares e genéticos a eles envolvidos (Kapałczyńska *et al.*, 2016).

As primeiras culturas celulares datam do início do século XX, com o primeiro relato de cultura de tecidos vivos, realizado por Harrison, no Departamento de Anatomia da Universidade Johns Hopkins (Harrison, 1908). Posteriormente, em 1911, Montrose T. Burrows e Alexis Carrel conseguiram cultivar células de embriões de galinha em cultura de tecidos, no Rockefeller Institute for Medical Research em Nova York (Carrel; Burrows, 1911). Este último experimento serviu como base para os primeiros protocolos de estabelecimento de culturas (Mirabelli *et al.*, 2019).

Anos depois, em 1951, foi estabelecida a primeira linhagem celular humana com uma amostra derivada de um adenocarcinoma cervical pertencente à Henrietta Lacks, uma mulher negra de 30 anos (Masters, 2002; Lucey *et al.*, 2009). George Gey foi o responsável por manter a amostra em laboratório e conseguir, com êxito, manter a linhagem *in vitro*. Após a distribuição em massa das células para diversos laboratórios e grupos de pesquisa do mundo, iniciou-se uma revolução no entendimento de processos celulares vitais, vias bioquímicas e o funcionamento de

células neoplásicas (Masters, 2002). A partir do estabelecimento da primeira linhagem celular humana diversas outras surgiram, especialmente entre os anos de 1970 e 1980 o que possibilitou diversos estudos biológicos relacionados aos cânceres (Lucey *et al.*, 2009).

A grande vantagem das culturas de células está ligada à sua capacidade de fornecer uma fonte indefinida de material biológico para fins experimentais. Sob as condições e controles apropriados, as linhagens de células tumorais retêm a maioria das propriedades genéticas do câncer de origem, permitindo que diversos estudos sejam realizados em uma mesma amostra (Mirabelli *et al.*, 2019).

Os ensaios *in vitro* vêm ao longo de vários anos produzindo dados importantes para a triagem de possíveis fármacos de uso clínico, sendo capazes de prever com eficiência a sensibilidade dos tumores a potenciais novos tratamentos (Hoffman *et al.*, 1991). Os modelos *in vitro* simulam as condições *in vivo*, em vários graus, e podem fornecer uma alternativa aos modelos animais, sendo possível realizar diversos testes funcionais com alta reprodutibilidade (Kapałczyńska *et al.*, 2016).

Com a preservação das características de diversos tipos tumorais de relevância epidemiológica, torna-se possível o estudo da biologia do câncer e de novos agentes terapêuticos. No presente trabalho foram utilizadas quatro linhagens tumorais que representam dois dos tipos de câncer mais recorrentes na população feminina mundial (câncer de mama e câncer de colo uterino). Com o intuito de observar se o efeito antitumoral do composto a ser utilizado é de amplo espectro ou dependente de determinada característica tumoral, foram cultivadas linhagens com diferentes origens e características biológicas (Quadro 1).

As linhagens utilizadas são representativas de dois dos principais tipos de tumores com alta incidência na população feminina mundial: câncer de colo uterino e câncer de mama. Para melhor observar os efeitos da MOX em subtipos de diferentes perfis utilizamos linhagens de características mais agressivas de câncer de mama e de colo uterino, MDA-MB-231 e HeLa respectivamente, e linhagens que representam subtipos menos resistentes e de melhor prognóstico, MCF-7 e SiHa.

A linhagem HeLa, em especial, é um adenocarcinoma cervical, caracterizado por sua invasividade e alto potencial metastático (Williams *et al.*, 2015; Stolnicu *et al.*, 2019). A presença do HPV-18 amplifica a sua capacidade replicativa e suprime genes supressores de tumor (Villa; Schlegel, 1991; Noroozi *et al.*, 2022). Diferente da HeLa, a SiHa possui infecção do HPV do tipo 16. É uma linhagem de carcinoma de colo uterino isolada inicialmente por Friedl *et al.* (1970) e é descrita como um carcinoma espinocelular grau II (Meissner, 1999, Rani *et al.*, 2023).

Entre as células de câncer de mama utilizadas neste trabalho, a MDA-MB-231 é a mais agressiva, proliferativa, invasiva e menos diferenciada. Não possui expressão de receptor de estrogênio (ER) e receptor de progesterona (PR), bem como HER2 (receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2), o que a caracteriza como um tumor triplo negativo (Gol; Kheirouri, 2021; European Collection of Authenticated Cell Cultures, 2023). Esse tipo de neoplasia é frequentemente associada a piores prognósticos, baixas taxas de sobrevida e irresponsividade à terapia hormonal (Scott *et al.*, 2019, Huang *et al.*, 2020).

A MCF-7 é um modelo celular amplamente utilizado para o estudo de adenocarcinoma mamário e, diferente da MDA-MB-23, é positiva para receptor de estrogênio. Tem como características o baixo potencial de invasão e migração, habilidade de processamento do estradiol via receptores de estrogênio citoplasmáticos, heterogeneidade de fenótipos e baixo crescimento celular (RAY *et al.*, 2006; Comşa; Cimpeam; Raica, 2015; ATCC, 2023).

Quadro 1- Linhagens celulares e suas respectivas características de acordo com o banco de dados do ATCC (*American Type Culture Collection*).

Linhagem	Organismo de origem	Tipo de célula (morfologia)	Tecido	Propriedades	Marcadores de expressão	Genes expressos	Observação
MCF-7	<i>Homo sapiens</i>	Epitelial (Carcinoma mamário)	Glândula mamária	Aderente	Receptor de estrógeno	Proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina (IGFBP) BP-2, BP-4 e BP-5; WNT7B	Habilidade de processamento do estradiol via receptores de estrogênio citoplasmáticos; não possui potencial invasivo
MDA-MB-231	<i>Homo sapiens</i>	Epitelial (Adenocarcinoma mamário)	Glândula mamária	Aderente	EGF, TGF alpha	WNT7B	Linhagem triplo-negativa; invasiva
HeLa	<i>Homo sapiens</i>	Epitelial (Adenocarcinoma endocervical)	Cérvix uterino	Aderente	-	Queratina; lisofosfatidilcolina (lyso-PC) induz a atividade de AP-1; c-jun atividade da quinase N-terminal (JNK1) por uma via independente da proteína quinase C	Apresenta infecção por Vírus do Papiloma Humano tipo 18 (HPV18)
SiHa	<i>Homo sapiens</i>	Epitelial (Carcinoma de células escamosas)	Cérvix uterino	Aderente	-	Genes p53+ e pRB+	Apresenta infecção por HPV tipo 16 (HPV16).

Notas: EGF- Fator de crescimento epidérmico; TGF- Fator de crescimento transformante; WNT7B- Sítio de integração relacionado ao Wiggless.; AP-1- Proteína ativadora 1; pRB- Proteína do retinoblastoma.

função muscular e à paralisia do parasito (Gao et al., 2010; Cobb; Boeckh, 2009) (Autoria própria, criado no BioRender).

Dentro da família das LMs, as avermectinas e milbemicinas são notáveis. Elas são valorizadas pela indústria agropecuária devido a sua atividade contra artrópodes e nematóides (endoparasitas e ectoparasitas), baixa toxicidade em mamíferos, impacto ambiental mínimo e modo de ação único. Essas subfamílias têm em comum o anel de LMs de 16 membros fundido com as funções benzofurano e espirocetal em um arranjo tridimensional. Essa estrutura é reconhecida por receptores de canais iônicos de cloreto específicos (Prichard *et al.*, 2012; Davies; Green, 1986).

Além de suas aplicações antiparasitárias, as LMs também têm sido estudadas quanto à sua aplicação na terapia do câncer. Diversas são as pesquisas disponíveis na literatura que avaliam sua capacidade de inibir as células tumorais e até mesmo a multirresistência a drogas (MDR). Como exemplo, algumas avermectinas aumentam a sensibilidade à quimioterapia em doses não tóxicas, inibindo proteínas de multirresistência como a glicoproteína-P (P-gp) e o MRP1 (Korystov *et al.*, 2004).

Entre as avermectinas, a ivermectina (IVM) demonstrou efeito antineoplásico por inibir a PAK1 em células de carcinoma nasofaríngeo *in vivo* (Gallardo *et al.*, 2018). Além disso, a IVM diminui o complexo mitocondrial I, limita a função das RNA helicases NS3 e DDX23, inibe a via WNT-TCF, atua como ionóforo regulando positivamente os canais de cloreto para induzir apoptose e morte celular osmótica. Ela também estimula um microambiente enriquecido com ATP e HMGB1, aumenta a sensibilidade ao ATP e sinais de cálcio nos receptores membranares P2X, promove a poliubiquitinação da quinase PAK1, estimula a expressão de Beclin1 e Atg5 (ambas ligadas à indução de autofagia) e modifica a assinatura epigenética e a atividade de autorrenovação na célula tumoral, imitando a interação SIN3 (Dueñas-González & Juárez-Rodríguez, 2021).

Zhang *et al.* (2020) também demonstraram que os compostos avermectina B1, IVM, doramectina, selamectina e MOX são capazes de inibir o membro transmembrana 16A (TMEM16A). Essa molécula é responsável por codificar os canais Cl^- ativados por Ca^{2+} , que possui papel importante na proliferação tumorigênica, sendo este exercido através de sua função como canal.

Outro mecanismo de ação de LMs como doramectina, nemadectina, milbemicinas β 14 e secomilbemicina D no contexto antineoplásico é a inibição da função da P-gp, diminuição da expressão do gene MDR1 e do gene que codifica a P-gp (Gao *et al.*, 2010, Gao *et al.*, 2011). Já a via exercida pelas briostatinas 1, 5 e 8 está relacionada a sua capacidade de modular seletivamente a função de várias enzimas da proteína quinase C (PKC), que possuem um papel importante na regulação do crescimento e morte celular. A interação dessas drogas com a PCK leva à inibição do crescimento, diferenciação celular e morte celular programada (Figuerola; Avila, 2019).

Dentre os estudos observados na literatura, alguns medicamentos pertencentes à família das lactonas possuem pouca elucidação quanto ao seu potencial antitumoral e seu consequente mecanismo de ação. Um desses fármacos é a Moxidectina, nosso objeto de estudo.

2.5 Moxidectina

2.5.1 Caracterização Química

A Moxidectina (MOX) é um endectocida potente de amplo espectro com atividade contra diversas espécies de nematóides e artrópodes pertencente à subfamília das milbemicinas (Cobb; Boeckh, 2009; Prichard *et al.*, 2012; Muniz *et al.*, 2021). Foi isolada pela primeira vez em 1967, sendo uma derivada semissintética da metoxima do LL F-2924 α , conhecida como nemadectina, produto da fermentação da bactéria gram-positiva *Streptomyces cyaneogriseus* subsp. *noncyanogenus* (Zulalian *et al.*, 1994; Cobb; Boeckh, 2009; Prichard; Geary, 2019).

Apesar de pertencer à mesma família de compostos da IVM e possuírem mecanismos de ação muito semelhantes, a MOX difere estruturalmente. Notavelmente, falta a fração de açúcar ligada ao carbono 13 do anel macrocíclico, possui uma cadeia lateral olefínica no carbono 25 e apresenta uma fração metoxima no carbono 23 (Figura 3) (Prichard *et al.*, 2012; Bygarski *et al.*, 2014; Milton *et al.*, 2020).

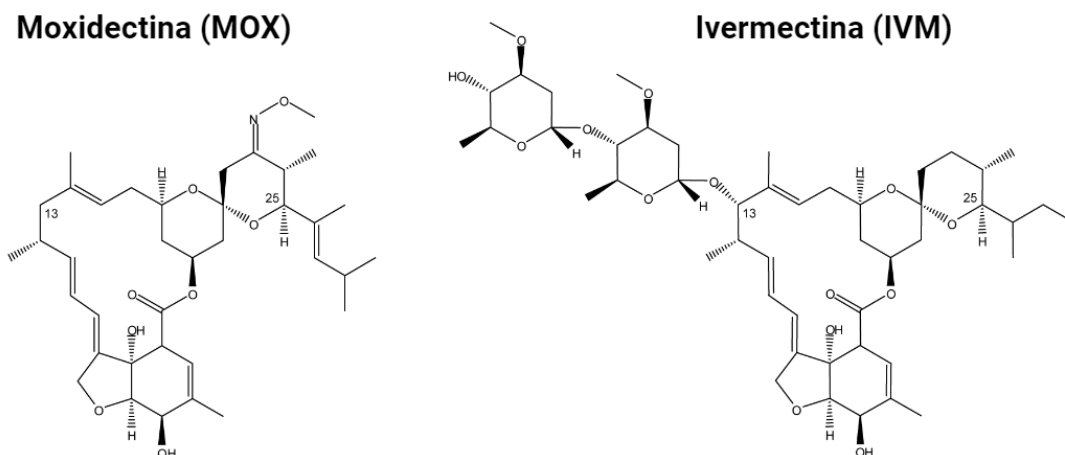


Figura 3- Comparação da estrutura química da MOX e IVM. Fonte: Ménez *et al.*, 2012; com modificações.

Devido a essas peculiaridades estruturais, a MOX apresenta maior lipofilicidade, interação fraca com os transportadores da P-gp em mamíferos, menor potencial neurotóxico e menor capacidade de causar superexpressão de P-gps e de proteínas associadas a multirresistência (MRPs) em nematóides que a IVM (Lespine *et al.*, 2006; Ardelli; Prichard, 2008; Janko; Geyer, 2013).

Sendo um composto de Classe II de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica, a MOX apresenta alta permeabilidade e baixa solubilidade. Sua absorção é rápida, apresentando o pico de concentração plasmática entre 3 a 4 horas (Korth-Bradley *et al.*, 2012). Uma vez absorvida, a MOX apresenta ampla distribuição e meia-vida longa, variando de 20 a 43 dias em seres humanos. Isso é principalmente devido à sua alta lipofilicidade, o que facilita a retenção da droga nos tecidos adiposos (Prichard *et al.*, 2012; Milton *et al.*, 2020).

Quanto ao seu metabolismo, a MOX não interage clinicamente com as enzimas do citocromo P450 (CYP450), o que aumenta a sua biodisponibilidade (Lemos; Trindade, 2014; Milton *et al.*, 2020). Em estudos *in vitro* com microsomas hepáticos de mamíferos, foi considerada um substrato limitado às enzimas do metabolismo CYP (Dupuy *et al.*, 2001).

2.5.2 Aplicações terapêuticas

A MOX é principalmente utilizada no tratamento de parasitoses de importância veterinária devido sua estabilidade molecular, versatilidade, eficácia, segurança e lipofilicidade. Estas características garantem meia-vida longa e, por consequência, maior tempo de proteção contra infecções parasitárias (Prichard *et al.*, 2012; Milton *et al.*, 2020). As doses utilizadas no tratamento das parasitoses variam de 3 µg/kg a 2.5 mg/kg e podem ser utilizadas na forma de comprimidos, injeções, géis, pastas orais ou soluções tópicas (Prichard *et al.*, 2012).

Na atualidade, a MOX é prescrita para o tratamento de um amplo espectro de parasitos internos e externos, como *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em ovelhas, *Dirofilaria immitis* em cães e gatos, e *Otodectes cynotis* em cães. Além disso, tem efeito nos estágios imaturos e adultos de lombrigas e ancilostomídeos em cães e gatos, tricurídeos e vermes pulmonares de cães, ácaros da sarna sarcóptica e ácaros do gênero *Demodex*, bem como nematódeos em equinos e pequenos ruminantes (Zulalian *et al.*, 1994; Cobb; Boeckh, 2009; Milhes *et al.*, 2017).

Em humanos, a MOX é utilizada no tratamento de Oncocercose (*Onchocerca volvulus*), no entanto já existem estudos em fase II que apontam a eficiência da MOX em conjunto com Albendazol contra Tricuríase (*Trichuris trichiura*) em adolescentes (Keller *et al.*, 2019). Por ser um microfilaricida potente, de efeito prolongado e ter demonstrado desempenho clínico superior em relação à IVM, a MOX possui potencial para viabilizar e acelerar a eliminação da oncocercose no contexto mundial (Milton *et al.*, 2020). Estudos mais recentes apontam que a MOX também tem forte potencial antiviral contra o vírus da Influenza H9 *in vitro* e *in vivo* (embrião de galinha), especialmente nas concentrações de 100 e 200 µg/ml (Hameed *et al.*, 2022).

2.5.3 Potencial Antitumoral

No que diz respeito ao potencial antitumoral da MOX, poucas pesquisas foram realizadas. No trabalho de Song *et al.* (2018) a MOX apresentou atividade antitumoral em células de glioma das linhagens U251 e C6 *in vitro*, e *in vivo* a partir de xenotransplante em camundongos BALB/c. De forma mais detalhada, nas

concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 μM houve a diminuição da viabilidade das células tumorais e maior citotoxicidade nas linhagens celulares tumorais que na linhagem celular normal (SVG P12). Ainda *in vitro* a MOX diminuiu a capacidade clonogênica, induziu a apoptose, modulou a expressão de proteínas pró-apoptóticas e induziu as células tumorais à parada na fase G0 e G1 do ciclo celular. *In vivo*, a MOX foi capaz de retardar o crescimento do xenoinxerto e aumentar a taxa apoptótica no tecido tumoral a partir da modulação proteica demonstrada nas etapas *in vitro* (Figura 4).

Também utilizando as linhagens celulares de glioma U251 e C6 e ensaios *in vivo*, Liu *et al.* (2020) demonstraram que a MOX foi capaz de estimular a autofagia de forma dose dependente a partir da inibição da via de sinalização AKT/mTOR. Mecanismo semelhante foi encontrado por Mao *et al.* (2022), em que a MOX foi capaz de alterar o funcionamento da via AKT/mTOR e induzir a paralisação da autofagia nas células de câncer colorretal (HCT15 and SW620). No estudo, esta LMs foi capaz de iniciar a autofagia e impedir que o processo fosse finalizado através da interrupção da formação de autofagolissosomos. Estas são estruturas finais do processo de autofagia, que consistem na fusão do autofagossomo com o lisossomo e consequente eliminação do conteúdo presente na vesícula. Além dos danos às estruturas autofágicas, a MOX também diminuiu a capacidade proliferativa, alterou o funcionamento da via PI3K-Akt-mTOR e reduziu a acetilação dos microtúbulos das células tratadas (Figura 4).

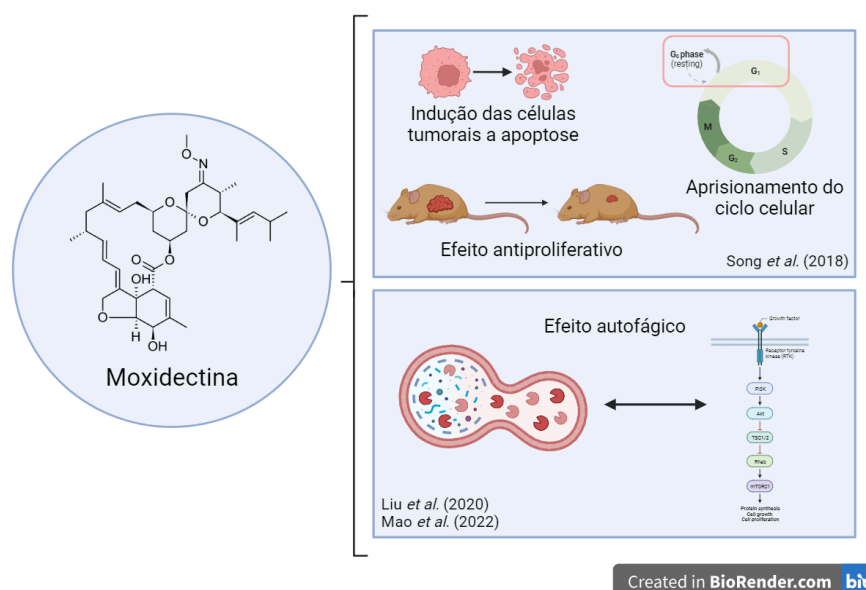


Figura 4- Representação esquemática das principais vias biológicas envolvidas no mecanismo antitumoral da Moxidectina (Autoria própria, criado no BioRender).

Na base de dados do PubMed (2023) foram identificados apenas 26 trabalhos com as palavras-chave *Moxidectin* e *cancer*, sendo que parte deles não utiliza a MOX como composto de interesse, apenas como citação. Apesar dos escassos trabalhos que demonstram o potencial da MOX na pesquisa relacionada aos tumores, já existem evidências que demonstram o potencial de outras LMs na terapia antitumoral. Sabe-se, por exemplo, que as avermectinas, subfamília a qual pertence a IVM, em estudo realizado por Korystov *et al.* (2004), foram capazes de aumentar significativamente a sensibilidade de células tumorais das linhagens Hep-2 e P388 ao taxol e vincristina em um ensaio de sinergismo ou combinação. Esse efeito adjuvante encontrado nas avermectinas pode ser usado com o objetivo de aumentar a efetividade dos tratamentos antineoplásicos (Korystov *et al.*, 2004).

No grupo das LMs, a investigação da atividade antitumoral concentra-se, até o momento, na família das avermectinas, em especial a IVM, uma vez que esta representa a droga mais estudada e amplamente utilizada do grupo (Juarez *et al.*, 2018). Sua ação antitumoral já foi comprovada em células da linhagem de câncer de mama, entre elas a MCF-7. Por meio da ativação dos mecanismos autofágicos, a IVM levou a inibição tumoral tanto *in vitro* como *in vivo*, demonstrando seu potencial quimioterápico, em adição a sua ação antiparasitária (Dou *et al.*, 2016).

Outras avermectinas como a avermectina C e a avermectina B1 também já se mostraram potentes agentes antitumorais no tratamento das linhagens de Carcinoma de Ehrlich, P388, CA-755 e B16 *in vivo*. Esses dois compostos reduziram em cerca de 70-80% o crescimento das linhagens tumorais. Quando injetadas após a administração de vincristina, as avermectinas foram capazes de aumentar a efetividade induzida pelo quimioterápico (Drinyaev *et al.*, 2004).

A IVM é experimentalmente bem caracterizada como um potencial agente antineoplásico eficaz no tratamento de linhagens de câncer de ovário humano (Hashimoto *et al.*, 2009), leucemias (Sharmeen *et al.*, 2010) e câncer de mama (Dou *et al.*, 2016). Além disso, demonstrou eficácia contra câncer de cólon, glioma, melanoma e carcinoma bronquiolar de não pequenas células (Melotti *et al.*, 2014). Tais estudos indicam que a IVM é uma opção em potencial para o tratamento de diversos tipos tumorais. Por possuir semelhanças no mecanismo de ação da IVM, supõe-se que a MOX também se apresenta como um agente promissor no tratamento do câncer, sendo essa uma das hipóteses do presente trabalho.

Gao *et al.* (2010) utilizaram dois novos compostos de milbemicina, milbemicina β 14 e secomilbemicina D, na reversão da resistência a múltiplas drogas (MDR) de células de carcinoma de mama humano resistente à adriamicina (MCF-7/adr) *in vitro*. Foi observado que ambas as milbemicinas apresentaram potencial para aumentar a citotoxicidade da adriamicina em relação às células MCF-7/adr, sugerindo os dois compostos como moléculas promissoras na reversão da MDR.

A doramectina (DRM), outra droga pertencente ao grupo das milbemicinas, assim como a MOX e a IVM, também demonstrou potencial antineoplásico em linhagem celular de glioma (Du *et al.*, 2023). O composto inibiu a viabilidade das células da linhagem C6 através da indução da apoptose pela via Bcl-2/Bax/Caspase-3. Além disso, a superprodução de espécies reativas de oxigênio, desencadeou o processo de necrose via RIPK1/RIPK3/MLK. Esses resultados confirmaram o potencial antitumoral da DRM *in vivo* e *in vitro* em concentrações entre 5 a 40 μ M.

Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa indicam que a MOX exerceu efeito citotóxico seletivo em linhagens celulares de câncer de mama. A mesma ainda foi capaz de alterar a morfologia das células tumorais, apresentando diversas características relacionadas ao processo apoptótico. Tal observação foi

corroborada pelo ensaio de marcação com anexina V e iodeto de propídeo que indicou que mais de metade das células tumorais se encontravam em diversos estágios da apoptose. A MOX também induziu a parada do ciclo celular na fase S, sendo este um possível mecanismo de ação da LMs nas células tumorais. Por já ter apresentado potencial em ensaios anteriores, e os já conhecidos de outros membros dessa família de fármacos, a hipótese do presente estudo é de que a MOX apresenta potencial antitumoral contra diversas linhagens celulares neoplásicas e apresenta potencial adjuvante ao tratamento quimioterápico *in vitro*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antitumoral e/ou adjuvante da Moxidectina *in vitro* em linhagens celulares de câncer de colo uterino e de mama.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a viabilidade das culturas tumorais após o tratamento com MOX;
- Determinar a concentração inibitória média (IC₅₀) da MOX nas linhagens celulares;
- Verificar se a MOX apresenta efeito seletivo nas linhagens utilizadas;
- Identificar a possível influência da MOX nos mecanismos celulares de proliferação;
- Avaliar a toxicidade da cisplatina nas culturas tumorais quando associado à MOX;
- Observar possíveis alterações morfológicas das linhagens celulares utilizadas após tratamento com a MOX e MOX+Cisplatina;
- Analisar o tipo de morte celular induzido após os tratamentos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Preparação da Moxidectina e quimioterápico

A MOX (cedida pela Zoetis) foi pesada e diluída em dimetilsulfóxido (DMSO) para a obtenção de uma solução estoque (25 mM) que foi armazenada a -20°C. A partir desta solução inicial foram feitas as concentrações necessárias para a realização dos testes com o meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 1% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco). As diluições realizadas tiveram como concentração final de DMSO menos de 0,1% do volume total, como propõe SONG *et al.* (2018).

A Cisplatina (CPT) (cis-Diammineplatinum (II) dichloride, Sigma-Aldrich) foi pesada e diluída em Tampão Fosfato-Salino (PBS) para preparar a solução estoque (100 mM). Seguida dessa etapa, ocorreu a diluição para a concentração desejada (5 mM), conforme as recomendações do fabricante em relação à estabilidade do composto. As soluções preparadas eram utilizadas até uma semana após o preparo e mantidas a -20°C.

4.2 Cultura das linhagens celulares

Foram utilizadas as linhagens celulares MCF-7 (adenocarcinoma de mama), MDA-MB-231 (adenocarcinoma mamário), HeLa (adenocarcinoma de colo uterino) e SiHa (câncer cervical), obtidas pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) (Figura 5). Além disso, como controle de célula não tumoral, foi utilizada a linhagem GM07492A (fibroblasto pulmonar não tumorigênico), que foi gentilmente cedida pela Dra. Denise Crispim Tavares do Laboratório de Mutagêneses da Universidade de Franca. As células foram mantidas em garrafa de cultura contendo meio DMEM suplementado a 10% de SFB e 1% de antibiótico (ATB) (Penicilina Estreptomicina e Anfotericina B), em atmosfera de 5% de CO₂, à 37 °C. Quando as monocamadas atingiram cerca de 60 a 80% de confluência, as garrafas foram repicadas para a obtenção da suspensão celular e realização dos ensaios posteriormente citados. O repique foi realizado utilizando PBS para lavagem das células, seguido da adição de Tripsina 1x para a dissociação enzimática durante 5 minutos à 37 °C. A ação da tripsina foi inibida a partir do acréscimo de meio DMEM + 10% SFB. As células

foram centrifugadas a 1200 rpm durante 10 min e ressuspensas em 2 ml de meio de cultura suplementado. O número total de células da suspensão foi obtido pela contagem em câmara de Neubauer com azul de Tripán a 0,04% (1:1). A concentração celular foi ajustada conforme a necessidade de cada ensaio.

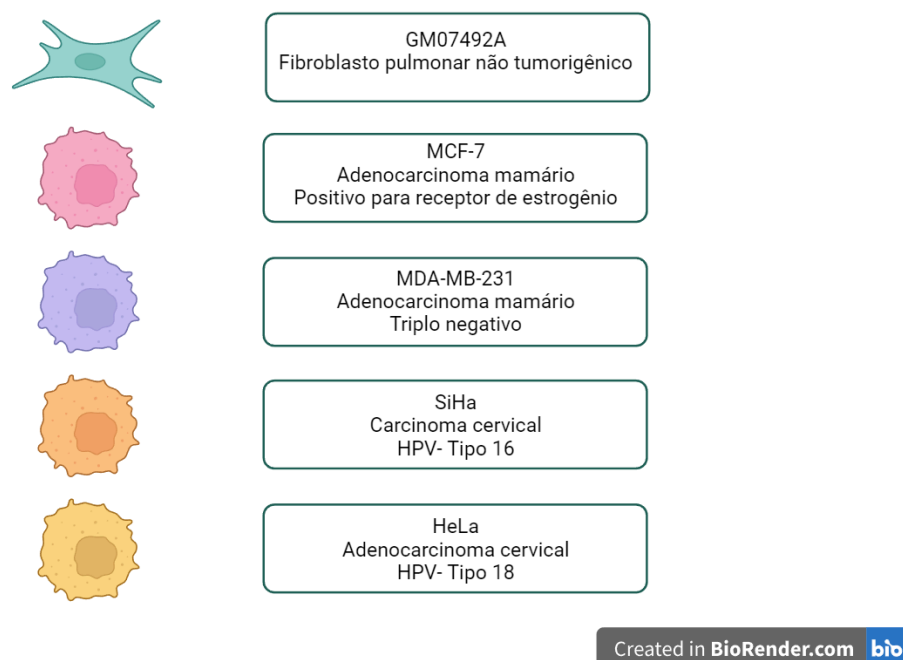


Figura 5- Representação esquemática das linhagens celulares utilizadas no presente estudo (Autoria própria, criado no BioRender).

4.3 Ensaios de triagem

4.3.1 Ensaio de redução do MTT para determinação de citotoxicidade, IC₅₀ e seletividade

Para a determinação da citotoxicidade foi realizado o ensaio de redução do 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Invitrogen). Para isso, as células de cada linhagem foram plaqueadas em placas de 96 poços de fundo chato na densidade de 1×10^4 células por poço. Após 24h de incubação em meio com 10% SFB, em estufa com atmosfera de 5% de CO₂, à 37 °C (GAO *et al.*, 2010), as culturas foram tratadas com MOX nas concentrações de 0,48; 0,96; 1,93; 3,8; 7,75; 15,5; 31 e 62 µM, no volume de 100 µl por poço, durante 24 e 48h. Todos os tratamentos foram realizados utilizando meio DMEM suplementado com 1% de SFB. Ao final de cada tempo de tratamento, foram adicionados 10 µl de MTT (5 mg/ml)

por poço. As placas foram incubadas durante 3 horas a 37°C em estufa e, após a formação e deposição dos cristais de formazan, as placas foram vertidas para a retirada do sobrenadante. Foram acrescentados 100 µl de álcool etílico 99% por poço para a diluição dos cristais. Após a homogeneização dos poços a absorbância foi analisada em espectrofotômetro (BioTek Epoch), no comprimento de onda de 570 nm (LIU *et al.*, 2014). Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle negativo, sem tratamento. A saber: Porcentagem de viabilidade = [(Absorbância dos tratamentos/Absorbância do controle negativo)] *100)

Os controles utilizados foram meio DMEM suplementado com 1% de SFB, para o controle negativo (NC), e CPT na concentração de 5 mM, para o controle positivo (PC). Foram realizados 3 experimentos independentes em triplicatas para cada linhagem. Os dados foram plotados em tabelas no Excel e as análises estatísticas feitas no *software* GraphPad Prism 7 (GraphPad Prism Software Inc., San Diego, California) para a determinação das médias de viabilidade dos tratamentos e da concentração inibitória média (IC₅₀). As curvas dose-resposta foram plotadas com base nos dados obtidos do ensaio de redução do MTT e após a transformação das concentrações em µM para Log (X = LogX) e normalização dos dados, foi realizada uma curva de regressão não linear.

Para avaliar a existência de efeito seletivo no tratamento com a MOX foi feito o cálculo do índice de seletividade (IS), cuja equação se encontra descrita abaixo:

$$IS = \frac{IC_{50} \text{ da linhagem normal}}{IC_{50} \text{ da linhagem tumoral}}$$

De acordo com Zingue *et al.* (2016) caso a taxa obtida pela divisão dos valores de IC₅₀ das linhagens celulares não tumorais (GM07492A) e tumorais (MCF-7, MDA-MB-231, HeLa e SiHa) seja maior que 1.0 (IS > 1.0), assume-se que a substância testada possui maior seletividade para células neoplásicas.

4.3.2 Ensaio de formação de colônias

O ensaio clonogênico foi performed para avaliar a capacidade de proliferação das linhagens tumorais após o tratamento com os compostos de

interesse. Desta forma, de acordo com o protocolo descrito por Rafehi (2011) com modificações, as células em cultura foram tripsinizadas e contadas. Em seguida, foram adicionadas 700 células por poço em placas de 12 poços. Todos os tratamentos foram realizados utilizando meio DMEM suplementado com 1% de SFB. Após 24h de incubação, as células foram tratadas com a IC₅₀ da MOX (de cada linhagem), no volume de 1 ml por poço, durante 48h. Após este período o meio de cultura foi substituído por meio fresco, sem tratamento, suplementado com 1% de SFB. A reposição foi realizada a cada 48h, até que se completassem 10 dias de incubação. Após o término do experimento, as células foram lavadas com PBS e posteriormente fixadas com álcool etílico P. A. durante 15 minutos. Após a fixação, as colônias foram coradas com cristal violeta (0,5% em 25% de Metanol) no volume de 500 µl por poço durante 30 min. O corante foi retirado e os poços foram lavados com água destilada. As placas foram fotografadas com câmera fotográfica para posterior contagem de clones a partir da utilização do software ImageJ (Bethesda, MD). A densidade óptica proveniente do corante retido nas colônias também foi avaliada através da adição de 500 µl de metanol por poço durante 5 min. Os eluatos foram coletados e plaqueados em placas de 96 poços para leitura no espectrofotômetro (BioTek Epoch) no comprimento de onda de 595 nm.

4.3.3 Avaliação da morfologia celular

Para avaliação da morfologia das linhagens em resposta ao tratamento com a MOX as células foram cultivadas em placas de 24 poços na concentração de 3×10^4 células por poço. Após 24h de incubação, as culturas foram tratadas com MOX (em suas respectivas IC₅₀) e MOX+CPT (nas concentrações da IC₅₀ e 5 µM, respectivamente) no volume de 400 µl por poço, durante 48h. Todos os tratamentos foram realizados utilizando meio DMEM suplementado com 1% de SFB. Foram capturadas 3 imagens de cada um dos grupos de tratamento, de dois experimentos independentes, adquiridas através de um microscópio invertido com câmera fotográfica acoplada (Eclipse Ti (Nikon)). As fotografias foram analisadas através do *software* ImageJ (Bethesda, MD) para avaliação do formato celular, número de células por campo (células/campo), presença de vacúolos, retração celular, alterações de adesão, presença de bolhas na superfície celular e alterações nucleares (Alsaedi *et al.*, 2019).

4.4 Ensaios para avaliação de mecanismo

4.4.1 Ensaio de apoptose e necrose

Para avaliação do tipo de morte celular observada após o tratamento, as linhagens foram cultivadas em placas de 48 poços na concentração de 3×10^4 . Todos os tratamentos foram realizados utilizando meio DMEM suplementado com 1% de SFB. O tratamento com MOX (IC_{50}) e MOX+CPT (nas concentrações da IC_{50} e 5 μ M, respectivamente) foi realizado no volume de 300 μ l por poço, durante 48h. Todos os tratamentos foram realizados utilizando meio DMEM suplementado com 1% de SFB. Após o tempo de incubação, as placas foram centrifugadas por 5 min a 1000 rpm e posteriormente o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado. O meio retirado foi substituído por uma solução contendo meio DMEM suplementado com SFB (10%), laranja de acridina (50 μ g/ml) e brometo de etídio (50 μ g/ml). As placas foram novamente centrifugadas e, após 2 min de incubação ao abrigo da luz, foram levadas ao microscópio de fluorescência (Eclipse Ti (Nikon)). As imagens foram obtidas no aumento de 20x, utilizando os cubos de fluorescência EGF (para a visualização da fluorescência verde) e CY3 (para a visualização da fluorescência vermelha). Após a aquisição das imagens, foi realizada a sobreposição das fluorescências e posteriormente as células foram analisadas através do software ImageJ (Bethesda, MD).

As células foram classificadas em três categorias: 1- Viáveis, quando apresentavam núcleo de coloração verde, não condensado e sem alterações visíveis; 2- Apoptóticas, quando apresentavam núcleo verde ou vermelho condensado, fragmentado ou com alguma outra alteração visível; 3- Necróticas, quando apresentavam núcleo vermelho, não condensado e sem alterações visíveis (Figura 6)(Smith *et al.*, 2012). Foi conduzida uma análise qualitativa, na qual 100 células foram contadas aleatoriamente em cada imagem e classificadas como viáveis, apoptóticas ou necróticas. Além disso, empregou-se um método quantitativo, no qual as imagens foram divididas em 4 quadrantes e o número total de células no quadrante mais representativo foi contado e caracterizado.

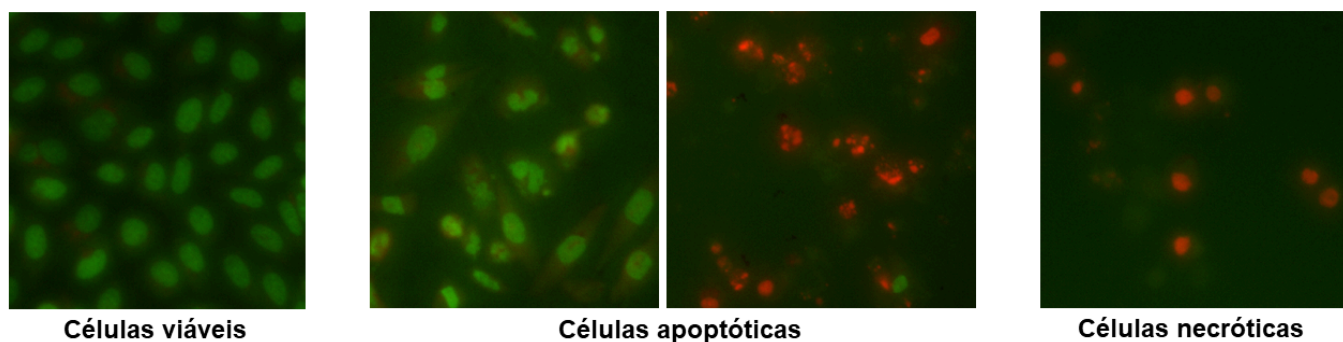


Figura 6- Método de caracterização utilizado para identificar o estado das células coradas no ensaio de fluorescência por laranja de acridina e brometo de etídio, proposto por Smith *et al.* (2012) com modificações.

4.4.2 Ciclo celular

Foram plaqueadas 2×10^4 células em placas de 24 poços durante 24 horas, em seguida, foi realizado o tratamento com MOX (IC_{50}) e MOX+CPT (nas concentrações da IC_{50} e 5 μ M, respectivamente), no volume de 300 μ l por poço, durante 48h. Todos os tratamentos foram realizados utilizando meio DMEM suplementado com 1% de SFB. Após o tratamento das culturas, os poços foram lavados duas vezes com PBS em temperatura ambiente e em seguida, foi realizada a desagregação celular enzimática através da adição de 200 μ l de tripsina e posterior incubação por 3 a 4 min a 37°C em estufa. A suspensão celular obtida foi centrifugada a 1200 rpm durante 1 min, lavada com PBS, centrifugada novamente (1200 rpm por 1 min) e incubada em álcool 70% sob refrigeração (-20°C) até o momento da marcação. As células foram então centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi retirado e foi realizada a marcação com uma solução contendo Triton a 0,1%, RNase (RNase A, Thermo Fisher Scientific) a 20 mg/ml e IP a 50 μ g/ml. Em seguida, as células foram incubadas overnight sob refrigeração e abrigo da luz. No dia seguinte, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo Guava easyCyte™ HT System, a partir da aquisição de 5000 eventos no canal vermelho (RED-B). As amostras adquiridas foram analisadas através do programa FlowJo™ Software (Versão 10, Becton, Dickinson and Company, 2019).

Foram adquiridos 5.000 eventos por amostra no gate de interesse após a verificação da população celular através dos parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) na escala logarítmica. Para a identificação e retirada dos

doublers foram utilizados dot plots formados pelos parâmetros área da fluorescência (RED-B-ALin: Red-B Fluorescence Area (RED-B-ALin)) versus largura do sinal (RED-B-W : Red Fluorescence Width (RED-B-W)). Após o isolamento dos singlets, o histograma do canal vermelho em escala linear foi utilizado para a análise do ciclo celular (Figura 7).

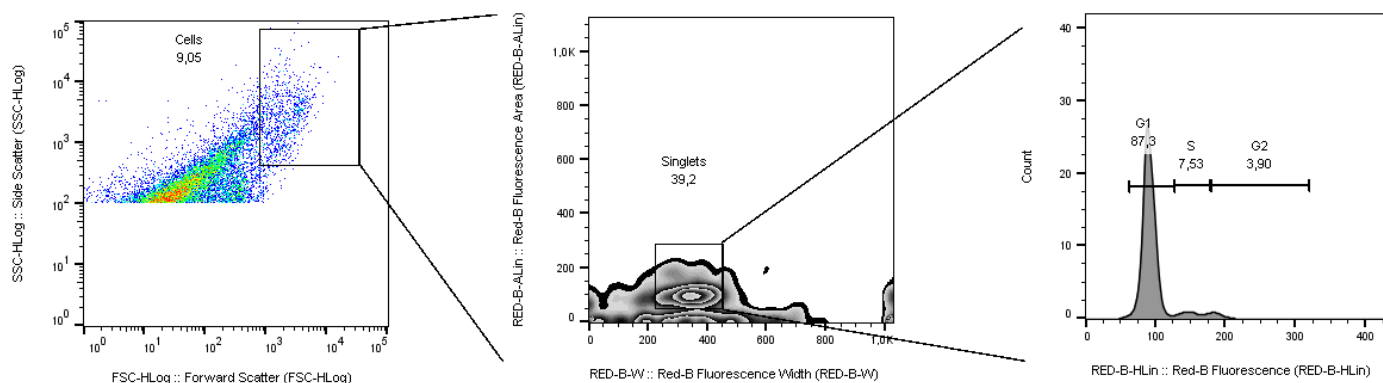


Figura 7- Esquema de análise do ciclo celular. À esquerda, método de identificação da população de interesse a partir dos parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) na escala logarítmica. Ao centro, gráfico formado pelos parâmetros área e largura da fluorescência obtidos no canal vermelho (RED-B), referente à marcação com iodeto de propídeo (IP), na escala linear. À direita, método de análise do ciclo celular com a identificação das fases G1, S e G2.

4.5 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média ou média $\pm$ desvio padrão. A distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Para a análise estatística, foram aplicados os testes one-way ANOVA para dados com distribuição normal ou Kruskal-Wallis para dados não gaussianos. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 7 (GraphPad Prism Software Inc., San Diego, Califórnia). O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS

5.1 MOX reduz a viabilidade das linhagens tumorais

Para observar se a MOX é capaz de reduzir a viabilidade celular de forma seletiva, as linhagens normais e tumorais foram inicialmente submetidas ao ensaio de citotoxicidade fundamentado pela redução do MTT. Foram testadas as concentrações de 62; 31; 15,5; 7,75; 3,8; 1,93; 0,96 e 0,48 μM de MOX durante 24 e 48 horas. Os resultados obtidos podem ser observados nas Figuras 9 e 10.

24 horas

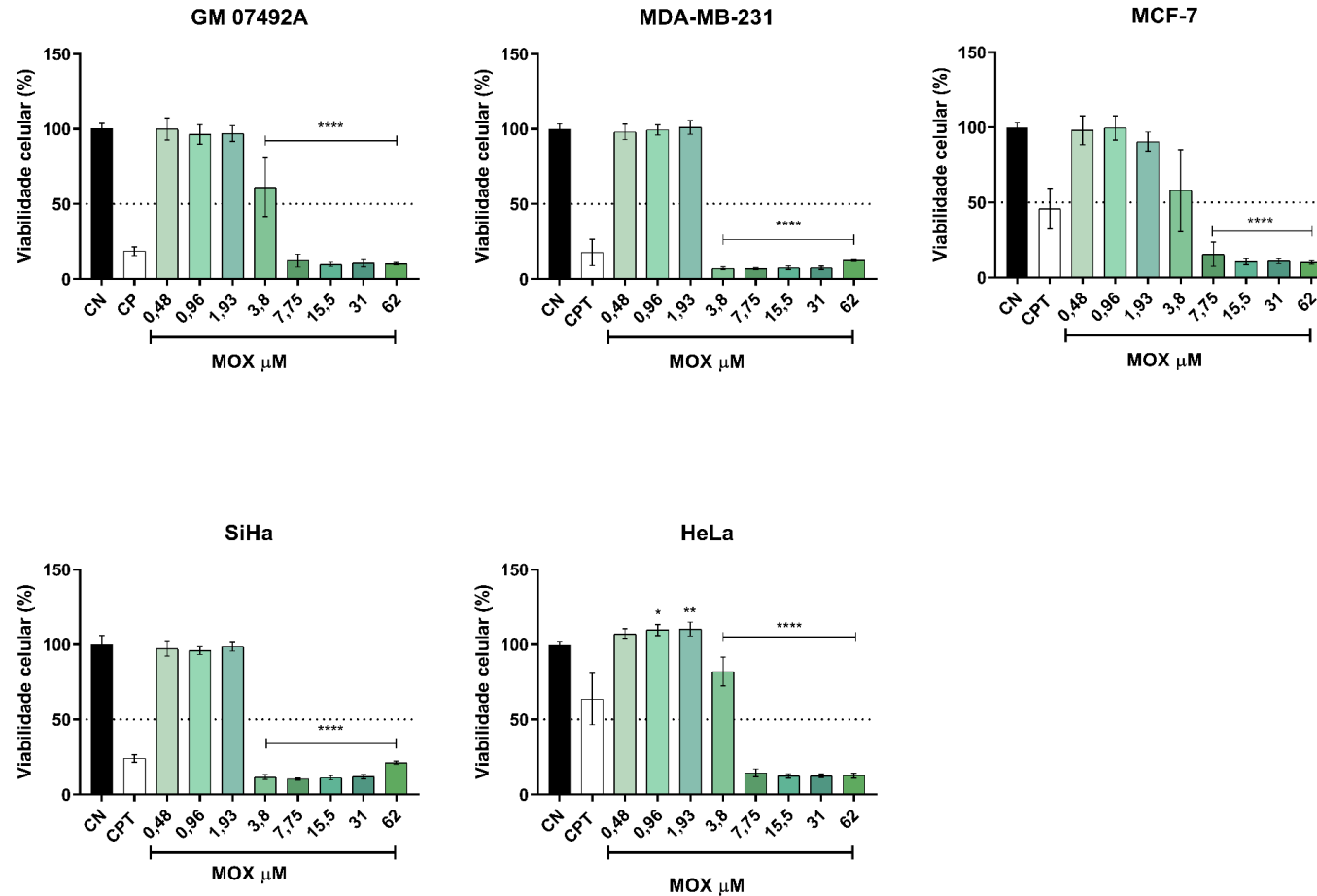


Figura 8- MOX reduz a viabilidade das linhagens celulares testadas após 24 h. Os dados representam a média em porcentagem de viabilidade (%) $\pm$ o desvio padrão (SD). CN- controle negativo (DMEM+ 1% SFB); CPT- cisplatina a 5 mM; CP- controle positivo (DMEM+ 20% DMSO). Índice de viabilidade da linhagem normal (GM07492A - fibroblasto pulmonar não tumorigênico) e tumorais (MCF-7 - adenocarcinoma de mama, MDA-MB-231 - adenocarcinoma mamário, HeLa - carcinoma de colo uterino e SiHa - câncer de colo uterino), após 24 horas de tratamento. Para a análise da diferença foi utilizado o one-way

ANOVA seguido do pós-teste de Tukey- Kramer sendo considerado um valor significativo de * $p \leq 0,05$. ** $p \leq 0,01$ e **** $p \leq 0,001$. A linha tracejada representa 50% da viabilidade celular. Os dados são provenientes de 3 experimentos independentes, com 3 repetições experimentais. Houve diferença estatística entre os grupos NC e CPT; no entanto, essa diferença não foi representada de forma gráfica.

48 horas

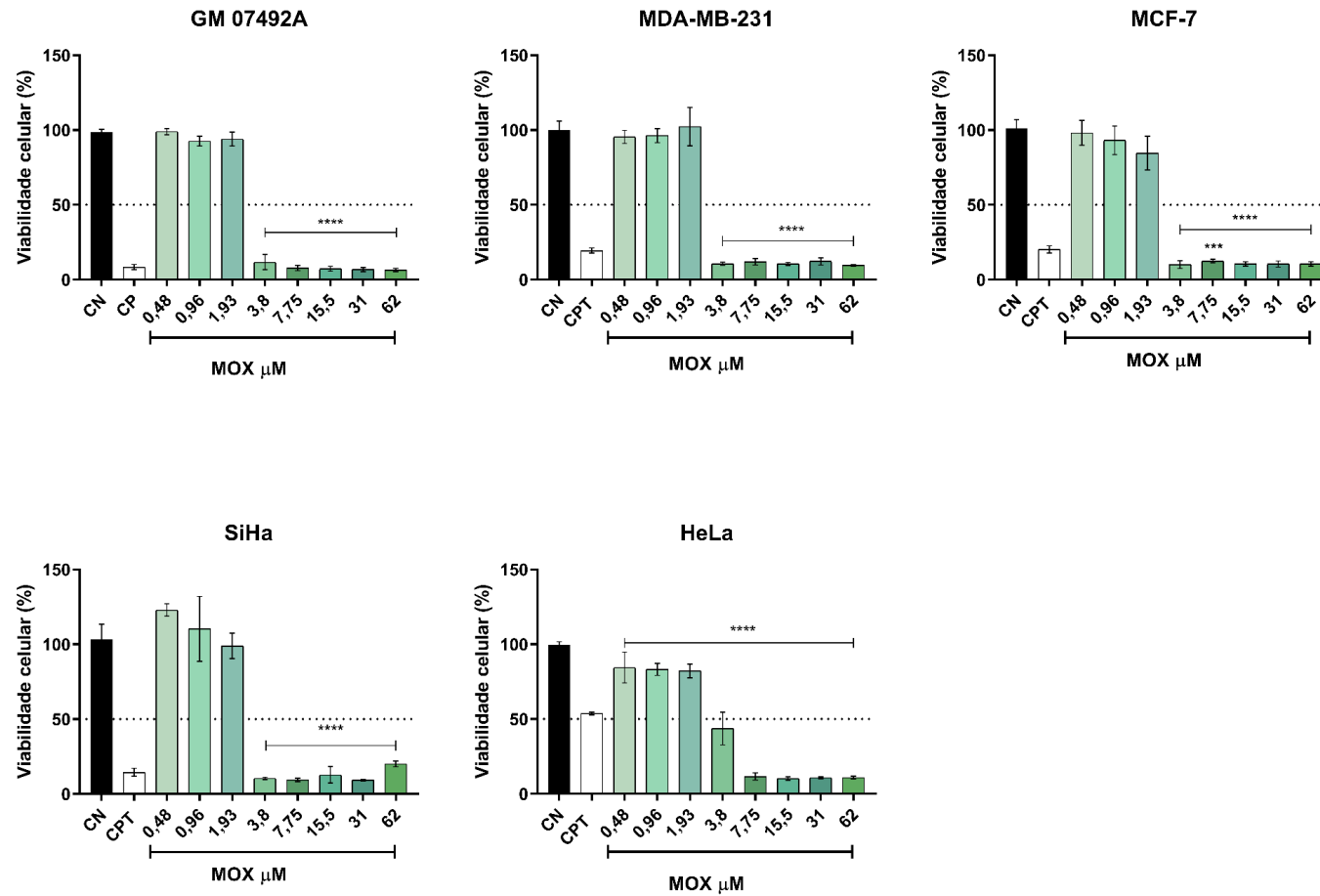


Figura 9- MOX reduz a viabilidade das linhagens celulares testadas após 48 h. Os dados representam a média em porcentagem de viabilidade (%) $\pm$ o desvio padrão (SD). CN- controle negativo (DMEM+ 1% SFB); CPT- cisplatina a 5 mM; CP- controle positivo (DMEM+ 20% DMSO). Índice de viabilidade da linhagem normal (GM07492A - fibroblasto pulmonar não tumorigênico) e tumorais (MCF-7 - adenocarcinoma de mama, MDA-MB-231 - adenocarcinoma mamário, HeLa - carcinoma de colo uterino e SiHa - câncer de colo uterino), após 48 horas de tratamento. Para a análise da diferença foi utilizado o one-way

ANOVA seguido do pós-teste de Tukey- Kramer sendo considerado um valor significativo de * $p \leq 0,05$. ** $p \leq 0,01$ e **** $p \leq 0,001$. A linha tracejada representa 50% da viabilidade celular. Os dados são provenientes de 3 experimentos independentes, com 3 repetições experimentais. Houve diferença estatística entre os grupos NC e CPT; no entanto, essa diferença não foi representada de forma gráfica.

Em todas as linhagens utilizadas no estudo a MOX foi capaz de reduzir a viabilidade celular a partir da concentração de 3,8 μM (Figuras 8 e 9). Dentre os tipos celulares testados, MDA-MB-231 e SiHa demonstraram maior sensibilidade ao tratamento, sendo a viabilidade igual a $7\% \pm 0,928\%$ e $11,7\% \pm 1,544\%$ em 24 h; e $10,7\% \pm 1,00\%$ e $10,5\% \pm 0,8\%$ em 48 h, respectivamente, na concentração de 3,8 μM .

Os dados indicam uma concentração efetiva de 7,75 μM em todas as linhagens. A partir dessa concentração, a viabilidade celular foi inferior a 15%. Além disso, observou-se que, mesmo com o aumento da dose, o efeito máximo foi mantido, com pequenas variações.

Após a realização do teste de viabilidade, a IC_{50} de cada tempo de tratamento foi calculada e pode ser conferida na Tabela 1. A linhagem HeLa apresentou os maiores valores de concentração inibitória, demonstrando ser mais resistente ao tratamento com MOX. As demais concentrações (IC_{50}) obtidas tiveram valores bem semelhantes e refletem os resultados obtidos no ensaio de redução do MTT, com valores próximos à concentração de eficácia máxima.

Houve redução extremamente significativa ($p < 0,0001$) do valor de IC_{50} de todas as linhagens ao longo do tempo de tratamento, o que indica um efeito tempo-dependente do tratamento com a MOX.

Tabela 1- Concentração inibitória média (IC_{50}) da MOX nas linhagens GM 07492A, MDA-MB-231, MCF-7, HeLa e SiHa nos tempos de tratamento de 24 e 48 horas.

	IC_{50} (μM)	
	24 h	48 h
GM 07492A	3,661	2,565
MDA-MB-231	1,723	1,055
MCF-7	3,446	2,554
HeLa	4,030	2,928
SiHa	2,626	2,101

Nota: Os valores estão expressos em μM . Os dados são provenientes de 3 experimentos independentes, com 3 repetições experimentais.

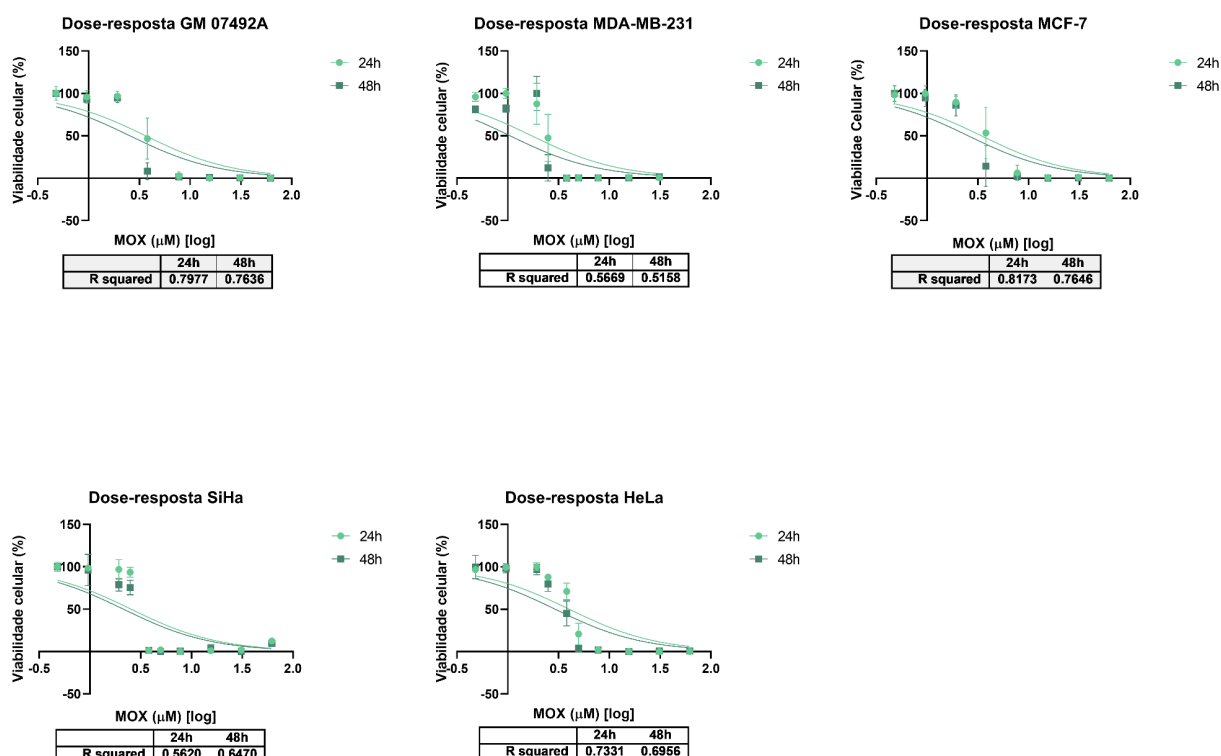


Figura 10- Curvas dose-resposta das linhagens celulares tratadas com MOX. Os dados representam a média em porcentagem de viabilidade (%) $\pm$ o desvio padrão (SD). Para a confecção das curvas foi utilizada a regressão não linear do log (inibidor) vs a resposta normalizada. A linha tracejada representa a média referente a 50% da viabilidade celular. Os dados são provenientes de 3 experimentos independentes, com 3 repetições experimentais. Abaixo de cada gráfico encontram-se os valores de R^2 de cada linhagem referentes aos tempos de tratamento.

As curvas dose-resposta evidenciam o momento em que a MOX atinge sua eficácia máxima e tende a formar um platô nas concentrações mais altas (Figura 10). Além de sua eficácia, as curvas demonstram que o efeito da MOX foi mais potente na linhagem MDA-MB-231, que conseqüentemente também apresentou o menor valor de IC_{50} .

5.2 MOX apresenta efeito seletivo

A partir dos valores de IC_{50} foi calculado o índice de seletividade com o objetivo de verificar se a MOX apresenta maior efeito nas linhagens tumorais que na linhagem normal (Tabela 2).

Tabela 2- Índice de seletividade das linhagens tumorais tratadas com MOX.

Índice de Seletividade (IS)		
	24 h	48 h
MDA-MB-231	2,12	2,43
MCF-7	1,06	1,00
HeLa	0,90	0,87
SiHa	1,39	1,22

Nota: Os dados foram obtidos através da razão entre a IC_{50} da linhagem normal sobre a IC_{50} das linhagens tumorais. As linhagens são consideradas seletivas caso o valor de SI seja maior ou igual a 1.

A MOX apresentou seletividade nas duas linhagens de câncer de mama testadas, sendo a linhagem triplo negativa (MDA-MB-231) a que apresentou maior seletividade em relação à célula normal (24h IS= 2,12; 48h IS= 2,43). A segunda linhagem mais sensível foi a SiHa com IS igual à 1,39 em 24 h e 1,22 em 48 h. Dentre as linhagens submetidas ao tratamento com a MOX apenas HeLa não demonstrou efeito seletivo em nenhum dos tempos (IS<1).

5.3 MOX reduz a capacidade proliferativa das células tumorais

Após a identificação dos valores de IC_{50} e verificação do IS, as linhagens foram submetidas ao ensaio de formação de colônias com a finalidade de verificar a influência da MOX na capacidade de proliferação das células após o tratamento por 48 h (Figura 11).

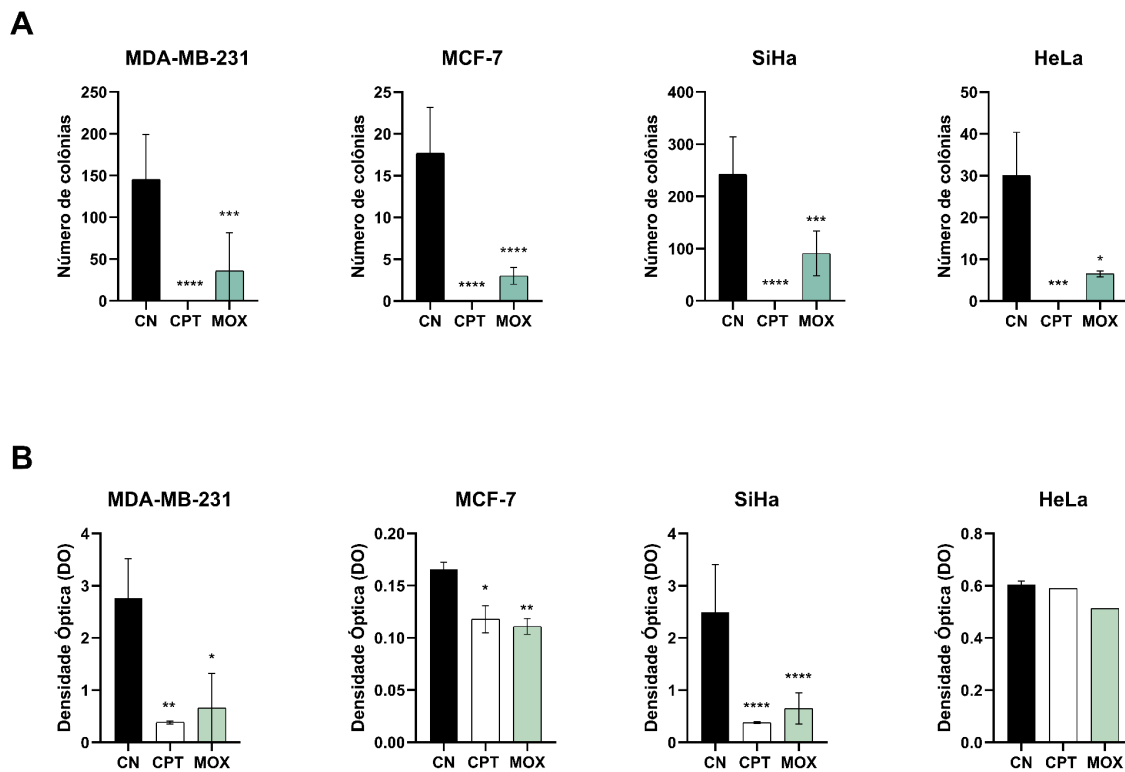


Figura 11- MOX reduz a capacidade das linhagens tumorais de formar colônias. As células foram tratadas com as IC₅₀ específicas de cada linhagem por 48 horas (MOX). Após esse período, as culturas foram acompanhadas por 10 dias. (A) Contagem do Número de Colônias após 48 horas de Tratamento com MOX: Foram contabilizadas todas as colônias, exceto aquelas presentes nas bordas. Os dados foram expressos como média de colônias $\pm$ desvio padrão (SD). (B) Densidade Óptica (DO) Média do Experimento de Formação de Colônias. Os dados foram expressos como DO $\pm$ desvio padrão (SD). CN- controle negativo (DMEM+ 1% SFB); CPT- cisplatina a 5 mM. Para analisar as diferenças, empregou-se o teste one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey-Kramer, considerando significativo quando $*p \leq 0,05$. Os símbolos $**p \leq 0,01$ e $****p \leq 0,001$ indicam níveis crescentes de significância. O asterisco foi utilizado para comparações com o grupo CN.

Após 48 h de tratamento com as concentrações inibitórias médias das linhagens tumorais, a MOX diminuiu significativamente o número de colônias das linhagens testadas, assim como a densidade óptica dos poços (com exceção da linhagem HeLa).

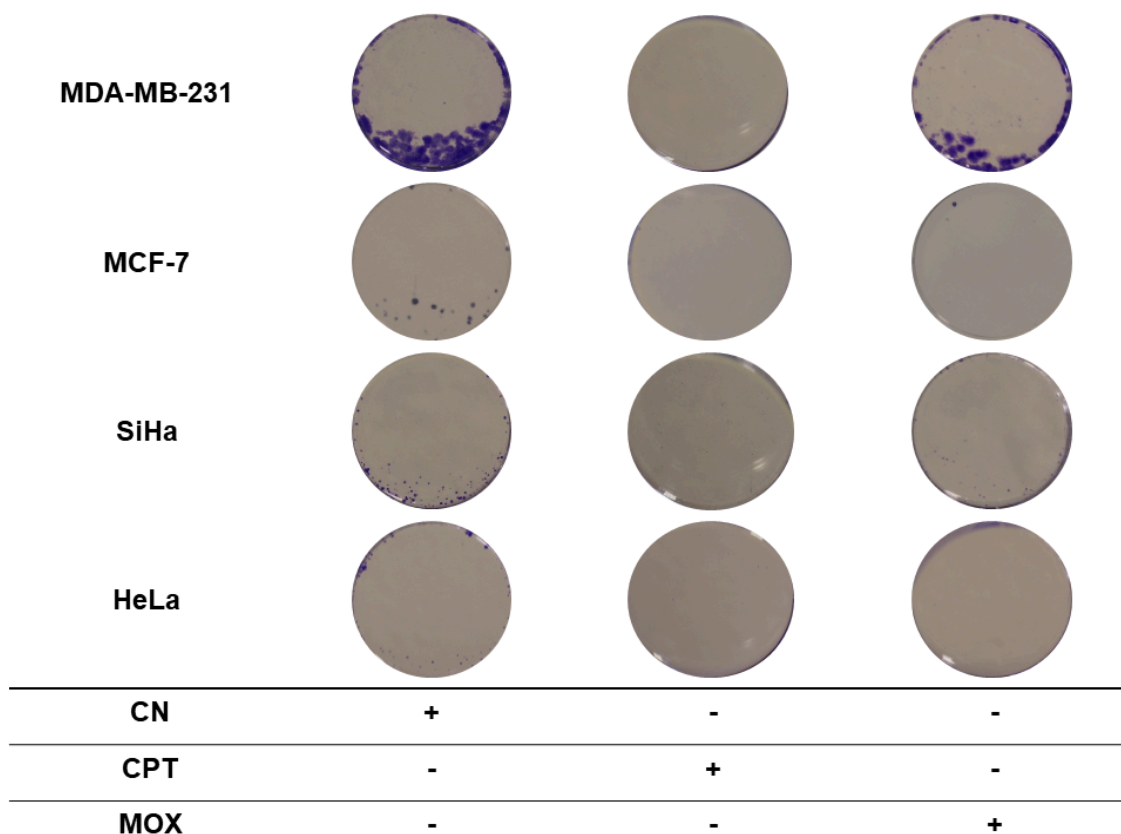


Figura 12- MOX reduz o número de colônias após o tratamento em 48 horas. Foram contabilizadas todas as colônias, com exceção das presentes nas bordas. CN- controle negativo (DMEM+ 1% SFB); CPT- cisplatina a 5 mM; MOX- IC₅₀ específicas de cada linhagem.

Nas linhagens celulares de câncer de mama a MOX teve médias de contagem de colônias iguais a $35,8 \pm 45,6$ versus $145,4 \pm 53,7$ no controle negativo (MDA-MB-231) e $3,0 \pm 1,0$ versus $17,6 \pm 5,5$ no controle negativo (MCF-7). Já nas linhagens de câncer de colo uterino as médias de colônias variaram entre $90,6 \pm 42,7$ no tratamento com a MOX, versus $242,2 \pm 72,1$ no controle negativo (SiHa), e $6,5 \pm 0,7$ no tratamento com a MOX versus $30,0 \pm 10,3$ no controle negativo (HeLa) (Figura 11 e 12).

5.4 MOX altera a morfologia e induz as células tumorais à apoptose

Além da diminuição da capacidade de proliferação, as linhagens celulares foram avaliadas quanto à sua morfologia para a observação de alterações. Além de analisar o efeito da MOX isoladamente, investigou-se também sua interação em

combinação com o quimioterápico Cisplatina para observar um possível efeito aditivo. Isso foi realizado utilizando as respectivas IC_{50} de cada linhagem juntamente com a dose efetiva da CPT (5 μ M).

Foi possível verificar alterações morfológicas nas células tratadas, como redução do volume celular, perda de adesão com a placa, núcleos compactados ou não identificáveis, bem como citoplasmas reduzidos (Figura 13). Foram observados diversos debris dispersos nos poços, sugerindo que sejam corpos apoptóticos indicativos de apoptose tardia.

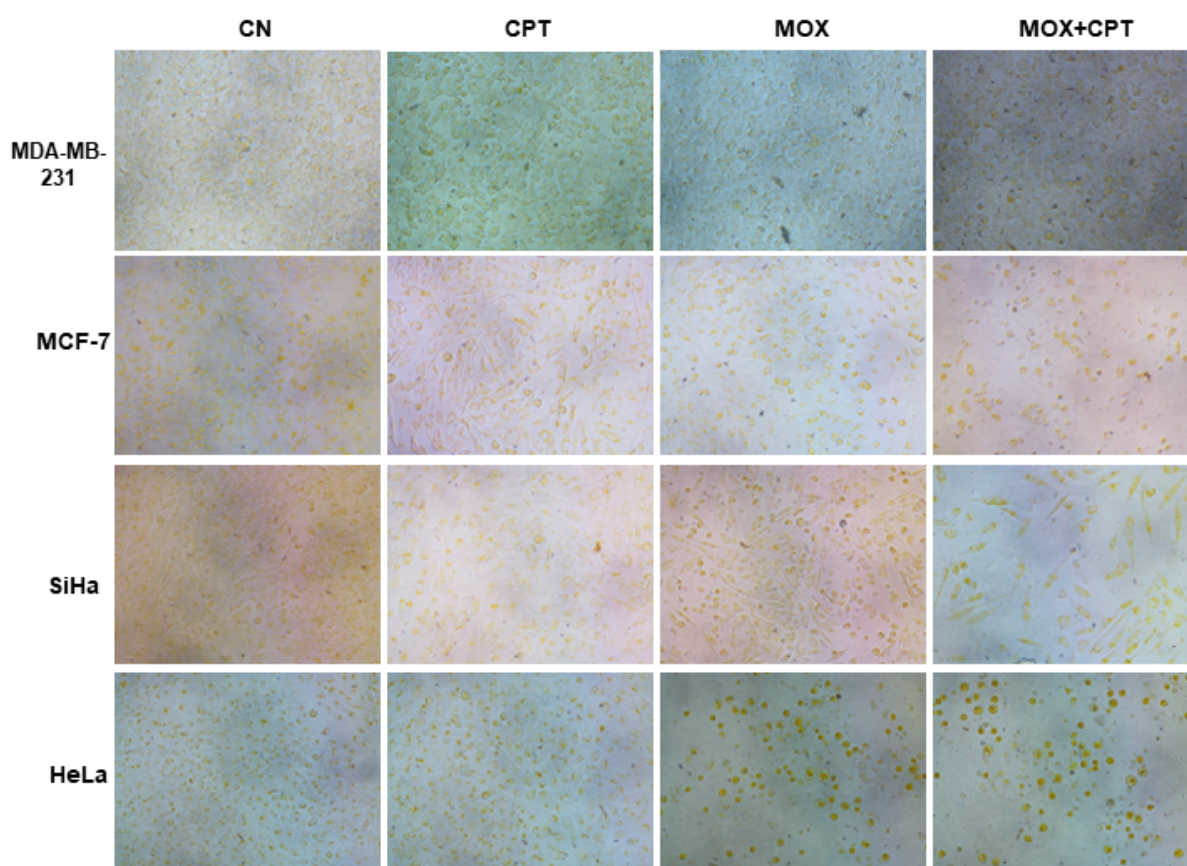


Figura 13 - MOX altera a morfologia das células tratadas. As células foram observadas sob aumento de 20x após a marcação com laranja de acridina e brometo de etídio. As células tratadas com MOX e MOX+CPT demonstraram redução do número de células, morfologia arredondada, diminuição do volume, perda de adesão com a placa e núcleos condensados. CN- controle negativo (DMEM+ 1% SFB); CPT- cisplatina a 5 mM; MOX- IC_{50} ; MOX+CPT- MOX- IC_{50} associada à cisplatina a 5 mM.

Com o objetivo de avaliar como a MOX era capaz de reduzir a viabilidade celular e se teria relação com as alterações morfológicas observadas nos testes anteriores, foi realizado um ensaio para avaliar o tipo de morte celular envolvido (Figuras 14 e 15).

As células tratadas com MOX e MOX+CPT apresentaram, em sua maioria, alterações nucleares como condensação e fragmentação da cromatina, coradas em verde ou vermelho, sendo então categorizadas como apoptóticas, confirmando os achados observados na morfologia (Figuras 16, 17, 18 e 19).

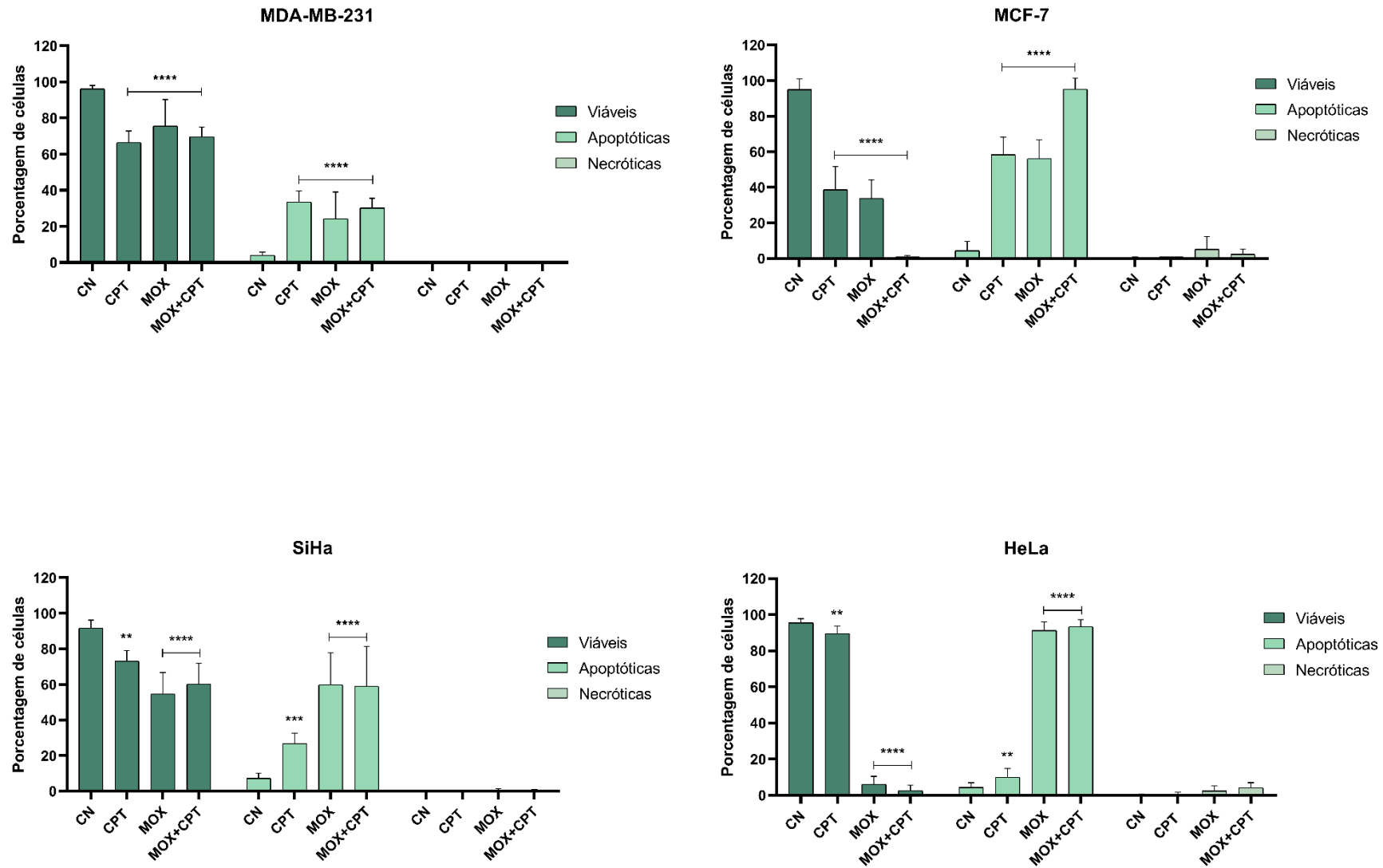


Figura 14- MOX induz as linhagens tumorais à apoptose. As células foram cultivadas em placas de 24 poços e tratadas com MOX e MOX+CPT por 48h. Posteriormente, as células foram coradas com laranja de acridina (50 µg/ml) e brometo de etídio (50 µg/ml). As imagens foram

capturadas com aumento de 20x, utilizando os cubos de fluorescência EGF e CY3 em um microscópio de fluorescência invertido (Eclipse Ti, Nikon). As células foram classificadas em três categorias: 1- Viáveis, quando apresentavam núcleo de coloração verde, não condensado e sem alterações visíveis; 2- Apoptóticas, quando apresentavam núcleo verde ou vermelho condensado, fragmentado ou com alguma outra alteração visível; 3- Necróticas, quando apresentavam núcleo vermelho, não condensado e sem alterações visíveis. Os gráficos representam as porcentagens das populações encontradas $\pm$ SD, produzidos pela contagem de 100 células por poço. Para a análise das diferenças, utilizou-se o Two-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey-Kramer, considerando significativo quando $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$ e $***p \leq 0,001$.

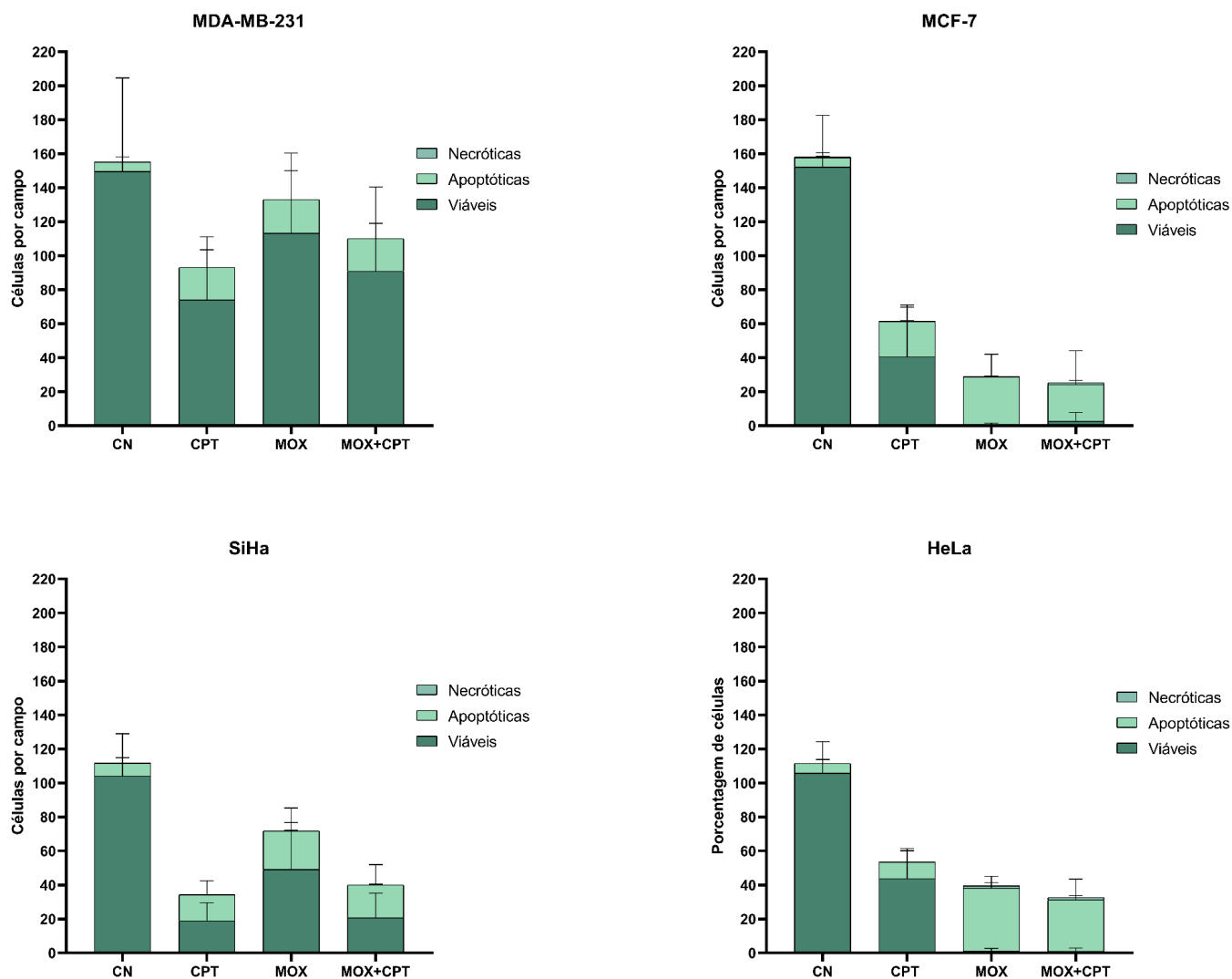


Figura 15 - MOX reduz o quantitativo de células tumorais e as induz à apoptose. As células foram cultivadas em placas de 24 poços e tratadas com MOX e MOX+CPT por 48h. Posteriormente, as células foram coradas com laranja de acridina (50 µg/ml) e brometo de etídio (50

µg/ml). As imagens foram capturadas com aumento de 20x, utilizando os cubos de fluorescência EGF e CY3 em um microscópio de fluorescência invertido (Eclipse Ti, Nikon). As células foram classificadas em três categorias: 1- Viáveis, quando apresentavam núcleo de coloração verde, não condensado e sem alterações visíveis; 2- Apoptóticas, quando apresentavam núcleo verde ou vermelho condensado, fragmentado ou com alguma outra alteração visível; 3- Necróticas, quando apresentavam núcleo vermelho, não condensado e sem alterações visíveis. Os gráficos representam a média de células por campo $\pm$ SD, produzidos pela contagem do quadrante mais representativo.

As linhagens tratadas apresentaram aumento significativo ($p < 0,0001$) do número de células em apoptose nos tratamentos MOX e MOX+CPT em relação ao CN, representando respectivamente $24,33\% \pm 14,7\%$ e $30,16\% \pm 5,4\%$ em MDA-MB-231, $56,16\% \pm 10,5\%$ e $95,16\% \pm 6,1\%$ da contagem total em MCF-7, $59,71\% \pm 18\%$ e $59\% \pm 22,3\%$ em SiHa e $91,25\% \pm 4,7\%$ e $93,44\% \pm 3,8\%$ em HeLa (Figura 14).

A percentagem de células necróticas não foi expressiva em nenhum dos tratamentos, não ultrapassando os 6% da contagem. O maior número de células em necrose foi encontrado na linhagem MCF-7, onde os poços tratados apenas com MOX apresentaram $5,16\% \pm 7,1\%$ do total, porém não houve significância em relação ao controle negativo.

Na linhagem MDA-MB-231 a CPT isolada apresentou viabilidade de $66,5\% \pm 6,3\%$ enquanto no tratamento MOX $75,5\% \pm 14,7\%$ das células estavam vivas, já as células de MCF-7 apresentaram viabilidade de $38,66\% \pm 12,9\%$ no tratamento com o quimioterápico e com a MOX $33,83\% \pm 10,3\%$. Em relação às linhagens de colo uterino, na HeLa a CPT apresentou $89,55\% \pm 4,1\%$ e a MOX $6,12\% \pm 2,9\%$, e na SiHa $72\% \pm 7\%$ e $22,6\% \pm 16\%$, respectivamente. A CPT demonstrou toxicidade menor que a MOX nas linhagens de câncer cervical, indicando maior resistência ao tratamento com a droga padrão.

O uso combinado de MOX e CPT em todas as linhagens apresentou o menor número de células viáveis após o tratamento, sendo $69,6\% \pm 5,3\%$ em MDA-MB-231, $0,83\% \pm 0,7\%$ em MCF-7, $21,6\% \pm 14\%$ em SiHa e $2,66\% \pm 2,9\%$ em HeLa, indicando alta citotoxicidade e diferindo da viabilidade observada nos tratamentos com os compostos isolados. A linhagem MCF-7 recebe destaque pelo aparente efeito aditivo da MOX em conjunto à CPT, que quase dobrou o número de células apoptóticas observadas nos tratamentos separados. Tal efeito não foi visualizado nas linhagens tumorais cervicais (HeLa e SiHa) e na linhagem da câncer de mama triplo-negativa (MDA-MB-231), onde o número de células apoptóticas foi semelhante ao observado no tratamento com a MOX isolada.

MDA-MB-231

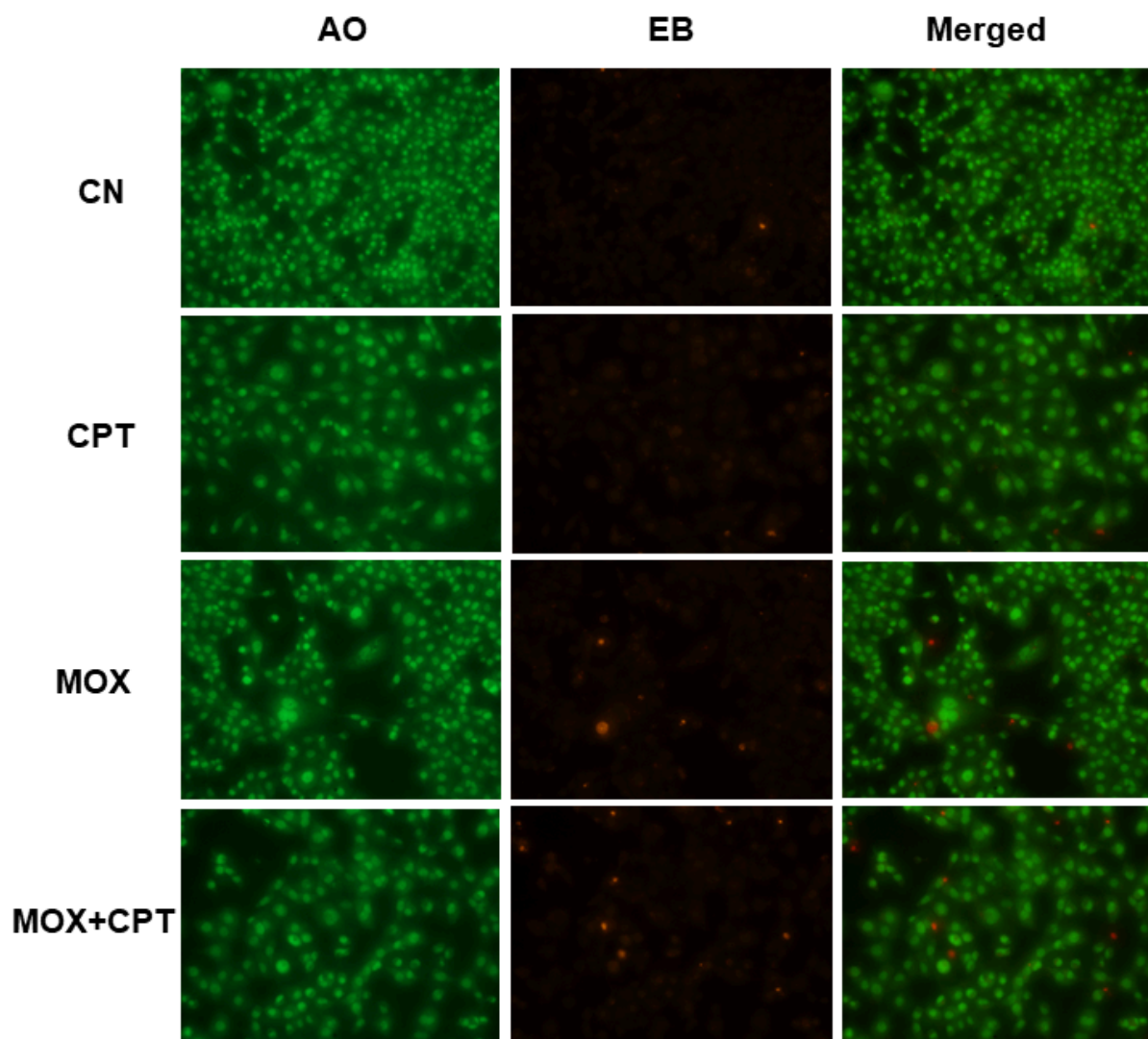


Figura 16 - MOX induz a apoptose e reduz o quantitativo de células da linhagem MDA-MB-231. As células foram cultivadas em placas de 24 poços e tratadas com MOX e MOX+CPT por 48 h. Posteriormente, as células foram coradas com laranja de acridina (AO) (50 µg/ml) e brometo de etídio (EB) (50 µg/ml). As imagens foram capturadas com aumento de 20x, utilizando os cubos de fluorescência EGF e CY3 em um microscópio de fluorescência invertido (Eclipse Ti, Nikon). As células foram classificadas em três categorias: 1- Viáveis, quando apresentavam núcleo de coloração verde, não condensado e sem alterações visíveis; 2- Apoptóticas, quando apresentavam núcleo verde ou vermelho condensado, fragmentado ou com alguma outra alteração visível; 3- Necróticas, quando apresentavam núcleo vermelho, não condensado e sem alterações visíveis. As imagens representam as micrografias tiradas em cada cubo de fluorescência para a visualização das marcações isoladas (AO e EB) e a sobreposição das imagens (Merged) para a visualização de ambas.

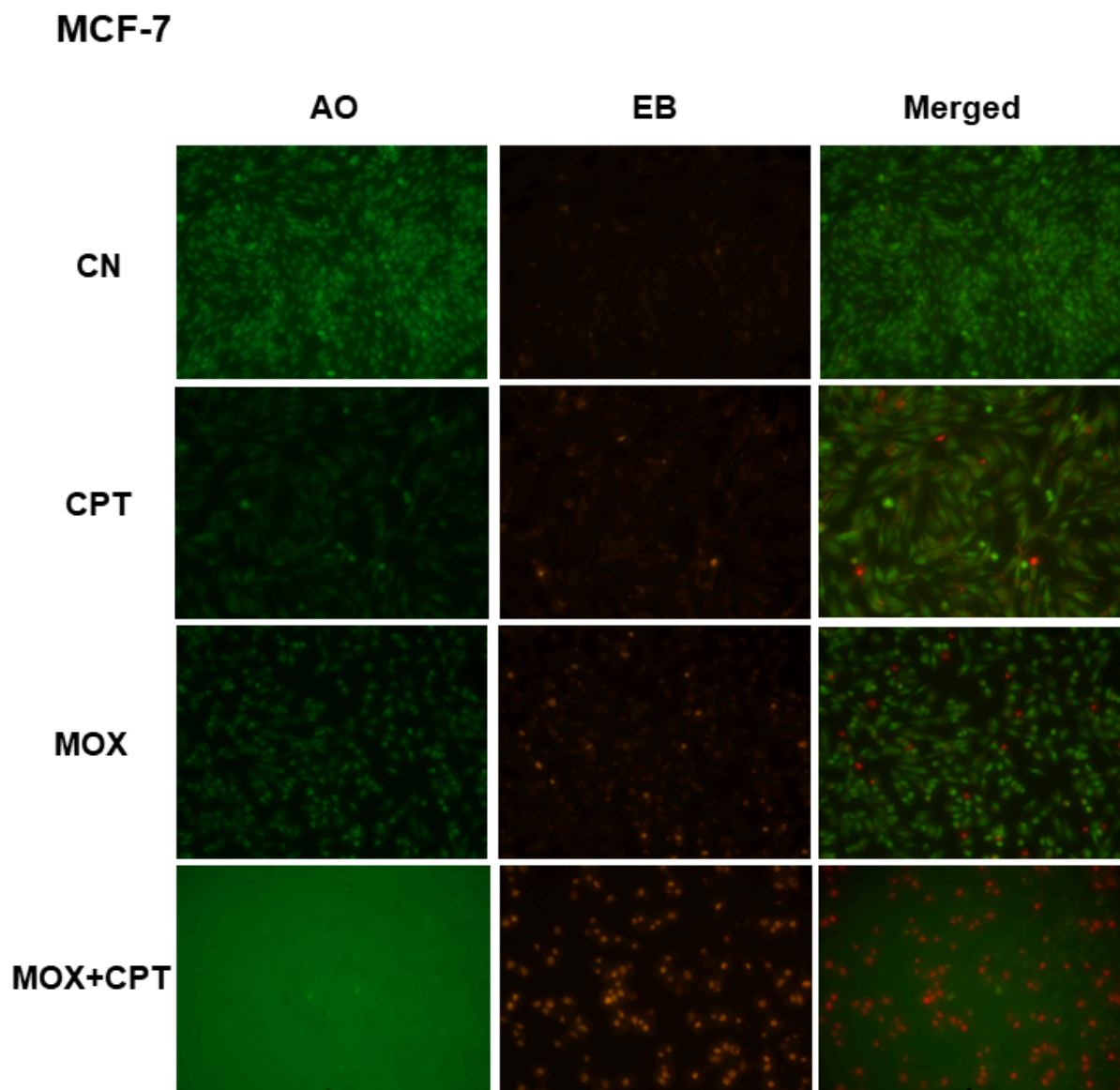


Figura 17 - MOX induz a apoptose e reduz o quantitativo de células da linhagem MCF-7. As células foram cultivadas em placas de 24 poços e tratadas com MOX e MOX+CPT por 48 h. Posteriormente, as células foram coradas com laranja de acridina (AO) (50 µg/ml) e brometo de etídio (EB) (50 µg/ml). As imagens foram capturadas com aumento de 20x, utilizando os cubos de fluorescência EGF e CY3 em um microscópio de fluorescência invertido (Eclipse Ti, Nikon). As células foram classificadas em três categorias: 1- Viáveis, quando apresentavam núcleo de coloração verde, não condensado e sem alterações visíveis; 2- Apoptóticas, quando apresentavam núcleo verde ou vermelho condensado, fragmentado ou com alguma outra alteração visível; 3- Necróticas, quando apresentavam núcleo vermelho, não condensado e sem alterações visíveis. As imagens representam as micrografias tiradas em cada cubo de fluorescência para a visualização das marcações isoladas (AO e EB) e a sobreposição das imagens (Merged) para a visualização de ambas.

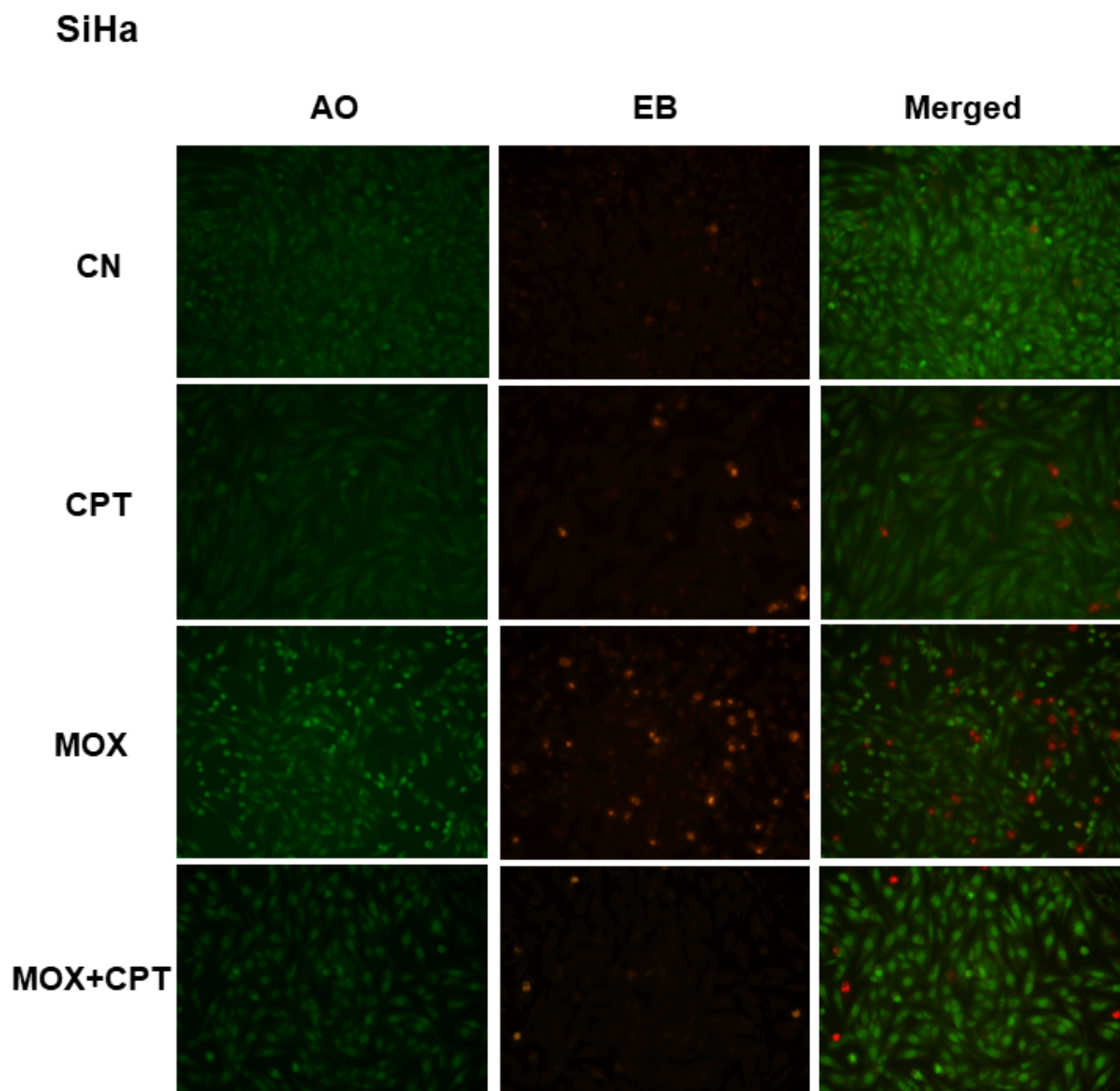


Figura 18 - MOX induz a apoptose e reduz o quantitativo de células da linhagem SiHa. As células foram cultivadas em placas de 24 poços e tratadas com MOX e MOX+CPT por 48 h. Posteriormente, as células foram coradas com laranja de acridina (AO) (50 µg/ml) e brometo de etídio (EB) (50 µg/ml). As imagens foram capturadas com aumento de 20x, utilizando os cubos de fluorescência EGF e CY3 em um microscópio de fluorescência invertido (Eclipse Ti, Nikon). As células foram classificadas em três categorias: 1- Viáveis, quando apresentavam núcleo de coloração verde, não condensado e sem alterações visíveis; 2- Apoptóticas, quando apresentavam núcleo verde ou vermelho condensado, fragmentado ou com alguma outra alteração visível; 3- Necróticas, quando apresentavam núcleo vermelho, não condensado e sem alterações visíveis. As imagens representam as micrografias tiradas em cada cubo de fluorescência para a visualização das marcações isoladas (AO e EB) e a sobreposição das imagens (Merged) para a visualização de ambas.

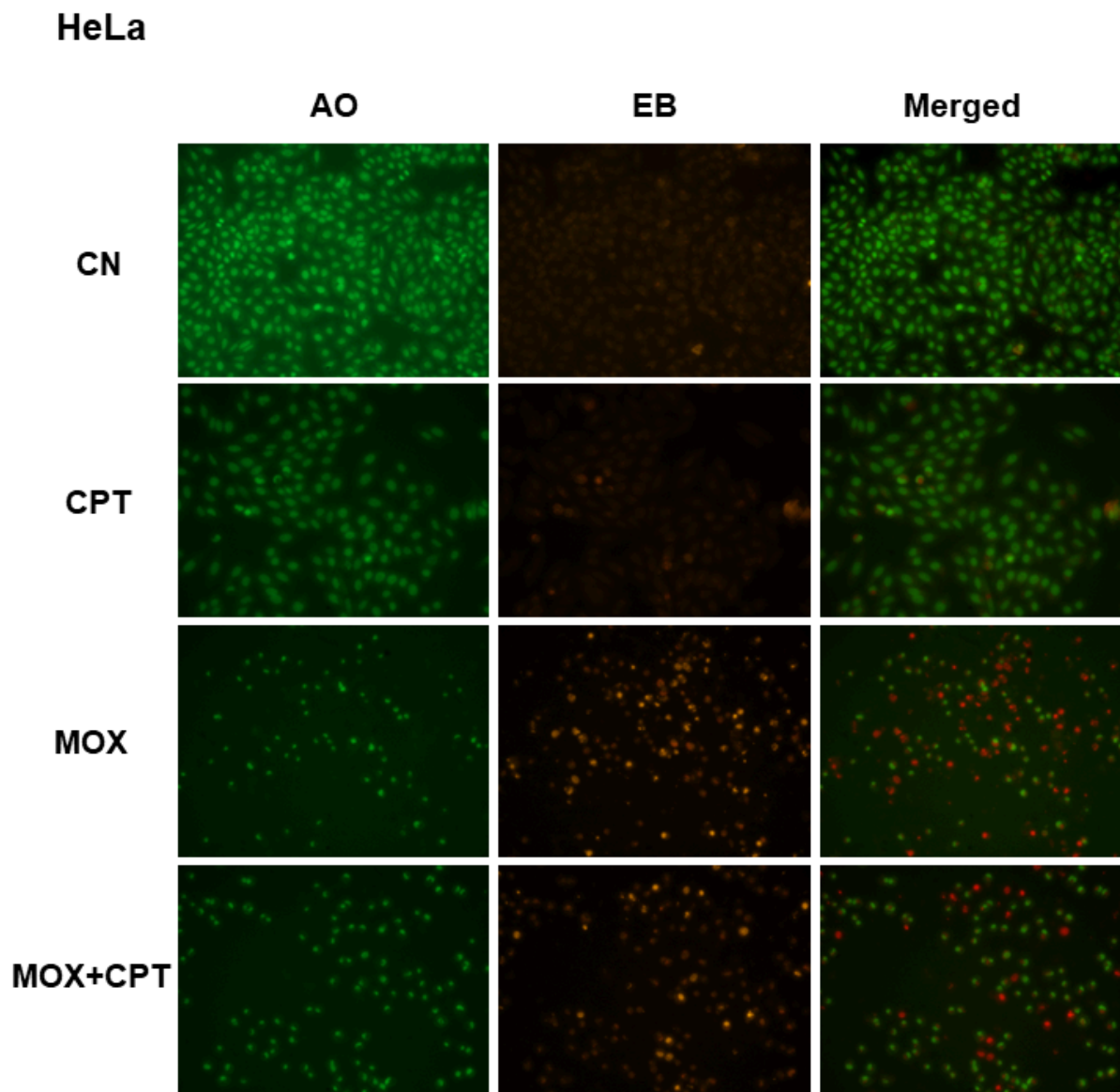


Figura 19 - MOX induz a apoptose e reduz o quantitativo de células da linhagem HeLa. As células foram cultivadas em placas de 24 poços e tratadas com MOX e MOX+CPT por 48 h. Posteriormente, as células foram coradas com laranja de acridina (AO) (50 µg/ml) e brometo de etídio (EB) (50 µg/ml). As imagens foram capturadas com aumento de 20x, utilizando os cubos de fluorescência EGF e CY3 em um microscópio de fluorescência invertido (Eclipse Ti, Nikon). As células foram classificadas em três categorias: 1- Viáveis, quando apresentavam núcleo de coloração verde, não condensado e sem alterações visíveis; 2- Apoptóticas, quando apresentavam núcleo verde ou vermelho condensado, fragmentado ou com alguma outra alteração visível; 3- Necróticas, quando apresentavam núcleo vermelho, não condensado e sem alterações visíveis. As imagens representam as micrografias tiradas em cada cubo de fluorescência para a visualização das marcações isoladas (AO e EB) e a sobreposição das imagens (Merged) para a visualização de ambas.

A avaliação quantitativa demonstrou redução da quantidade de células observadas em cada tratamento, sendo o menor número encontrado no tratamento MOX+CPT em ambas as linhagens de colo uterino e na MCF-7 (linhagem de câncer de mama) (média de 16,57 células/campo em MCF-7; 32,6 em HeLa e 38 em SiHa)

(Figuras 15, 16, 17, 18 e 19). As poucas células contabilizadas foram categorizadas como apoptóticas, indicando alto efeito citotóxico do tratamento.

A linhagem MDA-MB-231 apresentou o menor número de células/campo no tratamento com a CPT isolada (cerca de 73,9 células/campo), porém, apesar de apresentar menos células, a média de células apoptóticas foi semelhante entre os tratamentos MOX, CPT e MOX+CPT (MOX- 19,9, CPT- 19,1; MOX+CPT- 19,2).

O número de células contadas nos campos mais representativos variou entre as linhagens, sendo observado um número maior de células/campo na linhagem MCF-7 (média de 152,1 células em CN) seguida da linhagem MDA-MB-231 (149,5 células em CN). Nas linhagens cervicais a média máxima de células/campo foi igual a 105,8 na HeLa e 104 na SiHa.

5.5 MOX possui efeito linhagem dependente no ciclo celular

Para determinar o possível mecanismo de indução da apoptose da MOX foi realizado o ensaio de avaliação do ciclo celular. Os resultados podem ser observados na Figura 20.

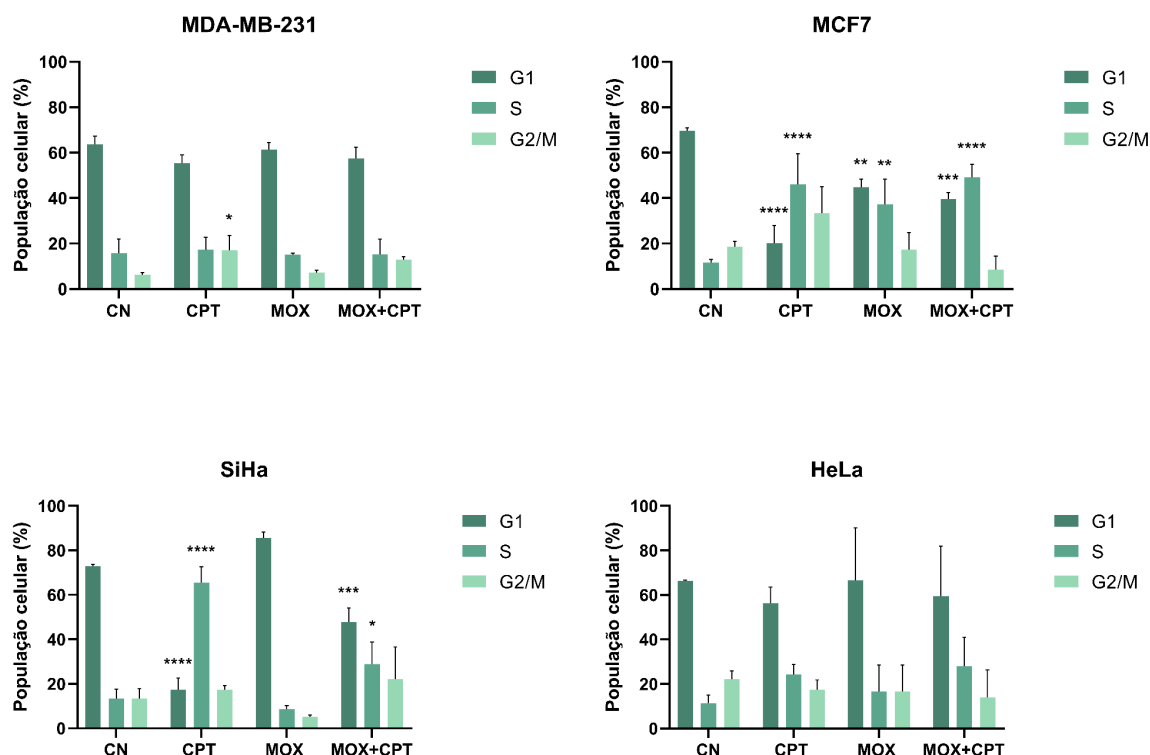


Figura 20- A MOX exerce diversos efeitos sobre o ciclo celular de células tumorais. Após tratamento com MOX e MOX+CPT por 48h, as células foram marcadas com uma solução contendo Triton a 0,1%, RNase a 20 mg/ml e IP a 50 µg/ml. As amostras foram adquiridas em um citômetro de fluxo Guava easyCyte™ HT System, para identificação das fases G1, S e G2/M. Para a análise da diferença foi utilizado o Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey- Kramer sendo considerado um valor significativo de * $p \leq 0,05$. ** $p \leq 0,01$ e **** $p \leq 0,001$.

A MOX isolada não apresentou alterações significativas no ciclo celular das linhagens MDA-MB-231, SiHa e HeLa com distribuição de células nas fases G1, S e G2/M semelhantes às observadas nos controles de ambas as linhagens. A cisplatina, por sua vez, aumentou o número de células na fase S ($65,4\% \pm 7,1\%$ das células totais), ao passo que diminuiu o número de células na fase G1 ($17,4\% \pm 5,13\%$) em SiHa. Em MDA-MB-231, a CPT aumentou o número de células na fase G2/M ($16,9\% \pm 6,6\%$ do total de células). Apesar de não demonstrar significância, a CPT aumentou a porcentagem de células de HeLa na Fase S ($11,4\% \pm 3,4\%$ em CN, $24,3\% \pm 4,4\%$ em CPT).

Em HeLa o uso combinado de MOX+CPT apresentou $28\% \pm 13\%$ de células aprisionadas na fase S, contrastando com o observado no controle negativo ($11,4\% \pm 3,4\%$). Em SiHa cerca de $28,9\% \pm 9,9\%$ das células estavam na fase S, enquanto

13,4% $\pm$ 4% estavam nessa mesma fase no CN. Já em MDA-MB-231 não houveram diferenças significativas entre a porcentagem de células observadas na segunda fase no ciclo celular no CN (15,7% $\pm$ 6,1%) e no tratamento conjunto (15,2% $\pm$ 6,6%).

Em MCF-7 foi possível observar o aprisionamento das células na fase S nos tratamentos isolados (MOX: 37,2% $\pm$ 11%; CPT: 46% $\pm$ 13,5%), assim como no combinado (MOX+CPT: 49,2% $\pm$ 5,5%). A MOX e a CPT apresentaram efeito aditivo com o aumento da quantidade de células na fase S e consequente diminuição de células na fase G1, demonstrando sinergismo e aumentando o efeito de ambos os tratamentos.

6. DISCUSSÃO

É a primeira vez que um estudo avalia o potencial da MOX em linhagens de câncer de mama e câncer de colo uterino, bem como o seu potencial coadjuvante. A MOX é um exemplo bem sucedido de reposicionamento, sendo utilizada inicialmente apenas para o tratamento de doenças parasitárias veterinárias e posteriormente, em 2018, reposicionada para o tratamento de oncocercose em humanos (Begley *et al.*, 2021). Alguns outros estudos avaliaram o potencial da MOX no tratamento da tuberculose (Ramon-Garcia *et al.*, 2014), do alcoolismo (Huynh *et al.*, 2017), da infecção pelo COVID-19 (Marak *et al.*, 2020), de infecções por espécies de micobactérias não tuberculosas (Muñoz-Muñoz *et al.*, 2021), entre outros. Porém, poucos são os trabalhos que investigam o reposicionamento da MOX para a terapia antitumoral.

Em nosso estudo a MOX foi avaliada quanto a seu potencial antineoplásico em dois dos tipos de cânceres com maior incidência na população feminina. Foram utilizadas linhagens mais e menos agressivas com o intuito de verificar se a droga era capaz de apresentar efeito mesmo em fenótipos de pior prognóstico. Também foram utilizadas linhagens infectadas pelo vírus do HPV, que confere ao tumor maior resistência aos mecanismos de morte e perda dos mecanismos de reparo do DNA (Oyouni, 2023), para verificar se a infecção viral seria capaz de afetar a efetividade da MOX.

No presente trabalho a MOX apresentou redução seletiva da viabilidade das culturas de câncer de colo uterino e de mama, com exceção da HeLa. Além disso, foi capaz de reduzir significativamente a capacidade clonogênica das células após o tratamento, bem como induziu a apoptose em todas as linhagens. Em outros estudos a MOX também apresentou efeito seletivo, porém em linhagens tumorais de glioma (C6, U251), induzindo às células a um expressivo decaimento da viabilidade em relação à uma linhagem de astrócito normal (SVG) (SONG *et al.*, 2018). Mao *et al.* (2022) também demonstraram o efeito citotóxico seletivo da MOX em linhagens de câncer colorretal (HCT15 e SW620) após 36h de tratamento na concentração de 12 μ M. Tais achados corroboram com os resultados observados no presente estudo e indicam o potencial seletivo da MOX em diferentes tipos de neoplasias *in vitro*.

Outras LMs testadas *in vitro* em linhagens tumorais, apresentaram resultados semelhantes ao da MOX, porém com variações da IC₅₀, em linhagem

MCF-7 resistente à adriamicina (Gao *et al.*; 2011), MCF-7 e MDA-MB-231 (Güler; Akyildiz, 2023) e HeLa (Zhang *et al.*, 2018). Os achados confirmam a citotoxicidade deste grupo de drogas em linhagens tumorais de câncer de colo uterino e de mama. Ademais, corroboram com os resultados exibidos pela MOX em nossos experimentos, que demonstram citotoxicidade em concentrações baixas, até mesmo inferiores às utilizadas nos estudos citados anteriormente, resultando em valores de IC_{50} menores. Não foram encontrados estudos que avaliassem o potencial das LMs na linhagem SiHa, o que demonstra o pioneirismo do presente trabalho.

A linhagem de câncer de colo uterino HeLa, em especial, demonstrou menor sensibilidade à MOX no experimento de citotoxicidade, em ambos os tempos de tratamento. Com base nas características dessa linhagem, a HeLa pode ter apresentado maior resistência ao tratamento com a MOX devido às suas características biológicas intrínsecas, assim como também apresenta resistência ao tratamento com a cisplatina (Minagawa *et al.*, 1999). Entretanto, apesar da IC_{50} ter sido a maior dentre as linhagens tratadas, houve redução da viabilidade e do número de colônias formadas, bem como a indução de alterações morfológicas e da apoptose, o que demonstra atividade interessante da MOX contra uma linhagem altamente agressiva de câncer de colo uterino.

Em contrapartida, as células de MDA-MB-231 demonstraram alta sensibilidade ao tratamento, apresentando a menor IC_{50} dentre as linhagens utilizadas. Por ser uma linhagem mais agressiva, proliferativa, invasiva e menos diferenciada, os bons resultados obtidos com a MOX podem delinear novas perspectivas de testes *in vivo* e futuramente representar uma alternativa interessante na terapêutica do câncer de mama triplo negativo, que é o subtipo mais agressivo da doença.

Além da citotoxicidade seletiva da MOX nas linhagens de câncer de colo uterino e de mama testadas, o fármaco também inibiu significativamente a formação de colônias. Isso sugere uma redução na capacidade de proliferação das células tumorais após o tratamento. No contexto da terapia dos tumores a capacidade de reduzir o potencial de expansão clonal de células neoplásicas impacta diretamente o processo da tumorigênese. Isso ocorre devido à capacidade das células com alto potencial proliferativo de se deslocarem do tumor primário e migrarem para novos tecidos, onde podem formar um novo tumor (Rajendran; Jain, 2017; Doglioni *et al.*, 2019). Além da possibilidade de colonizar novos sítios, as células tumorais

resistentes à determinado tratamento podem proliferar novamente e reocupar o sítio tumoral, causando recidiva, com um tumor de perfil mais agressivo (Flemming, 2015). Em comparação a outras LMs como a IVM, a MOX também foi capaz de inibir a viabilidade e a capacidade clonogênica de linhagens celulares de câncer de mama (Juarez *et al.*, 2020).

A MOX também induziu alterações morfológicas e a morte celular através da apoptose em todas as linhagens celulares testadas, causando repercussões visuais compatíveis com a fase tardia desse processo (Elmore *et al.*, 2007; Obeng, 2021). Essas alterações dão indícios sobre o tipo de morte desencadeado pela MOX e também justificam os dados de viabilidade e formação de colônias.

Dentre as alterações morfológicas provocadas pela apoptose destacam-se o encolhimento celular, formação de núcleos picnóticos, condensação da cromatina, formação de bolhas ou '*blebs*' na membrana plasmática, cariorrexe e separação de fragmentos celulares em corpos apoptóticos (Elmore *et al.*, 2007; Obeng, 2021). As micrografias das células apontaram que a MOX, tanto isolada quanto em associação com a cisplatina, pôde induzir algumas das alterações morfológicas condizentes com as descritas anteriormente.

Os resultados observados na marcação com laranja de acridina e brometo de etídio evidenciam a indução da morte celular programada. Notavelmente, na linhagem MCF-7, foi observado um efeito sinérgico entre a MOX e a CPT na indução das células tumorais à apoptose. Tal resultado pode corroborar para a sugestão da MOX não só como uma droga de substituição aos quimioterápicos convencionais mas como uma nova opção farmacológica em coquetéis quimioterápicos.

No contexto da racionalização do uso de quimioterapias, é possível pensar na diminuição da concentração utilizada do quimioterápico a partir da adição da MOX, que é um medicamento seguro e seletivo e que pode apresentar uma via alternativa de indução da morte celular (Song *et al.*, 2018; Milton *et al.*, 2020). Como consequência, esperaria-se o aumento da eficácia do tratamento.

Sugere-se ainda que a MOX pode induzir a apoptose por uma via diferente da estimulada pela cisplatina, que é realizada a partir do dano ao DNA e consequente indução da apoptose pela via mitocondrial (Dasari; Tchounwou, 2014; Suberu *et al.*, 2014; Carneiro; El-Deiry, 2020). A MOX, por sua vez, de acordo com Song *et al.* (2018), foi capaz de induzir a apoptose em células de glioma a partir da

diminuição da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 e aumento concomitante da expressão da proteína pró-apoptótica Bax *in vitro*, o que indica o que pode ter ocorrido nas linhagens testadas.

No entanto, embora a MOX induza apoptose nas linhagens celulares testadas, parece fazê-lo por meio de um mecanismo independente do ciclo celular. Com exceção da MCF-7, a MOX não provocou alterações significativas no número de células distribuídas nas diferentes fases do ciclo. Esses resultados sugerem que o efeito da MOX não está diretamente relacionado ao ciclo celular, indicando a possibilidade de que esteja afetando outras vias celulares, como a expressão de proteínas apoptóticas, conforme observado por Song *et al.* (2018) e já discutido anteriormente.

Observando os resultados obtidos e dando enfoque para a MCF-7, a MOX é capaz de induzir o aprisionamento das células na fase S, impedindo que a célula progrida para a próxima fase, o que pode induzir essa linhagem à apoptose. Trabalhos anteriores indicam o estudo de novas abordagens terapêuticas para o tratamento dessa linhagem a partir de alvos no metabolismo da ceramida junto de inibidores seletivos de Bcl-2 ou PI3K/Akt/fator nuclear kappa B (Simstein *et al.*, 2003). A MOX já demonstrou potencial de diminuição da expressão de Bcl-2 (SONG *et al.*, 2018), bem como inibição da via PI3K-Akt-mTOR (Liu *et al.*, 2020; Mao *et al.*, 2022), o que pode ter favorecido a indução da apoptose bem como o aprisionamento no ciclo celular.

A indução da apoptose e o aprisionamento das células na fase S do ciclo são resultados que corroboram com os efeitos observados anteriormente em trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa (não publicados). No estudo de Song *et al.* (2018) a MOX também foi responsável pelo aprisionamento de células de glioma durante o ciclo celular, no entanto, as células tumorais sofreram a interrupção em uma fase diferente, sendo esta a fase G0/G1. A estagnação se deu através da diminuição da expressão de CDKs como CDK2, CDK4, CDK6 e ciclinas como ciclina D1 e E.

A MOX tem ganhado visibilidade nos últimos anos em relação aos seus efeitos antitumorais em glioblastoma (Song *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2020) e câncer colorretal (Mao *et al.*, 2022). Assim como outros fármacos da família das lactonas macrocíclicas, a MOX é um fármaco estável, lipossolúvel e de meia vida longa, o que garante uma concentração de composto ativo no hospedeiro durante um longo

período (Prichard *et al.*, 2012; Geyer, 2013; Milton *et al.*, 2020). Tal característica pode ser interessante no contexto da terapia antitumoral, pois com poucas doses o paciente pode ter uma resposta efetiva.

Ainda neste cenário, a MOX, de forma menos potente que outras LMs, é um substrato e também apresenta a capacidade de inibir a atividade da P-gp (Lespine *et al.*, 2007, Nakatani *et al.*, 2023). A glicoproteína P é uma proteína de efluxo, presente tanto na membrana celular quanto em membranas de organelas intracelulares (Lespine *et al.*, 2007; Fu, 2013; Shah *et al.*, 2023). Quando super expressa, essa proteína serve como um mecanismo de resistência medicamentosa em diversos tipos de tumores, sendo capaz de reduzir a concentração intracelular da droga antitumoral (Teixeira *et al.*, 2023). A inibição desta proteína tem sido recomendada como uma estratégia viável para reverter a resistência às drogas em diversos tipos de tumores (Shah *et al.*, 2023). Por inibir, mesmo que fracamente, a ação desse mecanismo, a MOX apresenta potencial coadjuvante interessante na terapia antineoplásica.

Além de demonstrar eficácia e seletividade em dois dos tipos tumorais mais comuns na população feminina, especialmente nas linhagens de câncer de mama, MOX é um medicamento já aprovado para a utilização em humanos pelo FDA desde 2018 (Milton *et al.*, 2020). No presente trabalho ela apresentou citotoxicidade em linhagens celulares mais agressivas e resistentes de câncer de mama e de colo uterino, seletividade, redução da capacidade clonogênica das células tumorais, indução da apoptose e sinergismo no tratamento com um quimioterápico amplamente utilizado (na linhagem MCF-7). Por demonstrar resultados interessantes, o presente estudo da avaliação do potencial antitumoral da MOX, bem como seu potencial coadjuvante, pode colaborar para um melhor tratamento e maior taxa de sucesso. Além disso, a utilização da MOX se torna interessante por aumentar a variedade de drogas, ter preço acessível e demonstrar menor toxicidade, além de permitir a racionalização o uso de quimioterápicos pois podem ser utilizadas doses menores desses medicamentos em uma associação.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Moxidectina foi testada em uma linhagem normal de fibroblasto humano (GM 07492A), duas linhagens de carcinoma mamário (MCF-7 e MDA-MB-231) e duas linhagens de câncer de colo uterino (HeLa e SiHa). Os resultados mostraram que a MOX, de maneira tempo dependente, reduz a viabilidade de todas as linhagens tumorais testadas. As concentrações inibitórias médias demonstraram que o tratamento com a MOX foi seletivo, com exceção da linhagem HeLa. Além de possuir citotoxicidade seletiva, a MOX também foi capaz de inibir a formação de colônias de forma significativa em todas as linhagens de células neoplásicas.

Ademais, a MOX também foi capaz de induzir diversas alterações morfológicas características da apoptose nas células tratadas, aumentando significativamente o número de células em morte nos grupos tratados. Apesar de não ter demonstrado o mesmo efeito em todas as linhagens, apresentou efeito aditivo ao da cisplatina na indução da apoptose e aprisionamento na fase S do ciclo celular em MCF-7. A morte celular induzida, portanto, não parece estar diretamente relacionada com o ciclo nas outras linhagens (Figura 21).

O presente trabalho é pioneiro no estudo do potencial da MOX contra células de câncer de mama e de colo uterino, nas quais demonstrou atividade antitumoral promissora, e também na avaliação de seu sinergismo com a cisplatina, onde demonstrou efeito aditivo na linhagem MCF-7. Neste sentido, a MOX pode ser uma alternativa segura e eficaz para um tratamento mais seletivo, rápido e menos custoso dessas neoplasias.

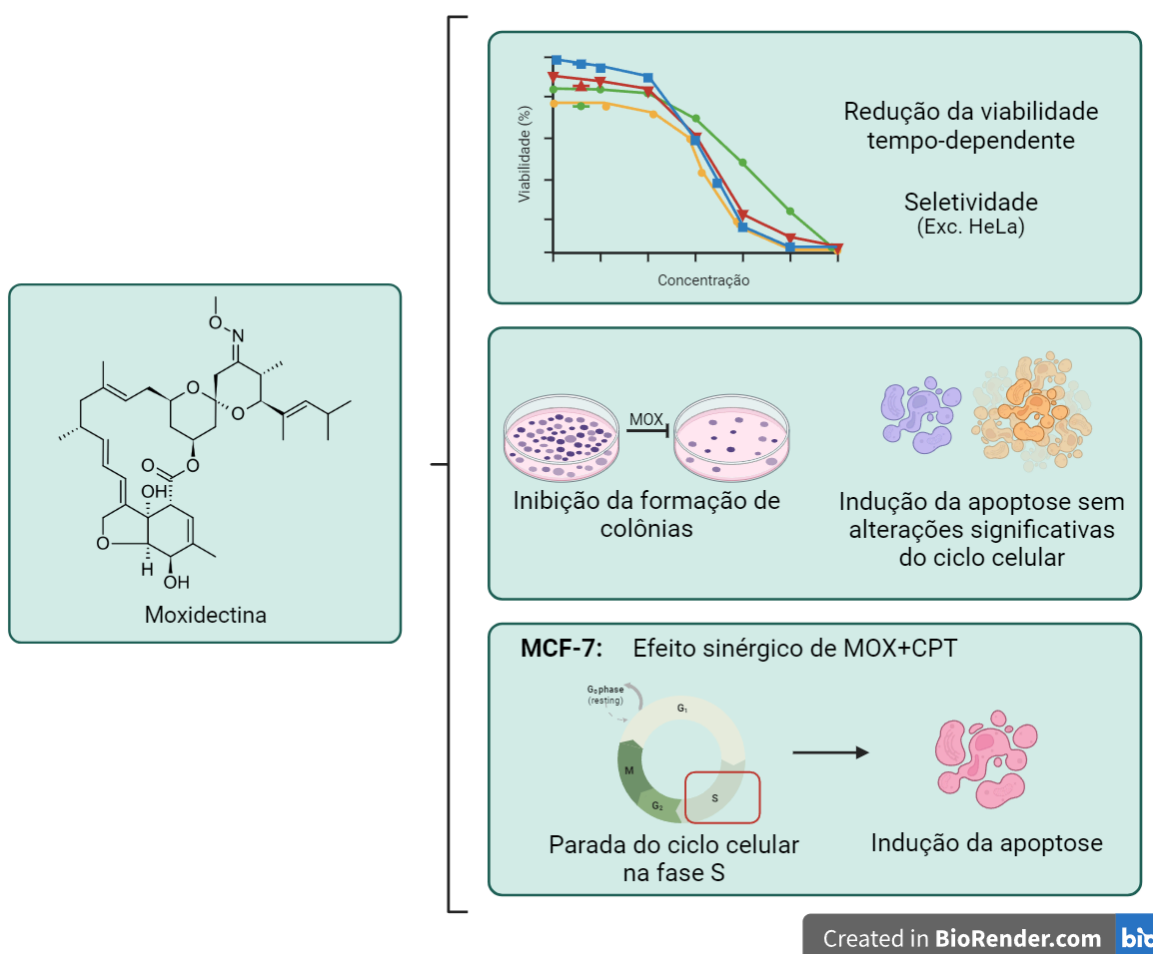


Figura 21- Representação esquemática dos principais achados do presente estudo. A MOX demonstrou citotoxicidade tempo-dependente e seletiva, além de inibir a capacidade de formar colônias das linhagens utilizadas. Também foi capaz de induzir a apoptose de forma independente ao ciclo celular. Na linhagem MCF-7 a MOX apresentou efeito sinérgico ao da cisplatina dobrando o número de células em apoptose e aprisionando as células na fase S do ciclo celular (Autoria própria, criado no BioRender).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAZA, Yasmin; KANTARJIAN, Hagop; GARCIA-MANERO, Guillermo; ESTEY, Elihu; BORTHAKUR, Gautam; JABBOUR, Elias; FADERL, Stefan; O'BRIEN, Susan; WIERDA, William; PIERCE, Sherry. Long-term outcome of acute promyelocytic leukemia treated with all-trans-retinoic acid, arsenic trioxide, and gemtuzumab. **Blood**, [S.L.], v. 129, n. 10, p. 1275-1283, 9 mar. 2017.

AHMED, Faheem; KANG, In Suk; KIM, Kyung Hwan; ASIF, Arun; RAHIM, Chethikkattuveli Salih Abdul; SAMANTASINGHAR, Anupama; MEMON, Fida Hussain; CHOI, Kyung Hyun. Drug repurposing for viral cancers: a paradigm of machine learning, deep learning, and virtual screening :based approaches. **Journal Of Medical Virology**, [S.L.], v. 95, n. 4, p. 1-23, 31 mar. 2023.

ALSAEDI, Iman I J; TAQI, Zainab J; HUSSIEN, Adi M Abdul; SULAIMAN, Ghassan M; JABIR, Majid s. Graphene nanoparticles induces apoptosis in MCF-7 cells through mitochondrial damage and NF-KB pathway. **Materials Research Express**, [S.L.], v. 6, n. 9, p. 095413, 26 jul. 2019.

AMAYA, Sae; OURA, Kyoko; MORISHITA, Asahiro; MASAKI, Tsutomu. Cisplatin in Liver Cancer Therapy. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 24, n. 13, p. 10858, 29 jun. 2023.

ANAND, Preetha; KUNNUMAKARA, Ajaikumar B.; SUNDARAM, Chitra; HARIKUMAR, Kuzhuvelil B.; THARAKAN, Sheeja T.; LAI, Oiki S.; SUNG, Bokyoung; AGGARWAL, Bharat B.. Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. **Pharmaceutical Research**, [S.L.], v. 25, n. 9, p. 2097-2116, 15 jul. 2008.

AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (org.). **Molecule of the Week Archive: Moxidectin**. 2018. Disponível em: <https://www.acs.org/content/acs/en/molecule-of-the-week/archive/m/moxidectin.html>. Acesso em: 16 set. 2021.

ARBYN, Marc; WEIDERPASS, Elisabete; BRUNI, Laia; SANJOSÉ, Silvia de; SARAIYA, Mona; FERLAY, Jacques; BRAY, Freddie. Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. **The Lancet Global Health**, [S.L.], v. 8, n. 2, p. 191-203, fev. 2020.

ARDELLI, Bernadette F.; PRICHARD, Roger K. Effects of ivermectin and moxidectin on the transcription of genes coding for multidrug resistance associated proteins and behaviour in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of nematology**, 2008.

BARAŃSKA, Klaudia; WOJCIECHOWSKA, Urszula; MIKLEWSKA, Marta; DIDKOWSKA, Joanna. Long-term effects of tobacco smoking on lung cancer mortality in Poland based on a geographical term. **Tobacco Prevention & Cessation**, [S.L.], v. 9, n. , p. 1, 25 abr. 2023.

BAXTER-HOLLAND, Mia; DASS, Crispin R. Doxorubicin, mesenchymal stem cell toxicity and antitumour activity: implications for clinical use. **Journal Of Pharmacy And Pharmacology**, [S.L.], v. 70, n. 3, p. 320-327, 22 jan. 2018.

BEGLEY, C. Glenn; ASHTON, Mark; BAELL, Jonathan; BETTESS, Michael; BROWN, Michael P.; CARTER, Brett; CHARMAN, William N.; DAVIS, Christopher; FISHER, Simon; FRAZER, Ian. Drug repurposing: misconceptions, challenges, and opportunities for academic researchers. **Science Translational Medicine**, [S.L.], v. 13, n. 612, p. 1-13, 22 set. 2021.

BERGANTINI, A. P. F. et al. Leucemia mielóide crônica e o sistema Fas-FasL. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [S.L.], v. 27, n. 2, p. 120-125, jun. 2005.

BHATTACHARJEE, Rahul; DEY, Tanim; KUMAR, Lamha; KAR, Sulagna; SARKAR, Ritayan; GHORAI, Mimosa; MALIK, Sumira; JHA, Niraj Kumar; VELLINGIRI, Balachandar; KESARI, Kavindra Kumar. Cellular landscaping of cisplatin resistance in cervical cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 153, p. 113345, set. 2022.

BOUVARD, Véronique; WENTZENSEN, Nicolas; MACKIE, Anne; BERKHOF, Johannes; BROTHERTON, Julia; GIORGI-ROSSI, Paolo; KUPETS, Rachel; SMITH, Robert; ARROSSI, Silvina; BENDAHHOU, Karima. The IARC Perspective on Cervical Cancer Screening. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 385, n. 20, p. 1908-1918, 11 nov. 2021.

BRAS, M. et al. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. **Biochemistry (Moscow)**, [S.L.], v. 70, n. 2, p. 231-239, fev. 2005.

BRITT, Kara L.; CUZICK, Jack; PHILLIPS, Kelly-Anne. Key steps for effective breast cancer prevention. **Nature Reviews Cancer**, [S.L.], v. 20, n. 8, p. 417-436, 11 jun. 2020.

BRECKENRIDGE, Alasdair; JACOB, Robin. Overcoming the legal and regulatory barriers to drug repurposing. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 1-2, 8 jun. 2018.

BYGARSKI, Elizabeth E.; PRICHARD, Roger K.; ARDELLI, Bernadette F.. Resistance to the macrocyclic lactone moxidectin is mediated in part by membrane transporter P-glycoproteins: implications for control of drug resistant parasitic nematodes. **International Journal For Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, [S.L.], v. 4, n. 3, p. 143-151, dez. 2014.

CARNEIRO, Benedito A.; EL-DEIRY, Wafik S.. Targeting apoptosis in cancer therapy. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [S.L.], v. 17, n. 7, p. 395-417, 23 mar. 2020.

CARREL, Alexis; BURROWS, Montrose T. Cultivation in vitro of malignant tumors. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 13, n. 5, p. 571, 1911.

CHU, Edward; SARTORELLI, A. C. Cancer chemotherapy. **Lange's Basic and Clinical Pharmacology**,, p. 948-976, 2018.

COBB, Rami; BOECKH, Albert. Moxidectin: a review of chemistry, pharmacokinetics and use in horses. **Parasites & Vectors**, [S.L.], v. 2, n. 2, p. 5, 2009.

COMȘA, Șerban; CIMPEAN, Anca Maria; RAICA, Marius. The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research. **Anticancer research**, v. 35, n. 6, p. 3147-3154, 2015.

D'ARCY, M. s et al. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell Biology International**, [S.L.], v. 43, n. 6, p. 582-592, 25 abr. 2019.

DASARI, Shaloam; TCHOUNWOU, Paul Bernard. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 740, p. 364-378, out. 2014.

DAVIES, H. G.; GREEN, R. H.. Avermectins and milbemycins. **Natural Product Reports**, [S.L.], v. 3, p. 87, 1986.

DE OLIVEIRA, J. C., BRASSESCO, M. S., PEZUK, J. A., MORALES, A. G., VALERA, E. T., MONTALDI, A. P., ... & TONE, L. G In vitro PLK1 inhibition by BI 2536 decreases proliferation and induces cell-cycle arrest in melanoma cells. **Journal of drugs in dermatology: JDD**, v. 11, n. 5, p. 587-592, 2012.

DOGLIONI, Ginevra; PARIK, Sweta; FENDT, Sarah-Maria. Interactions in the (pre) metastatic niche support metastasis formation. **Frontiers in oncology**, v. 9, p. 219, 2019.

DOU, Qianhui; CHEN, Hai-Ning; WANG, Kui; YUAN, Kefei; LEI, Yunlong; LI, Kai; LAN, Jiang; CHEN, Yan; HUANG, Zhao; XIE, Na. Ivermectin Induces Cytostatic Autophagy by Blocking the PAK1/Akt Axis in Breast Cancer. **Cancer Research**, [S.L.], v. 76, n. 15, p. 4457-4469, 31 jul. 2016.

DRINYAEV, Victor A.; MOSIN, Vladimir A.; KRUGLYAK, Elena B.; NOVIK, Tamara S.; STERLINA, Tatiana S.; ERMAKOVA, Natalia V.; KUBLIK, Ludmila N.; LEVITMAN, Maria Kh.; SHAPOSHNIKOVA, Vera V.; KORYSTOV, Yuri N.. Antitumor

effect of avermectins. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 501, n. 1-3, p. 19-23, out. 2004.

DU, Songlin; LIANG, Hongsheng; ZHOU, Lu; CHEN, Chen; SUN, Ruimeng; ZHANG, Jie; MENG, Xiangyi; GAO, Aili. Effect of doramectin on programmed cell death pathway in glioma cells. **Clinical And Translational Oncology**, [S.L.], p. 1-13, 21 abr. 2023.

DUARTE, Roberta Aparecida. **Sinalização celular para apoptose em linhagem celular de adenocarcinoma (MCF-7) e carcinoma ductal invasivo de mama (ZR 7531) tratadas com alcalóides isolados de Pterogyne nitens**. 2010. 153 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biociências e Biotecnologia Aplicadas À Farmácia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2010. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/101196/duarte_ra_dr_arafcf.pdf;jsessionid=1B4C291AF3A36CA3A597A07EEAFE244?sequence=1. Acesso em: 12 nov. 2021.

DUEÑAS-GONZÁLEZ, A.; JUÁREZ-RODRÍGUEZ, M. Ivermectin: potential repurposing of a versatile antiparasitic as a novel anticancer. In: **Repurposed Drugs for Cancer**. IntechOpen, 2021.

DUPUY, J.; LESPINE, A.; SUTRA, J. F.; ALVINERIE, M.. The interaction between moxidectin and MDR transporters in primary cultures of rat hepatocytes. **Journal Of Veterinary Pharmacology And Therapeutics**, [S.L.], v. 29, n. 2, p. 107-111, abr. 2006.

EATMANN, Ahmed Ismail; HAMOUDA, Esraa; HAMOUDA, Heba; FAROUK, Hossam Khaled; JOBRAN, Afnan W. M.; OMAR, Abdallah A.; MADEEH, Alyaa Khaled; AL-DARDERY, Nada Mostafa; ELNOAMANY, Salma; ABD-ELNASSER, Eman Gamal. Potential Use of Thalidomide in Glioblastoma Treatment: an updated brief overview. **Metabolites**, [S.L.], v. 13, n. 4, p. 543, 11 abr. 2023.

EUROPEAN COLLECTION OF AUTHENTICATED CELL CULTURES (Uk).
European Collection Of Authenticated Cell Cultures (org.). **Cell line profile - MDA-MB-231**: mda-mb-231 (ecacc catalogue no. 92020424). MDA-MB-231 (ECACC catalogue no. 92020424). Disponível em:
<https://www.culturecollections.org.uk/media/133182/mda-mb-231-cell-line-profile.pdf>.
Acesso em: 01 out. 2023.

ELMORE, S. et al. Apoptosis: a review of programmed cell death.
Toxicologic Pathology, [S.L.], v. 35, n. 4, p. 495-516, jun. 2007.

FIGUEROLA, B.; AVILA, C. The phylum bryozoa as a promising source of anticancer drugs. **Marine drugs**, v. 17, n. 8, p. 477, 2019.

FLEMMING, Alexandra. Targeting the root of cancer relapse. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S.L.], v. 14, n. 3, p. 165-165, 27 fev. 2015.

FREITAS, M. S. *et al.* Principais mecanismos de oncogênese. Em: **Bases moleculares em clínica médica** (ALVES, P. C. C.; DA POIAN, A. T.; ABRAHÃO, A.). Editora Atheneu, São Paulo, v. 1, p. 555-571, 2010.

FRIEDL, F.; KIMURA, I.; OSATO, T.; ITO, Y.. Studies on a New Human Cell Line (SiHa) Derived from Carcinoma of Uterus. I. Its Establishment and Morphology. **Experimental Biology And Medicine**, [S.L.], v. 135, n. 2, p. 543-545, 1 nov. 1970.

FOUAD, Yousef Ahmed; AANEI, Carmen. Revisiting the hallmarks of cancer. **American journal of cancer research**, v. 7, n. 5, p. 1016, 2017.

FU, Dong. Where is it and How Does it Get There – Intracellular Localization and Traffic of P-glycoprotein. **Frontiers In Oncology**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 1-5, 30 dez. 2013.

GALLARDO, Franck; MARIAMÉ, Bernard; GENCE, Remi;
TILKIN-MARIAMÉ, Anne-Francoise. Macrocyclic lactones inhibit nasopharyngeal carcinoma cells proliferation through PAK1 inhibition and reduce in vivo tumor growth. **Drug design, development and therapy**, v. 12, p. 2805, 2018.

GAO, Aili; WANG, Xiangjing; XIANG, Wensheng; LIANG, Hongsheng; GAO, Jiguo; YAN, Yijun. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in vitro by doramectin and nemadectin. **Journal Of Pharmacy And Pharmacology**, [S.L.], v. 62, n. 3, p. 393-399, mar. 2010.

GAO, Aili; LIANG, Hongsheng; WANG, Xiangjing; ZHANG, Xiangtong; JING, Meng; ZHANG, Ji; YAN, Yijun; XIANG, Wensheng. Reversal effects of two new milbemycin compounds on multidrug resistance in MCF-7/adr cells in vitro. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 659, n. 2-3, p. 108-113, jun. 2011.

GRINSTEIN, Edgar; WERNET, Peter; SNIJDERS, Peter J.F.; RÖSL, Frank; WEINERT, Inge; JIA, Wentao; KRAFT, Regine; SCHEWE, Christiane; SCHWABE, Michael; HAUPTMANN, Steffen. Nucleolin as Activator of Human Papillomavirus Type 18 Oncogene Transcription in Cervical Cancer. **Journal Of Experimental Medicine**, [S.L.], v. 196, n. 8, p. 1067-1078, 21 out. 2002.

GROELLY, Florian J.; FAWKES, Matthew; DAGG, Rebecca A.; BLACKFORD, Andrew N.; TAROUNAS, Madalena. Targeting DNA damage response pathways in cancer. **Nature Reviews Cancer**, [S.L.], v. 23, n. 2, p. 78-94, 5 dez. 2022.

GOL, Roghayeh Molani; KHEIROURI, Sorayya. The Effects of Quercetin on the Apoptosis of Human Breast Cancer Cell Lines MCF-7 and MDA-MB-231: a systematic review. **Nutrition And Cancer**, [S.L.], v. 74, n. 2, p. 405-422, 7 mar. 2021.

GÜLER, Eray Metin; AKYILDIZ, Ayşenur Günaydin. Ivermectin Induces Oxidative Stress and DNA Damage in Breast Cancer Cells. **Bezmialem Science**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 15-22, 30 jan. 2023.

HAMEED, Rabia; SOHAIB, Ahmed Umer; ASHRAF, Muhammad; KHAN, Asma Fareed; TAHIR, Muhammad. EVALUATION OF CYTOTOXICITY AND ANTI-VIRAL ACTIVITY OF MOXIDECTIN AGAINST INFLUENZA VIRUS H9. **EVALUATION**, v. 29, n. 04, 2022.

HANAHAN, Douglas ; A WEINBERG, Robert. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, [s.l.], v. 100, n. 1, p.57-70, jan. 2000.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HANAHAN, Douglas. Hallmarks of Cancer: new dimensions. **Cancer Discovery**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 31-46, 1 jan. 2022.

HARRISON, Ross G. Embryonic transplantation and development of the nervous system. **The Anatomical Record**, v. 2, n. 9, p. 385-410, 1908.

HASHIMOTO, Hisashi; MESSERLI, Shanta M.; SUDO, Tamotsu; MARUTA, Hiroshi. Ivermectin inactivates the kinase PAK1 and blocks the PAK1-dependent growth of human ovarian cancer and NF2 tumor cell lines. **Drug Discov Ther**, v. 3, n. 6, p. 243-246, 2009.

HUANG, Zhaoming; YU, Panpan; TANG, Jianhui. Characterization of Triple-Negative Breast Cancer MDA-MB-231 Cell Spheroid Model. **Oncotargets And Therapy**, [S.L.], v. 13, p. 5395-5405, jun. 2020.

HULL, Rodney; MBELE, Mzwandile; MAKHAFOLA, Tshepiso; HICKS, Chindo; WANG, Shao-Ming; REIS, Rui; MEHROTRA, Ravi; MKHIZE-KWITSHANA, Zilungile; KIBIKI, Gibson; BATES, David. Cervical cancer in low and middle-income countries (Review). **Oncology Letters**, [S.L.], v. 20, n. 3, p. 2058-2074, 19 jun. 2020.

HUYNH, Nhat; ARABIAN, Natalie; NAITO, Anna; LOUIE, Stan; JAKOWEC, Michael W.; ASATRYAN, Liana; DAVIES, Daryl L.. Preclinical development of moxidectin as a novel therapeutic for alcohol use disorder. **Neuropharmacology**, [S.L.], v. 113, p. 60-70, fev. 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (org.). **Estimativa 2020**. 2020.
Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa/estado-capital/brasil>. Acesso em:
16 out. 2021.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (org.). **Brazil fact sheets**. 2020. Disponível em:
<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/76-brazil-fact-sheets.pdf>. Acesso em: 15 out. 2021.

IARC - International Agency for Research on Cancer (org.). **Breast cancer**.
Disponível em: <https://www.iarc.who.int/cancer-type/breast-cancer/>. Acesso em: 12 maio 2023.

JANKO, C.; GEYER, J. Moxidectin has a lower neurotoxic potential but comparable brain penetration in P-glycoprotein-deficient CF-1 mice compared to ivermectin. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 36, n. 3, p. 275-284, 2013.

JUAREZ, Mandy; SCHCOLNIK-CABRERA, Alejandro;
DUEÑAS-GONZALEZ, Alfonso. The multitargeted drug ivermectin: from an antiparasitic agent to a repositioned cancer drug. **American Journal Of Cancer Research**, v. 8, n. 2, p.317-331, 2018.

JUAREZ, Mandy; SCHCOLNIK-CABRERA, Alejandro;
DOMINGUEZ-GOMEZ, Guadalupe; CHAVEZ-BLANCO, Alma; DIAZ-CHAVEZ, Jose;
DUENAS-GONZALEZ, Alfonso. Antitumor effects of ivermectin at clinically feasible concentrations support its clinical development as a repositioned cancer drug. **Cancer Chemotherapy And Pharmacology**, [S.L.], v. 85, n. 6, p. 1153-1163, 30 maio 2020.

JUNCO, M.; IGLESIAS, L. E.; SAGUÉS, M. F.; GUERRERO, I.; ZEGBI, S.;
SAUMELL, C. A.. Effect of macrocyclic lactones on nontarget coprophilic organisms: a review. **Parasitology Research**, [S.L.], v. 120, n. 3, p. 773-783, 27 jan. 2021.

KAPAŁCZYŃSKA, Marta; KOLENDA, Tomasz; PRZYBYŁA, Weronika; ZAJĄCZKOWSKA, Maria; TERESIAK, Anna; FILAS, Violetta; IBBS, Matthew; BLIŹNIAK, Renata; ŁUCZEWSKI, Łukasz; LAMPERSKA, Katarzyna. 2D and 3D cell cultures—a comparison of different types of cancer cell cultures. **Archives of Medical Science**, v. 14, n. 4, p. 910-919, 2016.

KELLER, Ladina; PALMEIRIM, Marta s; AME, Shaali M; ALI, Said M; PUCHKOV, Maxim; HUWYLER, Jörg; HATTENDORF, Jan; KEISER, Jennifer. Efficacy and Safety of Ascending Dosages of Moxidectin and Moxidectin-albendazole Against *Trichuris trichiura* in Adolescents: a randomized controlled trial. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], p. 1193-1201, 2 maio 2019.

KITA, Kiyoshi; SHIOMI, Kazuro; ŌMURA, Satoshi. Advances in drug discovery and biochemical studies. **Trends In Parasitology**, [S.L.], v. 23, n. 5, p. 223-229, maio 2007.

KORTH-BRADLEY, J. M.; PARKS, V.; PATAT, A.; MATSCHKE, K.; MAYER, P.; FLECKENSTEIN, L.. Relative Bioavailability of Liquid and Tablet Formulations of the Antiparasitic Moxidectin. **Clinical Pharmacology In Drug Development**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 32-37, 1 jan. 2012.

KORYSTOV, Yuri N.; ERMAKOVA, Natalia V.; KUBLIK, Ludmila N.; LEVITMAN, Maria Kh.; SHAPOSHNIKOVA, Vera V.; MOSIN, Vladimir A.; DRINYAEV, Viktor A.; KRUGLYAK, Elena B.; NOVIK, Tamara S.; STERLINA, Tatiana S.. Avermectins inhibit multidrug resistance of tumor cells. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 493, n. 1-3, p. 57-64, jun. 2004.

KURA, Klodeta; MILTON, Philip; HAMLEY, Jonathan I. D.; WALKER, Martin; BAKAJIKA, Didier K.; KANZA, Eric M.; OPOKU, Nicholas O.; HOWARD, Hayford; NIGO, Maurice M.; ASARE, Sampson. Can mass drug administration of moxidectin accelerate onchocerciasis elimination in Africa? **Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences**, [S.L.], v. 378, n. 1887, p. 1-11, 21 ago. 2023.

LAGE, H. *et al.* An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem. **Cellular And Molecular Life Sciences**, [S.L.], v. 65, n. 20, p. 3145-3167, 26 jun. 2008.

LEMOS, Anderson José Gonzaga; TRINDADE, Emilia Jacinto. Interferências no efeito farmacológico mediadas pelas biotransformações dos citocromos p450. **Revista Científica do ITPAC**, Araguaína, v. 7, n. 2, 2014.

LESPINE, Anne; DUPUY, Jacques; ORLOWSKI, Stéphane; NAGY, Tünde; GLAVINAS, Hristos; KRAJCSI, Peter; ALVINERIE, Michel. Interaction of ivermectin with multidrug resistance proteins (MRP1, 2 and 3). **Chemico-Biological Interactions**, [S.L.], v. 159, n. 3, p. 169-179, fev. 2006.

LESPINE, Anne; MARTIN, Solenne; DUPUY, Jacques; ROULET, Alain; PINEAU, Thierry; ORLOWSKI, Stéphane; ALVINERIE, Michel. Interaction of macrocyclic lactones with P-glycoprotein: structure:affinity relationship. **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 30, n. 1, p. 84-94, jan. 2007.

LI, Fei; ZHENG, Zaosong; CHEN, Wei; LI, Dongqing; ZHANG, Henghui; ZHU, Yuanchao; MO, Qixin; ZHAO, Xinlei; FAN, Qin; DENG, Fan. Regulation of cisplatin resistance in bladder cancer by epigenetic mechanisms. **Drug Resistance Updates**, [S.L.], v. 68, p. 100938, maio 2023.

LIU, Jingjing; LIANG, Hongsheng; KHILJI, Saadia; LI, Haitao; SONG, Dandan; CHEN, Chen; WANG, Xiaoxing; ZHANG, Yiwei; ZHAO, Ning; LI, Xina. Moxidectin induces Cytostatic Autophagic Cell Death of Glioma Cells through inhibiting the AKT/mTOR Signalling Pathway. **Journal Of Cancer**, [S.L.], v. 11, n. 19, p. 5802-5811, 2020.

LIU, Rui; LI, Jingyi; ZHANG, Tao; ZOU, Linzhi; CHEN, Yi; WANG, Kui; LEI, Yunlong; YUAN, Kefei; LI, Yi; LAN, Jiang. Itraconazole suppresses the growth of glioblastoma through induction of autophagy. **Autophagy**, [S.L.], v. 10, n. 7, p. 1241-1255, 15 maio 2014.

LUCEY, Brendan P.; NELSON-REES, Walter A.; HUTCHINS, Grover M.. Henrietta Lacks, HeLa Cells, and Cell Culture Contamination. **Archives Of Pathology & Laboratory Medicine**, [S.L.], v. 133, n. 9, p. 1463-1467, 1 set. 2009.

MAO, Yushan; XIE, Hanhan; SHU, Dan; CHENG, Lin; LAN, Jingbin; PAN, Kejian. Moxidectin induces autophagy arrest in colorectal cancer. **Medical Oncology**, [S.L.], v. 39, n. 12, p. 1-11, 29 set. 2022.

MARAK, Brilliant N.; DOWARAH, Jayanta; KHIANGTE, Laldingluaia; SINGH, Ved Prakash. Step toward repurposing drug discovery for COVID-19 therapeutics through in silico approach. **Drug Development Research**, [S.L.], v. 82, n. 3, p. 374-392, 10 nov. 2020.

MARKOWSKA, Anna; KAYSIEWICZ, Joanna; MARKOWSKA, Janina; HUCZYŃSKI, Adam. Doxycycline, salinomycin, monensin and ivermectin repositioned as cancer drugs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S.L.], v. 29, n. 13, p. 1549-1554, jul. 2019.

MASTERS, John R.. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. **Nature Reviews Cancer**, [S.L.], v. 2, n. 4, p. 315-319, abr. 2002.

MCKELLAR, Q. A.; BENCHAOUI, H. A.. Avermectins and milbemycins. **Journal Of Veterinary Pharmacology And Therapeutics**, [S.L.], v. 19, n. 5, p. 331-351, out. 1996.

MEISSNER, J D. Nucleotide sequences and further characterization of human papillomavirus DNA present in the CaSki, SiHa and HeLa cervical carcinoma cell lines. **Journal Of General Virology**, [S.L.], v. 80, n. 7, p. 1725-1733, 1 jul. 1999.

MELLOR, Howard R.; CALLAGHAN, Richard. Resistance to Chemotherapy in Cancer: a complex and integrated cellular response. **Pharmacology**, [S.L.], v. 81, n. 4, p. 275-300, 2008.

MELOTTI, Alice; MAS, Christophe; KUCIAK, Monika; LORENTE-TRIGOS, Aiala; BORGES, Isabel; ALTABA, Ariel Ruiz I. The river blindness drug Ivermectin and related macrocyclic lactones inhibit WNT - TCF pathway responses in human cancer. **Embo Molecular Medicine**, [S.L.], v. 6, n. 10, p. 1263-1278, 20 ago. 2014.

MILHES, M.; GUILLERM, M.; ROBIN, M.; EICHSTADT, M.; ROY, C.; GRISEZ, C.; PRÉVOT, F.; LIÉNARD, E.; BOUHSIRA, E.; FRANC, M.. A real-time PCR approach to identify anthelmintic-resistant nematodes in sheep farms. **Parasitology Research**, [S.L.], v. 116, n. 3, p. 909-920, 18 jan. 2017.

MILTON, Philip; HAMLEY, Jonathan I. D.; WALKER, Martin; BASÁÑEZ, María-Gloria. Moxidectin: an oral treatment for human onchocerciasis. **Expert Review Of Anti-Infective Therapy**, [S.L.], v. 18, n. 11, p. 1067-1081, 26 jul. 2020.

MINAGAWA, Yukihiisa; KIGAWA, Junzo; ITAMOCHI, Hiroaki; KANAMORI, Yasunobu; SHIMADA, Muneaki; TAKAHASHI, Masakuni; TERAOKAWA, Naoki. Cisplatin-resistant HeLa Cells Are Resistant to Apoptosis via p53-dependent and -independent Pathways. **Japanese Journal Of Cancer Research**, [S.L.], v. 90, n. 12, p. 1373-1379, dez. 1999.

MIRABELLI, Pepinno; COPPOLA, Luigi; SALVATORE, Marco. Cancer Cell Lines Are Useful Model Systems for Medical Research. **Cancers**, [S.L.], v. 11, n. 8, p. 1098, 1 ago. 2019.

MOLYNEUX, David H; BRADLEY, Mark; HOERAUF, Achim; KYELEM, Dominique; TAYLOR, Mark J. Mass drug treatment for lymphatic filariasis and onchocerciasis. **Trends In Parasitology**, [S.L.], v. 19, n. 11, p. 516-522, nov. 2003.

MUNIZ, Marta Silva; HALBACH, Katharina; ARARUNA, Igor Cauê Alves; MARTINS, Rafael Xavier; SEIWERT, Bettina; LECHTENFELD, Oliver; REEMTSMA, Thorsten; FARIAS, Davi. Moxidectin toxicity to zebrafish embryos: bioaccumulation and biomarker responses. **Environmental Pollution**, [S.L.], v. 283, p. 117096, ago. 2021.

MUÑOZ-MUÑOZ, Lara; SHOEN, Carolyn; SWEET, Gaye; VITORIA, Asunción; BULL, Tim J.; CYNAMON, Michael; THOMPSON, Charles J.; RAMÓN-GARCÍA, Santiago. Repurposing Avermectins and Milbemycins against *Mycobacteroides abscessus* and Other Nontuberculous Mycobacteria. **Antibiotics**, [S.L.], v. 10, n. 4, p. 381, 3 abr. 2021.

NAKATANI, Matheus Takemi Muchon; BORGES, Dyego Gonçalves Lino; CONDE, Mário Henrique; FREITAS, Mariana Green de; TUTIJA, Juliane Francielle; RODRIGUES, Vinícius Duarte; RECKZIEGEL, Guilherme Henrique; CAROLLO, Carlos Alexandre; BORGES, Fernando Almeida. Synergism of macrocyclic lactones against *Haemonchus contortus*. **Parasitology Research**, [S.L.], v. 122, n. 3, p. 867-876, 11 fev. 2023.

OBENG, E.. Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. **Brazilian Journal Of Biology**, [S.L.], v. 81, n. 4, p. 1133-1143, dez. 2021.

OYOUNI, Atif Abdulwahab A.. Human papillomavirus in cancer: infection, disease transmission, and progress in vaccines. **Journal Of Infection And Public Health**, [S.L.], v. 16, n. 4, p. 626-631, abr. 2023.

PANTZIARKA, Pan; VERBAANDERD, Ciska; SUKHATME, Vidula; CAPISTRANO, Rica; CRISPINO, Sergio; GYAWALI, Bishal; ROOMAN, Ilse; VAN NUFFEL, An Mt; MEHEUS, Lydie; SUKHATME, Vikas P. ReDO_DB: the repurposing drugs in oncology database. **Ecancermedicalsecience**, [S.L.], v. 12, p. 1-19, 6 dez. 2018.

PARK, Kyungsoo. A review of computational drug repurposing. **Translational And Clinical Pharmacology**, [S.L.], v. 27, n. 2, p. 59, 2019.

POON, I. K. H. et al. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. **Nature Reviews Immunology**, [S.L.], v. 14, n. 3, p. 166-180, 31 jan. 2014.

PRICHARD, Roger; MÉNEZ, Cécile; LESPINE, Anne. Moxidectin and the avermectins: consanguinity but not identity. **International Journal For Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, [S.L.], v. 2, p. 134-153, dez. 2012.

PRICHARD, Roger K.; GEARY, Timothy G.. Perspectives on the utility of moxidectin for the control of parasitic nematodes in the face of developing anthelmintic resistance. **International Journal For Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, [S.L.], v. 10, p. 69-83, ago. 2019.

PRICHARD, Roger K.. Macrocyclic lactone resistance in *Dirofilaria immitis*: risks for prevention of heartworm disease. **International Journal For Parasitology**, [S.L.], v. 51, n. 13-14, p. 1121-1132, dez. 2021.

PUSHPAKOM, Sudeep; IORIO, Francesco; EYERS, Patrick A.; ESCOTT, K. Jane; HOPPER, Shirley; WELLS, Andrew; DOIG, Andrew; GUILLIAMS, Tim; LATIMER, Joanna; MCNAMEE, Christine. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 41-58, 12 out. 2018.

QIN, Siyuan; JIANG, Jingwen; LU, Yi; NICE, Edouard C.; HUANG, Canhua; ZHANG, Jian; HE, Weifeng. Emerging role of tumor cell plasticity in modifying therapeutic response. **Signal Transduction And Targeted Therapy**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 1-36, 7 out. 2020.

RAFEHI, Haloom; ORLOWSKI, Christian; GEORGIADIS, George T.; VERVERIS, Katherine; EL-OSTA, Assam; KARAGIANNIS, Tom C.. Clonogenic Assay: adherent cells. **Journal Of Visualized Experiments**, [S.L.], n. 49, p. 1, 13 mar. 2011.

RAJENDRAN, Vijayalakshmi; JAIN, Mayur Vilas. In vitro tumorigenic assay: colony forming assay for cancer stem cells. **Cancer Stem Cells: Methods and Protocols**, p. 89-95, 2018.

RANASINGHE, Ranmali; MATHAI, Michael L.; ZULLI, Anthony. Cisplatin for cancer therapy and overcoming chemoresistance. **Heliyon**, [S.L.], v. 8, n. 9, p. 10608, set. 2022.

RANI, Nutan; RAWAT, Kavita; SAINI, Mona; YADAV, Sapna; SYEDA, Saima; SAINI, Kalawati; SHRIVASTAVA, Anju. Comparative In Vitro Anticancer Study of Cisplatin Drug with Green Synthesized ZnO Nanoparticles on Cervical Squamous

Carcinoma (SiHa) Cell Lines. **Acs Omega**, [S.L.], v. 8, n. 16, p. 14509-14519, 12 abr. 2023.

RAY, Rajarshi Sankar; RANA, Basabi; SWAMI, Biswanath; VENU, Venkatappan; CHATTERJEE, Malay. Vanadium mediated apoptosis and cell cycle arrest in MCF7 cell line. **Chemico-Biological Interactions**, [S.L.], v. 163, n. 3, p. 239-247, nov. 2006.

ROMANI, Andrea M.P.. Cisplatin in cancer treatment. **Biochemical Pharmacology**, [S.L.], v. 206, p. 115323, dez. 2022.

SAK, K. Chemotherapy and Dietary Phytochemical Agents. **Chemotherapy Research And Practice**, [s.l.], v. 2012, p.1-11, 2012.

SAMADDER, N. Jewel; GIRIDHAR, Karthik V.; BAFFY, Noemi; RIEGERT-JOHNSON, Douglas; COUCH, Fergus J.. Hereditary Cancer Syndromes—A Primer on Diagnosis and Management. **Mayo Clinic Proceedings**, [S.L.], v. 94, n. 6, p. 1084-1098, jun. 2019.

SANTOS, Marcell de Oliveira; LIMA, Fernanda Cristina da Silva de; MARTINS, Luís Felipe Leite; OLIVEIRA, Julio Fernando Pinto; ALMEIDA, Liz Maria de; CANCELA, Marianna de Camargo. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, [S.L.], v. 69, n. 1, p. 1-12, 6 fev. 2023.

SANZ, Miguel A.; FENAUX, Pierre; TALLMAN, Martin S.; ESTEY, Elihu H.; LÖWENBERG, Bob; NAOE, Tomoki; LENGFELDER, Eva; DÖHNER, Hartmut; BURNETT, Alan K.; CHEN, Sai-Juan. Management of acute promyelocytic leukemia: updated recommendations from an expert panel of the european leukemianet. **Blood**, [S.L.], v. 133, n. 15, p. 1630-1643, 11 abr. 2019.

SCOTT, Lia C.; MOBLEY, Lee R.; KUO, Tzy-Mey; IL'YASOVA, Dora. Update on triple-negative breast cancer disparities for the United States: a population -based study from the united states cancer statistics database, 2010 through 2014. **Cancer**, [S.L.], v. 125, n. 19, p. 3412-3417, 8 jul. 2019.

SHAH, Disha; AJAZUDDIN; BHATTACHARYA, Sankha. Role of natural P-gp inhibitor in the effective delivery for chemotherapeutic agents. **Journal Of Cancer Research And Clinical Oncology**, [S.L.], v. 149, n. 1, p. 367-391, 21 out. 2022.

SHARMEEN, Sumaiya; SKRTIC, Marko; SUKHAI, Mahadeo A.; HURREN, Rose; GRONDA, Marcela; WANG, Xiaoming; FONSECA, Sonali B.; SUN, Hong; WOOD, Tabitha E.; WARD, Richard. The antiparasitic agent ivermectin induces chloride-dependent membrane hyperpolarization and cell death in leukemia cells. **Blood**, [S.L.], v. 116, n. 18, p. 3593-3603, 4 nov. 2010.

SHOOP, Wesley L.; MROZIK, Helmut; FISHER, Michael H.. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. **Veterinary Parasitology**, [S.L.], v. 59, n. 2, p. 139-156, set. 1995.

SIMSTEIN, Rebecca; BUROW, Matthew; PARKER, Amanda; WELDON, Christopher; BECKMAN, Barbara. Apoptosis, Chemoresistance, and Breast Cancer: insights from the mcf-7 cell model system. **Experimental Biology And Medicine**, [S.L.], v. 228, n. 9, p. 995-1003, out. 2003.

SINGH, Puneet; LIM, Bora. Targeting Apoptosis in Cancer. **Current Oncology Reports**, [S.L.], v. 24, n. 3, p. 273-284, 3 fev. 2022.

SINGH, Nitin; BABY, Deepak; RAJGURU, Jagadishprasad; PATIL, Pankajb; THAKKANNAVAR, Savitas; PUJARI, Veenabhojaraj. Inflammation and cancer. **Annals Of African Medicine**, [S.L.], v. 18, n. 3, p. 121, 2019.

SLEIRE, Linda; FØRDE, Hilde Elise; NETLAND, Inger Anne; LEISS, Lina; SKEIE, Bente Sandvei; ENGER, Per Øyvind. Drug repurposing in cancer. **Pharmacological Research**, [S.L.], v. 124, p. 74-91, out. 2017.

SONG, Dandan; LIANG, Hongsheng; QU, Bo; LI, Yijing; LIU, Jingjing; CHEN, Chen; ZHANG, Daming; ZHANG, Xiangtong; GAO, Aili. Moxidectin inhibits glioma cell viability by inducing G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis. **Oncology Reports**, [S.L.], p. 1, 12 jul. 2018.

SUBERU, John O.; ROMERO-CANELÓN, Isolda; SULLIVAN, Neil; LAPKIN, Alexei A.; BARKER, Guy C.. Comparative Cytotoxicity of Artemisinin and Cisplatin and Their Interactions with Chlorogenic Acids in MCF7 Breast Cancer Cells. **Chemmedchem**, [S.L.], v. 9, n. 12, p. 2791-2797, 10 set. 2014.

TAN, George S.Q.; SLOAN, Erica K.; LAMBERT, Pete; KIRKPATRICK, Carl M.J.; ILOMÄKI, Jenni. Drug repurposing using real-world data. **Drug Discovery Today**, [S.L.], v. 28, n. 1, p. 103422, jan. 2023.

TANG, Chengyuan; LIVINGSTON, Man J.; SAFIRSTEIN, Robert; DONG, Zheng. Cisplatin nephrotoxicity: new insights and therapeutic implications. **Nature Reviews Nephrology**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 53-72, 13 out. 2022.

TANNOCK, I.F. **The basic science of oncology**. 4th ed. New York: McGraw Hill; 2005.

TEIXEIRA, Ricardo G.; SALAROGLIO, Iris C.; OLIVEIRA, Nuno F. B.; SEQUEIRA, João G. N.; FONTRODONA, Xavier; ROMERO, Isabel; MACHUQUEIRO, Miguel; TOMAZ, Ana Isabel; GARCIA, M. Helena; RIGANTI, Chiara. Fighting Multidrug Resistance with Ruthenium–Cyclopentadienyl Compounds: unveiling the mechanism of p-gp inhibition. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 66, n. 20, p. 14080-14094, 24 ago. 2023.

VARGAS, Thaiz Rivera; APETOH, Lionel. Danger signals: chemotherapy enhancers?. **Immunological Reviews**, [S.L.], v. 280, n. 1, p. 175-193, 13 out. 2017.

VILLA, Luisa Lina; SCHLEGEL, Richard. Differences in transformation activity between HPV-18 and HPV-16 map to the viral LCR-E6-E7 region. **Virology**, v. 181, n. 1, p. 374-377, 1991.

VISSER, Karin E. de; EICHTEN, Alexandra; COUSSENS, Lisa M.. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nature Reviews Cancer**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 24-37, jan. 2006.

VIVEROS-CARREÑO, David; FERNANDES, Andreina; PAREJA, Rene. Updates on cervical cancer prevention. **International Journal Of Gynecologic Cancer**, [S.L.], v. 33, n. 3, p. 394-402, mar. 2023.

WENG, Ningna; ZHANG, Zhe; TAN, Yunhan; ZHANG, Xiaoyue; WEI, Xiawei; ZHU, Qing. Repurposing antifungal drugs for cancer therapy. **Journal Of Advanced Research**, [S.L.], v. 48, p. 259-273, jun. 2023.

WORD HEALTH ORGANIZATION. **Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018**. 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/cancer/PRGlobocanFinal.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2021.

YAN, Miaomiao; WU, Sha; WANG, Yuhao; LIANG, Minghao; WANG, Mengbin; HU, Wenting; YU, Guocan; MAO, Zhengwei; HUANG, Feihe; ZHOU, Jiong. Recent Progress of Supramolecular Chemotherapy Based on Host–Guest Interactions. **Advanced Materials**, [S.L.], p. 1-40, 21 jul. 2023.

ZHANG, Ping; ZHANG, Yang; LIU, Kuikui; LIU, Bin; XU, Wenping; GAO, Jufang; DING, Lei; TAO, Liming. Ivermectin induces cell cycle arrest and apoptosis of HeLa cells via mitochondrial pathway. **Cell Proliferation**, [S.L.], v. 52, n. 2, p. 1-10, 4 dez. 2018.

ZHANG, Xuan; ZHANG, Gaohua; ZHAI, Wenjing; ZHAO, Zhijun; WANG, Sheng; YI, Jianfeng. Inhibition of TMEM16A Ca²⁺-activated Cl[–] channels by avermectins is essential for their anticancer effects. **Pharmacological Research**, [S.L.], v. 156, p. 104763, jun. 2020.

ZHU, Xueqiong; ZHU, Haiyan; LUO, Hui; ZHANG, Wenwen; SHEN, Zhaojun; HU, Xiaoli. Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer. **Drug Design, Development And Therapy**, [S.L.], p. 1885, jun. 2016.

ZINGUE, Stéphane; CISILOTTO, Julia; TUECHE, Alain Brice; BISHAYEE, Anupam; MEFEGUE, Francine Azegha; SANDJO, Louis Pergaud; NDE, Chantal

Beatrice Magne; WINTER, Evelyn; MICHEL, Thomas; NDINTEH, Derek Tantoh. *Crateva adansonii* DC, an African ethnomedicinal plant, exerts cytotoxicity in vitro and prevents experimental mammary tumorigenesis in vivo. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 190, p. 183-199, ago. 2016.

ZULALIAN, Jack; STOUT, Steven J.; DACUNHA, Adrian R.; GARCES, Temistocles; MILLER, Philip. Absorption, tissue distribution, metabolism, and excretion of moxidectin in cattle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 2, p. 381-387, 1994.