

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA – CAMPUS GOVERNADOR
VALADARES**

GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

CLEONICE APARECIDA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL
DOS COMPLEXOS DE OFLOXACINO COM CICLODEXTRINAS EM CÉLULAS
DE CÂNCER DE MAMA MCF-7**

GOVERNADOR VALADARES

2022

Cleonice Aparecida de Souza

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL
DOS COMPLEXOS DE OFLOXACINO COM CICLODEXTRINAS EM CÉLULAS
DE CÂNCER DE MAMA MCF-7**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora *campus* Governador Valadares, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Me. Bolivar Ralisson Amaro

Governador Valadares

2022

Cleonice Aparecida de Souza

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL
DOS COMPLEXOS DE OFLOXACINO COM CICLODEXTRINAS EM CÉLULAS
DE CÂNCER DE MAMA MCF-7**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Farmácia da Universidade Federal de
Juiz de Fora – campus – Governador Valadares,
como requisito parcial à obtenção do grau de
Bacharel em Farmácia.

Aprovada em 12 de dezembro de 2022.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Me. Bolivar Ralisson Amaro - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora – Governador Valadares



Profª Drª. Gabriella Freitas Ferreira
Universidade Federal de Juiz de Fora – Governador Valadares



Ma. Vanessa Gonçalves Medeiros
Universidade Federal de Juiz de Fora – Governador Valadares

Dedico este trabalho a Deus aos meus pais, em especial minha mãe, aos meus irmãos e sobrinhos, que são a minha maior fortaleza.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me permitir a conclusão de uma das etapas mais importantes da minha vida, por ter me dado força e saúde. Sem Ele nada disso seria possível.

À minha mãe, que sempre esteve ao meu lado e nunca deixou que eu desistisse, ao meu pai por todo apoio, minha irmã Cleudes que é e sempre foi minha maior inspiração e incentivadora, aos meus irmãos Cleyton e Júnior, e aos meus sobrinhos que são motivos da minha maior alegria. Obrigada!

Ao meu orientador Prof. Me. Bolivar, pela paciência, dedicação e disponibilidade durante a realização desse trabalho. Agradeço pelo incentivo que foi fundamental para prosseguir este estudo. Você é sensacional, obrigada!

À Prof. Dra. Sandra Bertelli Ribeiro de Castro, pelos três anos que tive a oportunidade de participar como aluna de iniciação científica dos seus projetos, por todo aprendizado adquirido nesse período. Agradeço pela confiança depositada em mim, pelos conselhos e incentivos, você é minha inspiração como profissional e ser humano, sou uma grande fã. Não tenho palavras para agradecê-la.

À Paloma, pelos ensinamentos, companheirismo e amizade durante e após a iniciação científica, você faz parte de todo meu crescimento, serei eternamente grata!

À minha companheira de laboratório e grande amiga Bárbara, pela amizade, companheirismo, choros e alegrias, durante todo esse tempo, e principalmente por ter contribuído para que essa caminhada se tornasse mais leve. Obrigada!

Aos meus amigos Ana Carolina, Mariane Parma, Maike Gomes e Egídio Maia, vocês foram essenciais durante todos esses anos, obrigada pela amizade. Amo vocês!

Ademais, agradeço a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

RESUMO

O câncer de mama é uma doença causada pelo distúrbio de proliferação celular mamária. Esse processo produz células anormais, que se multiplicam de forma desordenada o que acarreta na formação de tumores. O câncer de mama é uma doença heterogênea com diferentes manifestações clínicas e morfológicas associadas às características genéticas distintas, exigindo, portanto, diferentes condutas terapêuticas. Diversos avanços vêm surgindo ao longo dos anos no que se diz respeito ao tratamento oncológico de tumor mamário, porém o tratamento depende da fase em que a doença se encontra e do tipo do tumor, podendo incluir cirurgia, radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia e terapia alvo. Quando essa neoplasia é diagnosticada na sua fase inicial, o tratamento tem um maior potencial curativo. Já no caso de metástase do tumor, o tratamento tem por objetivo prolongar e melhorar a qualidade de vida do paciente. O ofloxacino (OFLOX) é uma fluoroquinolona com efeito bactericida de amplo espectro de ação que demonstra atividade citotóxica para células tumorais. Estudos demonstram que a associação de fármacos com ciclodextrinas podem favorecer a atividade biológica de algumas substâncias. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial antitumoral de composição nanoestruturadas de OFLOX após inclusão em β -ciclodextrina (β CD) e hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) em células de câncer de mama MCF-7. Para avaliar o potencial antitumoral *in vitro*, a viabilidade de células MCF-7 foi determinada pelo método colorimétrico do MTT por 48 e 72 horas, após tratamento com os complexos de inclusão (CI's) nas concentrações de 300 μ M, 100 μ M e 50 μ M. Para a avaliação de apoptose e necrose foi utilizado o kit de detecção de apoptose Anexina V por citometria de fluxo e as células tratadas com os CI's nas concentrações de 300 μ M. Os resultados obtidos demonstram que o complexo HP β CD/OFLOX foi capaz de reduzir a viabilidade celular de MCF-7 a valores inferiores a 70% nas concentrações de 100 μ M e 300 μ M em 72 horas de tratamento. Foi observado que o tratamento a 300 μ M de HP β CD/OFLOX promoveu a apoptose em 54% das células MCF-7 e necrose em 20% das mesmas, valores superiores ao observado no tratamento de OFLOX na mesma concentração. Os resultados demonstram um potencial antitumoral de HP β CD/OFLOX. Maiores estudos são necessários para avaliar o potencial da HP β CD/OFLOX como futuro candidato no tratamento do câncer de mama.

Palavras-chave: Ofloxacino; Ciclodextrinas; Complexos de inclusão; MCF-7.

ABSTRACT

Breast cancer is a disease caused by breast cell proliferation disorder. This process produces abnormal cells, which multiply in a disorderly way, which leads to the formation of tumors. Breast cancer is a heterogeneous disease with different clinical and morphological manifestations associated with distinct genetic characteristics, therefore requiring different therapeutic approaches. Several advances have emerged over the years with regard to the oncological treatment of breast tumors, but the treatment depends on the stage of the disease and the type of tumor, and may include surgery, radiotherapy, chemotherapy, hormone therapy and targeted therapy . When this neoplasia is diagnosed in its initial phase, the treatment has a greater curative potential. In the case of tumor metastasis, the treatment aims to prolong and improve the patient's quality of life. Ofloxacin (OFLOX) is a fluoroquinolone with a broad spectrum bactericidal effect that demonstrates cytotoxic activity for tumor cells. Studies show that the association of drugs with cyclodextrins can favor the biological activity of some substances. Therefore, the aim of this work was to evaluate the antitumor potential of OFLOX nanostructured compositions after inclusion in β -cyclodextrin (β CD) and hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD) in MCF-7 breast cancer cells. To evaluate the in vitro antitumor potential, the viability of MCF-7 cells was determined by the MTT colorimetric method for 48 and 72 hours, after treatment with inclusion complexes (IC's) at concentrations of 300 μ M, 100 μ M and 50 μ M. For the evaluation of apoptosis and necrosis, the Annexin V apoptosis detection kit was used by flow cytometry and the cells treated with IC's at concentrations of 300 μ M. The results obtained demonstrate that the HP β CD/OFLOX complex was able to reduce the cell viability of MCF-7 to values below 70% at concentrations of 100 μ M and 300 μ M in 72 hours of treatment. It was observed that treatment at 300 μ M of HP β CD/OFLOX promoted apoptosis in 54% of MCF-7 cells and necrosis in 20% of them, values higher than those observed in the treatment of OFLOX at the same concentration. The results demonstrate an antitumor potential of HP β CD/OFLOX. Larger studies are needed to evaluate the potential of HP β CD/OFLOX as a future candidate in the treatment of breast cancer.

Keywords: Ofloxacin; Cyclodextrin; Inclusion complex; MCF-7.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Estrutura do Ofloxacino.....	20
Figura 2 Estrutura química das ciclodextrinas naturais.....	23
Figura 3 Representação esquemática da formação do CI com ciclodextrina.....	25
Figura 4 Mecanismos de ativação da apoptose através das vias intrínseca e extrínseca.....	30
Figura 5 Avaliação da citotoxicidade do OFLOX, β CD/OFLOX e HP β CD/OFLOX na concentração de 300 μ M, 100 μ M e 50 μ M em células MCF-7 após 48 horas de cultura.....	35
Figura 6 Avaliação da citotoxicidade de β CD e HP β CD na concentração de 300 μ M, 100 μ M e 50 μ M. em células MCF-7 com 48 horas de cultura.	36
Figura 7 Avaliação da citotoxicidade do OFLOX, β CD/OFLOX e HP β CD/OFLOX na concentração de 300 μ M, 100 μ M e 50 μ M. em células MCF-7 com 72 horas de cultura.	37
Figura 8 Avaliação da citotoxicidade de β CD e HP β CD na concentração de 300 μ M, 100 μ M e 50 μ M em células MCF-7 com 72 horas de cultura.	40
Figura 9 Porcentagem de apoptose em células MCF-7 tratadas com OFLOX, β CD/OFLOX, HP β CD/OFLOX, β D e HP β CD a 300 μ M em 36 horas.....	41
Figura 10 Porcentagem de necrose em células MCF-7 tratadas com OFLOX, β CD/OFLOX, HP β CD/OFLOX, β CD e HP β CD a 300 μ M em 36 horas.....	43

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REFERENCIAL TEORICO	14
2.1 CÂNCER DE MAMA	14
2.2 OFLOXACINO	18
2.3 REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS	20
2.4 CICLODEXTRINAS	22
2.5 CÉLULAS MCF-7	25
2.6 ENSAIO DE MTT NO ESTUDO DE TUMORES	26
2.7 O ENSAIO DE APOPTOSE NO ESTUDO DE TUMORES	28
3. OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GERAL	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 MATERIAIS	33
4.2 MÉTODOS	33
4.2.1 Cultura de células MCF-7	33
4.2.2 Avaliação da atividade citotóxica dos complexos de inclusão em células MCF-7 ...	33
4.2.3 Avaliação de apoptose e necrose em células MCF-7 tratadas com complexo de inclusão	34
4.2.4 Análises estatísticas	34
5. RESULTADO E DISCUSSÃO	35
5.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO EM CÉLULAS MCF-7	35
5.2 AVALIAÇÃO DE APOPTOSE EM CÉLULAS MCF-7 TRATADAS COM OS COMPLEXOS DE INCLUSÃO	40
5.3 AVALIAÇÃO DA NECROSE EM CÉLULAS MCF-7 TRATADAS COM OS COMPLEXOS DE INCLUSÃO	42
6. CONCLUSÃO	45
7. REFERÊNCIAS	46

1. INTRODUÇÃO

Entre os diversos tipos de cânceres existentes, o câncer de mama é a neoplasia de maior incidência entre as mulheres de todo o mundo (GARCÍA-ARANDA; REDONDO, 2019), sendo diagnosticado através de exames físicos, exame de mama e biópsias de tecidos (BRASIL, 2019). Embora esse tipo de câncer apresente uma melhor sobrevida aos pacientes quando comparados aos outros tipos de cânceres, os distúrbios mentais e emocionais relacionados as cirurgias, bem como as mortes por recaídas ou metástases colocam em risco a saúde das mulheres (FENG et al., 2018).

Diferente de uma década atrás, hoje os profissionais de saúde contam com diversas opções para o enfrentamento dessa malignidade, levando em consideração o tamanho, estágio, grau, comportamento metastático, agressividade e subtipo molecular intrínseco do tumor, além da idade e alterações endócrinas do paciente (AGGARMAL et al., 2021).

Embora há essa variedade de opções para o tratamento, ainda assim, devido à grande instabilidade na fisiologia do tumor, resposta a terapia, juntamente com a resistência a diversos fármacos, a oncologia clínica apresenta enormes desafios (HERNÁNDEZ-LEMUS; MARTÍNEZ-GARCÍA, 2021).

As intervenções clínicas podem gerar efeitos adversos, uma vez que a cirurgia, radioterapia e quimioterapia destroem ou inibem o crescimento e o metabolismo de células normais. O que quer dizer que o uso de alguns medicamentos contra o câncer tem sido limitado devido à sua alta citotoxicidade para células normais, afetando a qualidade de vida dos pacientes (GANDHI et al., 2020).

A descoberta de um novo medicamento, de modo especial para o tratamento do câncer, é um processo que pode levar de 10 a 15 anos para seu desenvolvimento, podendo ter um custo de dezenas de bilhões de dólares, e ainda assim, podem apresentar grandes riscos de falhas em seus ensaios clínicos (FIROOZBAKHT et al., 2022). Mediante isso, pesquisadores e clínicos têm voltado a atenção para estratégias de reposicionamento de fármacos (HERNÁNDEZ-LEMUS; MARTÍNEZ-GARCÍA, 2021).

O reposicionamento de fármacos é descrito como um processo que tende a descobrir novas indicações de compostos que já foram aprovados e comercializados ou até mesmo aqueles reprovados, devido ao insucesso em seus ensaios clínicos (KHAN et al., 2020).

No intuito de direcionar um fármaco já existente para uma nova doença, o desafio principal é identificar novas relações entre medicamentos e doenças. Com a finalidade de superar tal desafio, foram introduzidas diversas abordagens computacionais, biológicas e experimentais, além de esquemas híbridos que combinam técnicas computacionais e biológicas (FIROOZBAKHT et al., 2022). O reposicionamento não apenas acelera o desenvolvimento de um novo fármaco, mas tem como objetivo, oferecer medicamentos com menor custo, mais eficazes e seguros além de reduzir os efeitos colaterais (AGGARMAL et al., 2021).

Nos últimos anos, a estratégia de reposicionamento de fármacos teve um impulsionamento considerável, com cerca de um terço das novas aprovações de medicamentos correspondendo a medicamentos reaproveitados que atualmente geram cerca de 25% da receita anual da indústria farmacêutica. (RUDRAPAL; KHAIRNAR; JADHAV, 2020).

Um fármaco que já vem sendo estudado é o Ofloxacino (OFLOX), um antibiótico de segunda geração o qual pertence à classe das fluoroquinolonas, apresenta amplo espectro de ação contra as bactérias, tendo como mecanismo de ação a inibição da DNA girase e topoisomerase IV, essas duas enzimas estão envolvidas na replicação do DNA bacteriano (HARA; HONJO, 2019).

Diversos são as pesquisas com foco no desenvolvimento de novos sistemas de entregas de medicamentos com base em insumos farmacêuticos ativos (IFA) com propriedades físico-químicas e segurança conhecidos, no intuito de melhorar o efeito terapêutico, estabilidade e a biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis em água (BOCZAR; MICHALSKA, 2022). Levando isso em consideração, a formação de um complexo (CI) entre fármacos e ciclodextrinas (CDs) geram um campo de pesquisa com grandes margens de sucesso (MEHRIZI; AMIRI; BAHRAMI, 2019). As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos com uma estrutura única que consiste em várias unidades de glicose e são frequentemente descritas como estruturas truncadas em forma de cone, que possuem uma superfície externa hidrofílica e uma cavidade interna hidrofóbica (CRUMLING; KING; DUNCAN, 2017). Diversos são os fármacos que podem ser incluídos nessa cavidade hidrofóbica das ciclodextrinas levando à formação de complexos fármaco-ciclodextrinas, ou CI, como são denominados. Esses complexos de inclusão são compostos por duas ou mais moléculas, sendo que uma dessas moléculas denominada hospedeira, inclui de forma total ou parcial uma molécula hóspede (PAIXÃO, 2014).

Sabendo-se do grande problema de saúde pública mundial que o câncer de mama representa atualmente, o OFLOX foi objeto de estudo do presente trabalho junto às CDs β CD e HP β CD, para avaliação do potencial efeito antitumoral dos complexos de inclusão de OFLOX e as ciclodextrinas frente à linhagem celular de câncer de mama MCF-7.

2. REFERENCIAL TEORICO

2.1 CÂNCER DE MAMA

Segundo o Instituto Nacional do Câncer a estimativa mundial, feita no ano de 2018, demonstrou que ocorreram no mundo 18 milhões de novos casos de câncer (INCA, 2022), sendo que dentre esses novos casos, o câncer de mama é o mais incidente no mundo entre as mulheres, com um total de 2,1 milhões de afetadas, equivalente a 11,6% de todos os cânceres estimados (BRAY et al., 2018).

No Brasil estima-se um total de 66.280 novos casos de câncer de mama por ano no triênio 2020-2022 (INCA, 2022). Esse valor corresponde a um risco estimado de 61,61 novos casos a cada 100 mil mulheres. O câncer de mama feminino ocupa a primeira posição em todas as regiões brasileiras, sendo que o alto risco é estimado na Região Sudeste totalizando 81,06 casos por 100 mil, seguido de 71,16 casos por 100 mil na Região Sul, 45,24 por 100 mil na Região Centro-Oeste; 44,29 por 100 mil na Região Nordeste e 21,34 por 100 mil na Região Norte (INCA, 2022). Em relação ao número de óbitos, os dados obtidos do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, demonstraram que ocorreram 16.724 óbitos decorrentes de carcinoma mamário feminino no Brasil no ano de 2017, o que equivale a um risco de 16,16 por 100 mil (INCA, 2022).

De acordo com a *American Cancer Society* (2021) o câncer de mama é uma doença causada pelo distúrbio de proliferação celular mamária. Esse processo produz células anormais, que se multiplicam de forma desordenada acarretando na formação de tumores. Mutações nos genes que estão envolvidos no processo de codificação de vias protetoras em relação ao desenvolvimento do câncer, as células alteradas ou que não são mais necessárias ao organismo são incapazes de realizarem apoptose, levando portanto, ao desenvolvimento do câncer, nesse caso em questão, ao câncer de mama (AKRAM et al., 2017).

O avanço do carcinoma de mama se dá em um microambiente complexo que abrange diversas células malignas e matriz extracelular, a qual é responsável pelo suporte mecânico da estrutura mamária. Os principais tipos de células presentes nesse microambiente são os fibroblastos, linfócitos, macrófagos e células estromais derivadas de linhagens mieloides (HARBECK et al., 2019).

O câncer de mama é uma doença heterogênea com diferentes manifestações clínicas e morfológicas que estão associadas às características genéticas distintas, exigindo, portanto, diferentes condutas terapêuticas (INCA, 2022). Segundo o *Center for Disease Control Prevention* (2022) geralmente os tumores de mama se iniciam através de um aumento da proliferação celular dos ductos mamários ou nos lóbulos, seguido de uma evolução para tumores benignos ou em algumas situações podem evoluir para carcinomas metastáticos (SUN et al., 2017), o qual é originado quando as células tumorais alcançam a corrente sanguínea ou a via linfática espalhando-se para outros órgãos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL PREVENTION, 2022). Essa proliferação pode ocorrer também no tecido adiposo ou no tecido conjuntivo fibroso da mama (FENG et al., 2018).

Os adenocarcinomas constituem a maioria dos cânceres de mama, enquanto os sarcomas, como tumores filoides e angiossarcomas, dificilmente são encontrados (FENG et al., 2018). De uma maneira geral, o adenocarcinoma de mama é dividido em câncer de mama invasivo, que invadiu o tecido circundante da mama e câncer de mama não invasivo, que não se estendeu para fora do lóbulo ou ductos mamários (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2021). Os dois tipos mais comuns de cânceres de mama invasivo são: carcinoma ductal invasivo, que tem origem nos ductos de leite, podendo invadir os tecidos adiposos da mama e outras partes do corpo (AKRAM et al., 2017) sendo essa a forma mais comum de câncer de mama, totalizando 55% dos diagnósticos (MAKKI, 2015). O outro tipo é o carcinoma lobular invasivo (ILC) que se origina nas glândulas produtoras de leite (lóbulos) podendo também se estender para outras partes do corpo, porém essa forma de câncer possui diagnóstico complexo, uma vez que é difícil a detecção no exame físico e de imagem (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2021). E as duas formas comuns do câncer de mama não invasivo são: carcinoma ductal in situ (DCIS) definido como uma proliferação de células malignas nos ductos de leite e que ainda não houve a invasão da membrana basal (MAKKI, 2015; MATHELIN et al., 2021) e o carcinoma lobular in situ (LCIS) originado nos lóbulos mamários e que não houve a expansão para o tecido circundante da mama (HARBECK et al., 2019).

Em relação a expressão molecular, o câncer de mama pode ser descrito como luminal A, luminal B, luminal híbrido, receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER-2) e basal-símile. Na prática clínica utiliza-se os critérios clínico-patológicos associados a avaliação da expressão status do HER-2, além dos receptores hormonais de estrogênio (RE) e progesterona (RP) (BRASIL, 2019).

Foram identificados dois principais alvos moleculares na patogênese do câncer de mama. O primeiro é o receptor de estrogênio ($ER\alpha$) que é expresso em 70% dos cânceres de mama invasivos, e o segundo alvo molecular é o fator de crescimento epidérmico (ERBB2) que é expresso em 20% dos cânceres de mama. Indivíduos com super expressão de ERBB2 são indicados a terapia direcionada à ERBB2, incluindo anticorpos anti-ERBB2 (como trastuzumabe e pertuzumabe) e inibidores de tirosina quinase de moléculas pequenas (como lapatinibe e neratinibe) (WAKS; WINER, 2019).

Alguns fatores de risco considerados importantes para o desenvolvimento do câncer de mama vão além das características individuais de cada paciente, uma vez que o simples fato de serem do sexo feminino, já é considerado como o principal risco para o desenvolvimento dessa malignidade, visto que essa doença tem a probabilidade de ocorrer 100 vezes mais em mulheres do que em homens (FENG et al. 2018). Além do sexo, o envelhecimento é um dos principais e mais importantes fatores de riscos associados ao câncer de mama, dado que a incidência está fortemente relacionada ao aumento da idade (SUN et al. 2017). De acordo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), as mulheres acima dos 50 anos de idade têm uma maior probabilidade de desenvolverem câncer de mama, devido acúmulo de exposições aos fatores de risco longo da vida e às próprias alterações biológicas recorrentes do envelhecimento, fazendo com que esse risco seja aumentado de forma geral (INCA, 2022). No entanto, nos casos em que há ocorrência dessa neoplasia em mulheres mais jovens, esse tumor pode ser mais grave com tamanho maior, estágios mais avançados e levando a uma menor sobrevida (MOMENIMOVAHED; SALEHINIYA, 2019). Outros fatores de risco que podem ser citados são: os fatores endócrinos, história reprodutiva, estilo de vida e fatores genéticos (INCA, 2022). Em relação ao estilo de vida destaca-se, consumo de álcool, o sobrepeso e a obesidade no período pós-menopausa (INCA, 2022). Pacientes que sofrem com esse tipo de neoplasia devem adotar um estilo de vida saudável no intuito de melhorar as condições de saúde e prevenir a progressão da doença (HWANG; NHO, 2019).

No que se refere aos fatores genéticos, aproximadamente 40% dos casos de câncer de mama são derivados de fatores hereditários, a qual são decorrentes de mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 herdados de maneira autossômica dominante. Alguns estudos demonstraram que 55% dos indivíduos que possuem mutação no gene BRCA1 e 45% dos indivíduos portadores de mutação no gene BCRA2 podem desenvolver câncer de mama antes dos 70 anos de idade (MOMENIMOVAHED; SALEHINIYA, 2019).

O câncer de mama pode ser descoberto logo nos estágios iniciais através da presença de um nódulo fixo e geralmente indolor, sendo essa a primeira e principal manifestação clínica da doença a qual é percebido pela mulher e estando presente em 90% dos casos (INCA, 2022). Além do nódulo, outros sinais podem surgir, como a pele da mama aparecer avermelhada e retraída, alterações no mamilo, presença de pequenos nódulos na região das axilas e pescoço e também saída de um líquido anormal nos mamilos (INCA, 2022).

O diagnóstico do câncer de mama é baseado em exames físicos e clínicos, testes de imagem e confirmado através de avaliações histopatológicas. No caso dos exames físicos, esses devem incluir palpação bimanual das mamas e linfonodos regionais (SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA CLÍNICA, 2021). A detecção precoce do câncer de mama pode ser realizada através da mamografia, sendo este exame um método eficaz de rastreamento populacional da doença. Segundo a recomendação do Ministério da Saúde, a mamografia deve ser realizada a cada dois anos em mulheres com idade entre 50 a 69 anos (BRASIL, 2019).

Quando ocorre a suspeita de câncer por meio de exames físicos (nódulo mamário, isolado, endurecido e aderido ao tecido) mamografia ou ultrassom, a lesão deverá ser submetida a biópsia, que tem como objetivo a obtenção de material suficiente para o diagnóstico, a fim de evitar cirurgias ou procedimentos invasivos desnecessários (BRASIL, 2019).

Se detectado de forma precoce, logo nas fases iniciais do desenvolvimento, o tratamento do câncer de mama apresenta sucessos satisfatórios, diminuindo a possibilidade de tratamentos agressivos. Se diagnosticado como um tumor de mama primário, pode ser removido através de cirurgia com quimioterapia para uma maior efetividade (SUN et al., 2017). Já em casos de metástase do tumor, o tratamento tem por objetivo prolongar e melhorar a qualidade de vida do paciente (INCA, 2021). Mesmo em casos de diagnóstico precoce, quase que 30% das mulheres acabam em metástase, levando a óbito (GARCÍA-ARANDA; REDONDO, 2019).

Diversos avanços vêm surgindo ao longo dos anos no que se diz respeito ao tratamento oncológico de tumor mamário. Porém, o tratamento depende da fase em que a doença se encontra e do tipo do tumor, podendo incluir cirurgia, radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia e terapia alvo (INCA, 2022).

No que se diz respeito à quimioterapia, esse pode ser neoadjuvante (antes da cirurgia) ou adjuvante (após a cirurgia) vai depender do estado em que o paciente se encontra (AKRAM et al., 2017). A quimioterapia neoadjuvante é utilizada de maneira frequente em tumores de tamanho avançado que para serem removidos através de uma cirurgia é necessário diminuir o

tamanho do tumor para que o mesmo possa ser removido através de uma cirurgia menos extensa, promovendo, em alguns casos a conservação da mama (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2021). No caso da terapia adjuvante, essa é utilizada no intuito de destruir quaisquer células malignas que possam ter ficado após a remoção do tumor e que não são visíveis aos exames de imagens (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2021). De acordo com o Ministério da Saúde, para o tratamento do câncer de mama o Sistema Único de Saúde (SUS) disponibiliza todos os tipos de cirurgias, como mastectomias, cirurgias conservadoras e reconstrução mamária, além de radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia e tratamento com anticorpos (BRASIL, 2019). É importante salientar que a terapia adjuvante é indicada de acordo com o risco que o paciente apresenta (BRASIL, 2019).

No Brasil, o Ministério da Saúde leva em consideração os tratamentos que demonstram impacto na história natural do câncer, como a diminuição do número de mortes causadas por essa malignidade, além dos tratamentos que são aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2019).

Aqueles pacientes que concluíram a terapia adjuvante devem ser acompanhados em período de 5 anos, o exame físico deve ser realizando a mamografia a cada 3 ou 6 meses durante os três primeiros anos, e posteriormente por mais 2 anos seguintes a cada 6 ou 12 meses. Decorrido esse período de 5 anos o acompanhamento deverá ser anual (BRASIL, 2019). O tratamento contra o câncer de mama é de extrema importância para a sobrevivência do paciente, entretanto desencadeiam diversos efeitos colaterais que são causados ao longo do tempo, alguns desses podem incluir, fraqueza, perda ou aumento de peso, feridas na boca, queda de cabelo, enjoos, vômitos e tonteados (INCA, 2022).

As intervenções clínicas podem gerar efeitos adversos, uma vez que a cirurgia, radioterapia e quimioterapia destroem ou inibem o crescimento e o metabolismo de células normais. O que quer dizer que o uso de alguns medicamentos contra o câncer tem sido limitado devido à sua alta citotoxicidade para células normais, afetando a qualidade de vida dos pacientes (GANDHI et al., 2020), justificando a necessidade de obtenção de novas substâncias ou reposicionamentos de fármacos já existentes no tratamento dessa enfermidade.

2.2 OFLOXACINO

O ofloxacino (OFLOX) é um antibiótico de segunda geração o qual pertence à classe das fluoroquinolonas, foi sintetizado e desenvolvido em 1979 pela Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd. (Daiichi-Sankyo) e lançado no mercado em 1985 na Alemanha Ocidental. Estudos pré-clínicos realizados, demonstraram que a droga apresentava um amplo espectro antibacteriano e uma boa farmacocinética. (HARA; HONJO, 2019). Nomeado quimicamente pela *Internacional Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) como ácido (9-fluor-2,3-diidro-3-metil-10-(4-metil-1-piperazinil) -7-oxo-7H-pirido [1,2,3-de]-1,4-benzoxazina-6-carboxílico), sua fórmula molecular é $C_{18}H_{20}FN_3O_4$, e massa molar 361,37 g/mol. De acordo com suas características físico-químicas apresenta-se como pó cristalino esbranquiçado a amarelo claro e funde-se a temperatura de 250 °C aproximadamente. Sua solubilidade em água varia de acordo com o pH, sendo 60 mg/mL em pH variando de 2 a 5 e 4 mg/mL em pH 7. Devido à presença de dois grupos funcionais ionizáveis é considerado um fármaco com caráter zwitteriônico, cujo pKa1 é 6,05 e pKa2 é 8,22, correspondendo à ionização do ácido carboxílico e ao nitrogênio do anel piperazina, respectivamente (AL- OMAR, 2009; FARMACOPEIA, 2019).

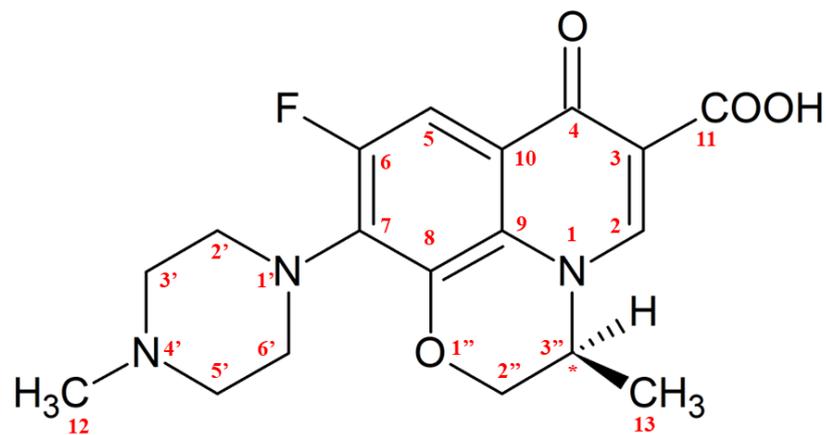
Considerado como uma droga quiral devido à substituição na posição C-3 do anel oxazina, o que resulta na formação dos enantiômeros *R* e *S* sendo eles potencialmente diferentes em relação a sua atividade antibacteriana, onde o enantiômero *S* é 8-128 vezes mais potente que seu enantiômero *R*, e cerca de duas vezes mais potente do que sua mistura racêmica (AL-OMAR, 2009). Por ser uma fluoroquinolona de segunda geração, OFLOX, tem um elevado grau de potência e maior espectro de ação se comparados às quinolonas de primeira geração, isso se deve à introdução de um átomo de flúor na posição 6, o grupo N-metilpiperazina na posição 7 e a formação de um anel oxazina (PARIS, 2012), conforme observado na figura 1.

Esses substituintes adicionados a molécula potencializaram as atividades farmacológicas do OFLOX, pois a adição do N-metilpiperazina atribuiu uma alta lipofilicidade e eficácia contra bactérias gram-positivas e o anel de oxazina contribuiu para segurança, fornecendo uma excelente absorção intestinal e penetração tecidual, logo obtendo melhorias nos aspectos farmacocinéticos (HARA; HONJO, 2019).

O OFLOX quando administrado por via oral é quase completamente absorvido, com uma biodisponibilidade que pode variar de 95% a 100%. A concentração plasmática máxima (C_{Max}) pode ser obtida 1 a 2 horas após a administração oral e estão relacionadas com a dose administrada (TODD; FAULDS, 1991). Pode-se observar uma diminuição da biodisponibilidade dessa fluoroquinolona após a coadministração oral de antiácidos contendo

alumínio ou magnésio, levando a um decaimento da sua concentração sérica, podendo chegar a 0,7 µg/mL (TUNKEL; SCHELD, 1991), alimentos também promovem um atraso na sua taxa de absorção, mas não alteram sua biodisponibilidade (TODD; FAULDS, 1991). Assim como outras fluoroquinolonas, o OFLOX se liga fracamente as proteínas plasmáticas, possui ampla penetração nos tecidos corporais, tem uma meia vida entre 5 a 8 horas em indivíduos jovens, é pouco metabolizada e excretada de forma inalterada pelos rins (ONRUST; LAMB; BALFOUR, 2012).

Figura 1. Estrutura do Ofloxacino.



Fonte: Recuperada do Pubchem (URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4583#section=2D-Structure>)

O mecanismo de ação pelo qual o OFLOX exerce seu efeito antibacteriano é através da inibição da DNA girase e topoisomerase IV, duas enzimas que estão envolvidas na replicação do DNA bacteriano (HARA; HONJO, 2019). A DNA girase, uma enzima que relaxa o DNA superenrolado, e a topoisomerase IV, uma enzima que separa os cromossomos filhos ligados após a replicação. Sendo assim, ao inibir a atividade dessas duas enzimas ocorre uma inibição da replicação, transcrição e reparo do DNA, evitando a divisão celular nas células bacterianas (GRAHAM; TRIPP, 2021).

2.3 REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS

Mesmo com todos os avanços na tecnologia e o conhecimento aperfeiçoado sobre as doenças que afetam a humanidade, ainda assim a indústria farmacêutica enfrenta diversos desafios na descoberta de novos fármacos, gerando uma lentidão no avanço terapêutico (PUSHPAKOM et al.; 2018). O percurso traçado desde a pesquisa até a comercialização de um novo medicamento é um processo que demanda tempo, alto custo, além de tentativas fracassadas durante seu desenvolvimento, de tal forma que nem sempre alcançam o sucesso esperado (STRITTMATTER, 2014).

Na busca incessante por alternativas para tratar pacientes que sofrem de diversos tipos de doenças, pesquisadores e clínicos têm voltado a atenção para estratégias de reposicionamento de fármacos (HERNÁNDEZ-LEMUS; MARTÍNEZ-GARCÍA 2021). O reposicionamento de fármacos, também conhecido, como reaproveitamento ou reperfilamento de fármacos é um processo que tende a descobrir novas indicações de compostos que já foram aprovados e comercializados ou até mesmo aqueles reprovados, devido insucesso em seus ensaios clínicos (KHAN et al., 2020). Essa estratégia tem se tornado cada vez mais interessante por apresentar várias vantagens em relação à produção de um medicamento inteiramente novo, tais como, redução da duração do tempo de desenvolvimento do medicamento, baixo custo, alta eficiência e risco mínimo de falhas (PUSHPAKOM et al., 2018; SAHOO et al., 2021). Visto que essas drogas já foram testadas e passaram pelo processo rigoroso das fases necessárias e obrigatórias de descobertas de novos medicamentos, que incluem informações detalhadas sobre sua segurança, eficácia, formulação, dose e toxicidade, e em muitos casos, ensaios clínicos de Fase I (KHAN et al., 2020).

Além disso, enquanto 10% das novas moléculas chegam ao mercado a partir dos ensaios clínicos de fase II e 50% da fase III, as taxas para os medicamentos reaproveitados são de 25% da fase II e 65% na fase III. Reforçando, portando, ser uma estratégia vantajosa para os pesquisadores obterem de maneira eficiente novas terapias (JAIN; GRUPTA, 2015).

O processo para o desenvolvimento de um fármaco obtido de maneira tradicional, geralmente incluem cinco estágios, sendo esses: a descoberta e a fase pré-clínica, revisão de segurança, pesquisa clínica, revisão e monitoramento de segurança pós-mercado. Em contrapartida, são inclusos apenas quatro estágios para o reposicionamento de um fármaco, sendo esses: identificação do composto, aquisição, desenvolvimento e monitoramento de segurança pós-mercado (XUE et al., 2018).

A maioria dos fármacos que passaram pela estratégia de reposicionamento e obtiveram sucesso, foram identificados de maneira eventual, podendo citar como exemplo, a talidomida que é um antiemético que ganhou novas indicações na hanseníase (LI; JONES, 2012), o qual se tornou o medicamento de primeira escolha no tratamento do Eritema Nodoso Hansênico (BRUM, 2020).

Citrato de Sildenafil, popularmente conhecido como Viagra, foi desenvolvido para o tratamento de doenças das artérias coronárias, porém não passou na segunda fase do ensaio clínico, foi aprovado para tratamento de problemas de disfunção erétil (MOHAMMAD JAFARI et al., 2018). Este efeito fisiológico levou a indústria farmacêutica responsável por ser reposicionamento, a lucrar anualmente mais de US\$ 2 bilhões (JOURDAN et al., 2020).

Nos últimos anos, a estratégia de reposicionamento de fármacos teve um impulsionamento considerável, com cerca de um terço das novas aprovações de medicamentos, correspondendo a medicamentos reaproveitados que atualmente geram cerca de 25% da receita anual da indústria farmacêutica (RUDRAPAL; KHAIRNAR; JADHAV, 2020). Essa estratégia oferece um baixo custo para muitos países, com um valor de aproximadamente US\$ 1,6 bilhões, enquanto o custo da estratégia tradicional é de US\$ 12 bilhões, gerando assim, uma oportunidade para muitos países desenvolverem medicamentos com menores investimentos (XUE et al., 2018).

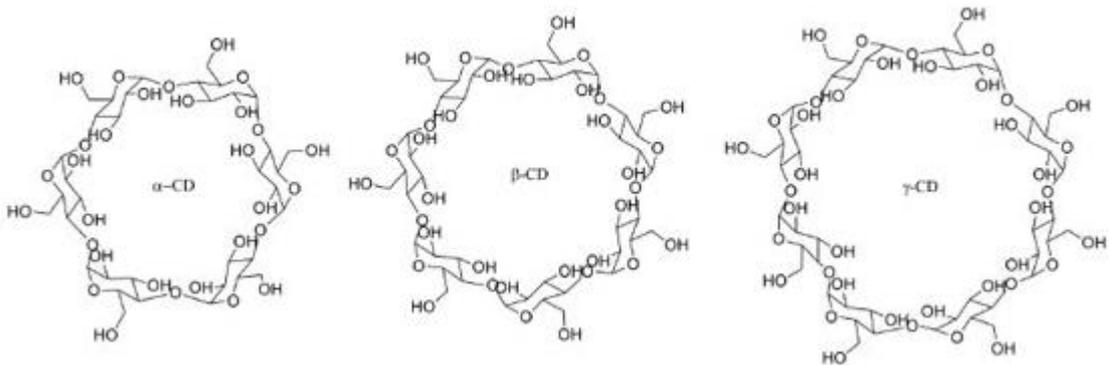
2.4 CICLODEXTRINAS

As CDs foram descritas pela primeira vez por Villiers no ano de 1891, como sendo carboidratos que se precipitavam lentamente em meio aos produtos da fermentação do amido na forma de cristais. Durante um longo período de tempo, cientistas procuraram entender a capacidade que as CDs têm de hospedarem outras moléculas e principalmente sua forma estrutural. Porém, somente no ano de 1948 que as ciclodextrinas foram definidas com precisão, através de purificação adequada e resolução de uma estrutura cristalina (BRAGA, 2019).

Embora sendo conhecidas há anos, as CDs só tiveram suas atividades expandidas na década de 1980, após serem aplicadas pela primeira vez na indústria farmacêutica e alimentar. Essa expansão foi viabilizada através da produção em escala industrial das três CDs denominadas como “nativas”, sendo essas A α -ciclodextrina (α CD), β -ciclodextrina (β CD) e γ -ciclodextrina (γ CD) (CRINI, 2014).

As ciclodextrinas são um grupo de oligossacarídeos cíclicos formados na natureza através da digestão enzimática bacteriana do amido. Elas podem se arranjar e formar uma estrutura em gaiola, em que seu núcleo é composto por uma cavidade hidrofóbica dimensionalmente estável que pode prender ou encapsular outras moléculas (WEINBERGER, 2000). Essas estruturas são formadas por seis, sete e oito unidades de glicose unidas por ligações tipo α -1,4, gerando α CD, β CD e γ CD, respectivamente. No entanto, as moléculas contendo mais de oito unidades de glicose são raras na natureza e menos caracterizadas, e aquelas com cinco unidades de glicose são puramente sintéticas (CRUMLING; KING; DUNCAN, 2017). Na figura 2 estão apresentadas a estrutura química das principais ciclodextrinas naturais.

Figura 2. Estrutura química das ciclodextrinas naturais



Fonte: SOUZA et al., 2016.

A falta de rotação livre em torno das ligações glicosídicas e da conformação de cadeia das unidades de glicose, faz com que as ciclodextrinas apresentem-se em formato de um cone truncado (CRESTANI DE MIRANDA et al., 2011), contendo uma cavidade hidrofóbica e a superfície exterior hidrofílica (PUND; JOSHI, 2017). As extremidades dessas moléculas são formadas por grupos hidroxilas primários e secundários, os primários estão localizados na borda estreita ligados aos átomos C-6 e os secundários localizados na borda mais larga ligados ao átomo C-2 e C-3 (STICK; WILLIAMS, 2009). Por possuírem vários grupos hidroxila, as CDs são altamente solúveis em água, com limites de solubilidade de 13g, 1,9g e 30g em 100 mL de água a 25°C, para α CD, β CD e γ CD, respectivamente (HASHIDZUME et al., 2017). Sendo essa a principal diferença entre as três CDs naturais, além do tamanho de sua cavidade central. A β CD é menos solúvel, porém o seu núcleo possui o tamanho mais adequado para a formação de complexos com muitos medicamentos. Sua baixa solubilidade pode ser explicada devido ao

elevado número de ligações de hidrogênio intramoleculares entre os grupos hidroxila secundários dentro da molécula. Essas interações tornam a estrutura rígida e evitam a hidratação pelas moléculas de água (SAOKHAM et al., 2018).

As propriedades mais importantes das CDs estão na capacidade de modificar as características físico-químicas e biológicas dos fármacos. Essa capacidade pode estabelecer interações por meio de forças intermoleculares com moléculas, íons ou radicais, agindo como uma substância hospedeira (CRESTANI DE MIRANDA et al., 2011). Sendo assim, o aumento resultante na solubilidade e estabilidade dos compostos hóspedes é a base predominante para o amplo uso das ciclodextrinas (CRUMLING; KING; DUNCAN, 2017).

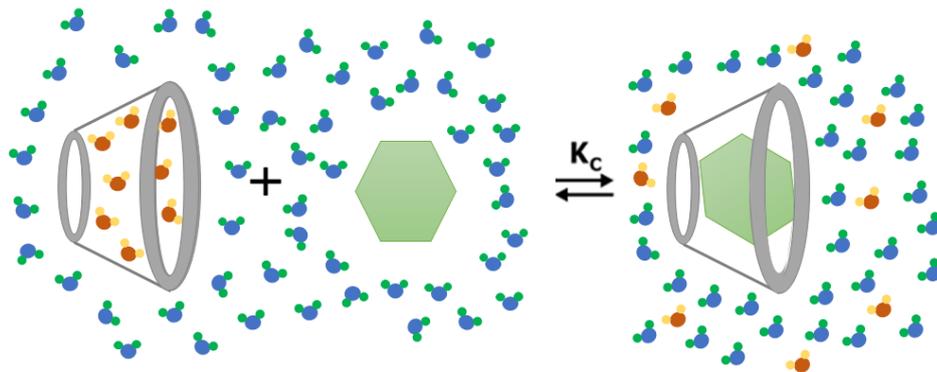
Embora a β CD seja a mais utilizada na indústria farmacêutica, essa ciclodextrina apresenta como desvantagem sua baixa solubilidade em água, como já foi discutido anteriormente. Esse fato fez com que diversos pesquisadores buscassem uma forma de melhorar algumas de suas características através da substituição do hidrogênio nos grupos hidroxila (CRUMLING; KING; DUNCAN, 2017; GENG et al., 2019). Dentre essas modificações surgiu a hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD), onde foram adicionados grupos hidroxipropil fixados na face externa do seu cone macrocíclico. Essas alterações possibilitaram a aplicação por via intravenosa, que considerada segura pelo da *Food and Drug Administration* (FDA), além de ser muito mais solúvel e menos tóxico do que a β CD natural, da qual é derivada (BEZAMAT et al., 2020).

Atualmente a HP β CD é o excipiente mais versátil entre os oligossacarídeos cíclicos, podendo ser usado em formulações orais, retais, dérmicas, oculares e parenterais. As principais formulações são as soluções (infusão, injeção e colírio) que utilizam o efeito solubilizante e estabilizante de HP β CD (MALANGA et al., 2016).

Devido às suas características estruturais, as CDs podem formar complexos de inclusão com uma grande variedade de moléculas orgânicas por meio das interações que são conhecidas como hóspede-hospedeiro. A formação de um complexo em uma solução aquosa pode ocorrer quando as moléculas de água são removidas da cavidade apolar das CDs e substituídas por uma molécula hóspede ou grupo lipofílico com polaridade, tamanho e formato compatível com a sua estrutura. Este processo é energeticamente favorável e contribui para um aumento na estabilidade do complexo, pois causa mudanças na entalpia e uma redução na energia total do sistema (CRESTANI DE MIRANDA et al., 2011). Na Figura 3 está representado o mecanismo de inclusão de uma molécula hóspede na ciclodextrina.

Os CI's que são formados com uma molécula hóspede-hospedeiro podem exibir propriedades químicas ou biológicas que apresentam melhorias quando comparadas com uma molécula hóspede isolada. Essa inclusão promove uma melhora na solubilidade, dissolução e biodisponibilidade aquosa, além de aumentar a estabilidade físico-química e vida útil dos medicamentos e prevenir interações entre fármacos e excipiente (CARNEIRO et al., 2019).

Figura 3-Representação esquemática da formação do CI com ciclodextrina.



Fonte: Adaptado de SZEJTLI, 1998.

Legenda: CI: Complexo de Inclusão; K_c : constante de equilíbrio químico.

2.5 CÉLULAS MCF-7

As células MCF-7 foram isoladas em 1973 pelo Dr. Soule e colaboradores na Fundação do Câncer de Michigan, o qual deu origem ao seu nome. Essas células foram obtidas de uma mulher com idade de 69 anos após derrame pleural, consequência de um câncer metastático. Sete anos antes da cultura primária das células, essa paciente havia sido submetida a uma mastectomia da mama direita devido a um tumor benigno onde houve a retirada do tecido, resultando na linhagem celular MCF-7 (COMSA; CIMPEAN; RAICA, 2015).

Essa linhagem celular derivada de adenocarcinoma de mama retém características ideais de epitélio mamário diferenciado, sendo capazes de processar estradiol por meio de receptores de estrogênio citoplasmáticos (FAGAN et al., 2017). Além disso, essa é a primeira linha de células de câncer de mama que contém uma resposta hormonal, além de serem sensíveis à citoqueratina e quando cultivadas *in vitro* são capazes de formar cúpulas devido ao acúmulo de fluido entre a placa de cultura e a monocamada celular (CAMARILLO et al., 2014). É válido

ressaltar que essas células também expressam receptores de androgênio, progesterona e glicocorticóides tornando-as ferramentas valiosas na pesquisa médica (LEE; OESTERREICH; DAVIDSON, 2015).

Uma das mais importantes contribuições das células MCF-7 nos trabalhos relacionados ao câncer de mama, tem sido a sua utilização no estudo do receptor de estrogênio alfa ($ER\alpha$), uma vez que essa célula é uma das poucas a expressar níveis substanciais de similares aos receptores de estrogênio (LEE; OESTERREICH; DAVIDSON, 2015). Essa linhagem celular demonstra ser pouco agressiva e não invasiva e com baixo potencial metastático (COMSA; CIMPEAN; RAICA, 2015). São, entretanto, sensíveis ao estrogênio E2 e expressam altos níveis transcritos de $ER\alpha$ e baixos níveis de $ER\beta$, na ausência de estrogênios essas células promovem um aumento da expressão do ER (COMSA; CIMPEAN; RAICA, 2015).

2.6 ENSAIO DE MTT NO ESTUDO DE TUMORES

Em 1983, Mosmann escreveu o primeiro relatório sobre uma possível aplicação do ensaio de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo], o qual descreveu a possibilidade de uma avaliação da resposta de linhagens de células de mamíferos frente a compostos citotóxicos (GRELA; KOZŁOWSKA ; GRABOWIECKA, 2018).

O ensaio de MTT foi o primeiro ensaio de viabilidade celular desenvolvido para placas de microdiluição de 96 poços, essa tecnologia foi amplamente adotada e permanece até nos dias atuais, como confirmam os milhares de artigos que são publicados utilizando essa técnica (RISS et al., 2004).

Conhecido como um método colorimétrico, o ensaio do MTT tem como finalidade medir a atividade metabólica, citotoxicidade e proliferação celular. Esse método se baseia na capacidade das enzimas oxidoredutase celulares dependentes de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) para reduzir o corante de sal tetrazólio amarelo a cristais roxo de formazan insolúvel, por células viáveis (GASQUE et al., 2014). Sendo assim, o nível aproximado de células viáveis é estimado com base na intensidade da coloração roxa (ABBASI et al., 2021). Dessa forma, esse ensaio mede a viabilidade celular em termos de atividade redutiva, uma vez que a conversão enzimática do composto de tetrazólio em cristais de formazan por desidrogenases ocorrem na mitocôndria de células vivas, entretanto agentes

redutores e enzimas localizadas em outras organelas, como o retículo endoplasmático, também podem estar envolvidos (KUETE; KARAOSMANOGLU; SIVAS, 2017).

O MTT é capaz de passar pela membrana celular e ser reduzido em células viáveis devido a lipofilicidade dos seus grupos laterais, além da presença de sua carga líquida positiva, como já dito, essa redução é decorrente de enzimas mitocondriais ou plasmáticas celulares como oxidorreduções, desidrogenases, oxidases e peroxidases usando NADH, NADPH, succinato ou piruvato, atuando como um elétron doador (PRÄBST et al., 2017).

Quando ocorre a morte celular, as células perdem a capacidade de converter o MTT em formazan, sendo assim, a formação da cor serve como um marcador apropriado apenas para aquelas células que estão viáveis (RISS et al., 2004). Os cristais de formazan que foram formados podem ser dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e posteriormente, medidos em um determinado comprimento de onda (geralmente entre 500 e 600 nm) por um espectrofotômetro (KUETE; KARAOSMANOGLU; SIVAS, 2017). O valor da densidade óptica serve como uma estimativa do número de mitocôndrias ativas, ou seja, do número de células vivas que estará presente nas amostras (LÜ et al., 2012). A quantidade de sinais gerados depende principalmente de alguns parâmetros, sendo esses: concentração de MTT, período de incubação, número de células viáveis e sua atividade metabólica (RISS et al., 2004).

Esse método de MTT apresenta diversas vantagens, tornando-o padrão ouro para testes de citotoxicidade, (KUETE; KARAOSMANOGLU; SIVAS, 2017). algumas dessas vantagens incluem: tempo hábil para avaliação das amostras, possibilidade de avaliar uma extensa quantidade de amostras de modo simultâneo, aquisição de resultados de forma objetiva e através um espectrofotômetro, alta reprodutibilidade, quantidade baixas de células necessárias, utilização em vários tipos de cultura celulares (células em monocamada, esferoides e clones) além do baixo custo (NIKZAD; GHAFAROKHI; NASRI, 2014).

Apesar de todas as vantagens que foram descritas anteriormente, essa técnica pode apresentar algumas limitações como: adsorção inespecífica, diminuição relativa na sensibilidade e baixa relação superfície/volume, podendo em alguns casos invalidar a base do processo de avaliação (ABBASI et al., 2021). No que se refere a sensibilidade, essa pode ser aperfeiçoada otimizando a concentração de MTT e o tempo de incubação com as células, porém há limitação no tempo de incubação devido a toxicidade do MTT reagente (RISS et al., 2013).

O ensaio de MTT está presente em diversos estudos de citotoxicidade para a triagem de novos compostos anticâncer, devido à sua precisão e sua simplicidade de manuseio, todavia

essa técnica não fornece informações sobre o mecanismo molecular da atividade citotóxica da droga (GANOT et al., 2013).

2.7 O ENSAIO DE APOPTOSE NO ESTUDO DE TUMORES

A morte celular é um processo de suma importância no que se refere ao desenvolvimento, homeostase dos tecidos e integridade dos organismos multicelulares, uma vez que, aquelas células indesejáveis serão removidas durante o processo de transformação, embriogênese, patogênese e renovação do tecido (JAN; CHAUDHRY, 2019).

A apoptose, conhecida também como morte celular programada ou suicídio celular, pode ser descrita como um processo que impede o crescimento e a divisão das células, levando-as a morte sem que ocorra extravasamento no ambiente circundante (D'ARCY, 2019). Diversas ocorrências podem desencadear o processo de apoptose, como a proliferação celular descontrolada, dano ao DNA ou em decorrência de algumas condições e doenças como Alzheimer a qual é resultado de uma ativação precoce das vias de morte celular (OBENG, 2021). Em contrapartida, quando essas células perdem sua capacidade de ativar essas vias, isso pode gerar doenças em excesso, como é o caso do câncer e das doenças autoimunes (TOMPKINS; THORBURN, 2019). É válido ressaltar que essas falhas na apoptose ocorrem em diversos tipos de cânceres, como câncer de pulmão, mama, próstata, fígado, tireoide e bexiga (TANG et al., 2020).

Apesar da grande variedade de condições e estímulos, fisiológicos e patológicos, que podem desencadear a apoptose, nem todas as células morrerão devido ao mesmo estímulo. Um exemplo disso são os corticosteroides que podem levar a morte de algumas células por apoptose, entretanto, outras podem não serem afetadas e nem ao menos estimuladas (ELMORE, 2007).

De modo geral, a apoptose se caracteriza por diversas mudanças morfológicas que ocorrem na estrutura da célula, em conjunto com uma gama de processos bioquímicos que são dependentes de enzimas, tendo como um resultado final a eliminação das células do corpo, com o mínimo de dano possível aos tecidos (D'ARCY, 2019). As alterações morfológicas que ocorrem na estrutura das células estão relacionadas tanto ao núcleo quanto o citoplasma. No que se refere ao núcleo, esse apresenta condensação da cromatina e fragmentação nuclear, seguido por arredondamento da célula, redução do volume celular (picnose) e retração dos

pseudópodes (WONG, 2011). Em relação as alterações bioquímicas, ocorre a clivagem de fita dupla nas regiões de ligação entre os nucleossomos, levando à formação de múltiplos fragmentos de DNA, externalização da fosfatidilserina e alterações na expressão de proteínas (KHAN; BLANCO-CODESIDO; MOLIFE, 2014).

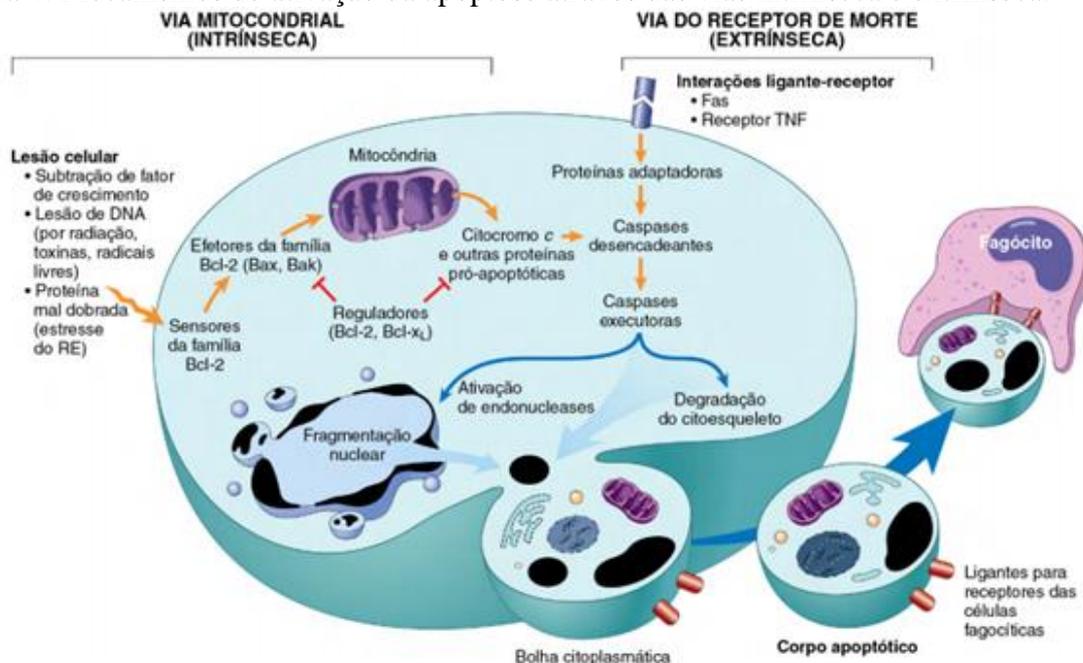
Existem, portanto, duas vias distintas que irão desencadear a apoptose: a via intrínseca a qual é desencadeada devido a estímulos intracelulares e a via extrínseca que é regulada por receptores de morte de membrana (YOU et al., 2017). A figura 4 mostra de forma esquematizada a ativação de ambas as vias.

A via intrínseca, conhecida também como via mitocondrial, pelo fato de ser iniciada dentro da célula, mais precisamente dentro da mitocôndria, é desencadeada em resposta a estímulos de estresse celular, como por exemplo, dano ao DNA, hipóxia, defeito no ciclo celular e perda de fatores que as células necessitam para a sobrevivência (KHAN; BLANCO-CODESIDO; MOLIFE, 2014). A apoptose é induzida após danificação das mitocôndrias, a qual irá liberar proteínas que residem no espaço mitocondrial (NADERER; FULCHER, 2018). Essa via é regulada de maneira rigorosa pela família de proteínas do linfoma de células B-2 (BCL-2) que abrange as proteínas efetoras pró-apoptóticas, proteínas BH3 pró-apoptóticas e proteínas BCL-2 antiapoptóticas. As proteínas BCL-2 antiapoptóticas inibem a apoptose através da inibição das proteínas BCL-2 pró-apoptóticas, proteína X associada a BCL-2 (BAX) e assassino de antagonista homólogo BCL-2. Já as proteínas BH3 inibem as proteínas BCL-2 antiapoptóticas (PFEFFER; SINGH, 2018). Membros pró-apoptóticos da família BCL-2, como é o caso da BAX, são regulados pela proteína supressora de tumor p53, além do mais, quando ocorre aumento de expressão dos membros BCL-2 pró-apoptóticos esses podem auxiliar na citotoxicidade das células tumorais e para as células normais (CARNEIRO; EL-DEIRY, 2021).

A via extrínseca depende da ligação dos receptores de morte da família do Fator de Necrose Tumoral (TNF) aos seus ligantes, estimulando as cascatas intracelulares que serão conduzidas por várias interações de proteínas, levando a ativação da caspase 8 que é considerada como uma caspase iniciadora e, posteriormente, as caspases 3 e 7, sendo essas as "executoras" finais da apoptose (TOMPKINS; THORBURN, 2019). Dentre esses ligantes de morte, estão inclusos o Fas (Fas-L), ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL) e o fator de necrose tumoral (TNF), além das proteínas adaptadoras que incluem domínio de morte associada a Fas (FADD) e o domínio de morte associado a TNF (TRADD) (PFEFFER; SINGH, 2018). Sendo assim, após a interação com o ligante, os receptores de morte sofrem

trimerização e se aglomeram no interior da membrana, seguido pelo recrutamento de proteínas adaptadoras como FADD e proteínas de caspases iniciadoras, tais como caspase 8 ou caspase 10 (CARNEIRO; EL-DEIRY, 2021). Após a ligação das caspases 8 e 10 na proteína adaptadora, ocorrerá a formação do complexo de sinalização indutor de morte (DISC), esse complexo ativa as caspases 8 e 10. Logo, as caspases 3 e 7, conhecidas como executoras, serão também ativadas, o que dará início ao processo de clivagem das proteínas, levando então à morte celular (PFEFFER; SINGH, 2018). Essa via, é crucial para eliminação das células infectadas ou potencialmente cancerosas, uma vez que ao induzir a apoptose em células infectadas por vírus, por exemplo, não ocorrerá a lise celular e conseqüentemente não haverá extravasamento do seu conteúdo nos tecidos circundantes (YANUMULA; CUSICK, 2022).

Figura 4: Mecanismos de ativação da apoptose através das vias intrínseca e extrínseca.



Fonte: KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2015.

Como mencionado anteriormente, a apoptose é de extrema importância em numerosos processos biológicos e na etiologia de diversas enfermidades que atuam no sistema imunológico, portanto o estudo desse tipo de morte celular tem como objetivo melhorar o diagnóstico de certas doenças, como é o caso do câncer, além de servir como alvo de rastreamento de diversos fármacos (RUAN et al., 2018).

Sabe-se que falhas nas vias indutoras de apoptose, podem levar casualmente à multiplicação de células neoplásicas, considerando isso, avanços recentes na pesquisa do câncer

estão centrados no desenvolvimento de novos fármacos que impeçam o comportamento de escape das células cancerosas por meio da execução da apoptose. Para isso, novos indutores apoptóticos ou sensibilizadores têm sido usados com a combinação de drogas atuais (JAN; CHAUDHRY, 2019).

Visto que a apoptose ocorre por meio de uma complexa cascata de sinalização a qual é severamente regulada em vários pontos, existem diversos caminhos para avaliar a atividade das proteínas envolvidas. Há uma extensa variedade de ensaios que estão disponíveis para essa avaliação e cada um desses oferecem vantagens e desvantagens, tornando-o adequado ou não para determinada situação (ELMORE, 2007).

Mediante a isso, a apoptose pode ser analisada pelo método de citometria de fluxo, que é uma ferramenta confiável e amplamente aceita para sua detecção (XU et al., 2014). Esse método que é utilizado para detectar as células em apoptose, devem identificar de maneira rápida as propriedades apoptóticas das células e permitir que essas mantenham seu estado natural, afim de obter os resultados mais confiáveis possíveis (ADAN et al., 2016).

A citometria de fluxo permite analisar caracterizações morfológicas das células, como o tamanho, granulação, expressão de alvos moleculares, conteúdo de RNA ou DNA, além de contagem e determinação de viabilidade celular (BAJGELMAN, 2019). Essa técnica avalia a ligação da anexina V marcada com fluorescência que é uma sonda para a fosfatidilserina (PS) da membrana, em conjunto com o iodeto de propídio (PI) que entra no interior das células contendo membranas danificadas. Uma outra situação que ocorre nesse método é utilização da coloração com PI de células permeabilizadas para medir o conteúdo de DNA por célula, o que permite a detecção da fragmentação de DNA característica que ocorre durante a apoptose (HOLLVILLE; MARTIN, 2016).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antitumoral in vitro de composição nanoestruturadas de OFLOX puro e complexado com H β CD e β CD em células MCF-7.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar células MCF-7 e trata-las com OFLOX puro e complexado com H β CD e β CD.
- Avaliar a viabilidade das células de MCF-7 tratadas com OFLOX puro e complexado com H β CD e β CD.
- Avaliar a indução da apoptose e necrose de células MCF-7 tratadas com OFLOX puro e complexado com H β CD e β CD.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

O OFLOX, β CD e HP β CD utilizados foram adquiridas da Sigma-Aldrich. Os reagentes químicos (dimetilsulfóxido, corante MTT, meio de cultura RPMI-1640, soro bovino fetal, penicilina/estreptomicina, tripsina) e kit para detecção de apoptose por citometria de fluxo foram adquiridos das empresas Sigma-Aldrich, Vetec, Invitrogen. Os complexos foram sintetizados, caracterizados e cedidos por Amaro e colaboradores (2020).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Cultura de células MCF-7

As células MCF-7 foram mantidas em cultura em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1% de aminoácido e 0,5% de antibiótico (penicilina/estreptomicina). As células foram mantidas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C até atingirem a confluência (CASTRO et al., 2012).

4.2.2 Avaliação da atividade citotóxica dos complexos de inclusão em células MCF-7

A viabilidade celular de MCF-7 foi determinada pelo método colorimétrico do MTT. Após atingirem a confluência, as garrafas foram raspadas e as células distribuídas em placas de 96 poços na concentração de $7,6 \times 10^5$ células/mL e mantidas por 24 horas em atmosfera úmida 5% de CO₂ a 37°C. Transcorrido esse tempo, as células foram submetidas a tratamento com OFLOX, ciclodextrinas (β CD e HP β CD) e CI's (β CD/OFLOX e HP β CD/OFLOX) nas concentrações de 300 μ M, 100 μ M e 50 μ M e incubadas novamente nos tempos de 48 e 72 horas. Após o tempo de exposição aos compostos, o sobrenadante de cada poço foi removido e 100 μ L de RPMI-1640 foram adicionados em todos os poços contendo as células e em seguida 10 μ L de MTT (5 mg/mL) também foram acrescentados a cada poço. As placas foram mais uma vez incubadas a 37 °C em estufa com 5% de CO₂ por 4 horas. Transcorrido esse período, a reação foi finalizada com a retirada do meio e a adição de 100 μ L de DMSO. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplaca MultiskanTM FC Microplate Photometer no

comprimento de onda de 570 nm. Experimento realizado com adaptações de Castro e colaboradores (2012).

4.2.3 Avaliação de apoptose e necrose em células MCF-7 tratadas com complexo de inclusão

A avaliação de morte por apoptose foi realizada utilizando o kit de detecção de apoptose Anexina V (*Invitrogen by Thermo Fisher Scientific*). Para esse ensaio foi utilizada uma concentração de 1×10^6 células/mL de MCF-7 cultivadas em microplacas de 96 poços e incubadas na ausência e presença de OFLOX, β CD, HP β CD, β CD/OFLOX e HP β CD/OFLOX na concentração de 300 μ M. Transcorridas 36 horas de tratamento as células foram tripsinizadas e lavadas com tampão fosfato. Após lavagem das células as mesmas foram marcadas com Anexina V – FITC e iodeto de propídio, conforme instruções do fabricante. As células foram então incubadas em temperatura ambiente por 15 minutos no escuro, e posteriormente foi feita a aquisição dos dados em citômetro de fluxo (FACSVerse, BD Biosciences). Os dados foram analisados no software FCSEXPRESS 3.0 (AMARO et al., 2020).

4.2.4 Análises estatísticas

Para os ensaios de apoptose e necrose os resultados apresentados são representativos de pelo menos três experimentos independentes e são mostrados como média \pm desvio padrão. A significância de diferença foi analisada usando o teste t de Student, teste de Mann-Whitney e ANOVA quando apropriado. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

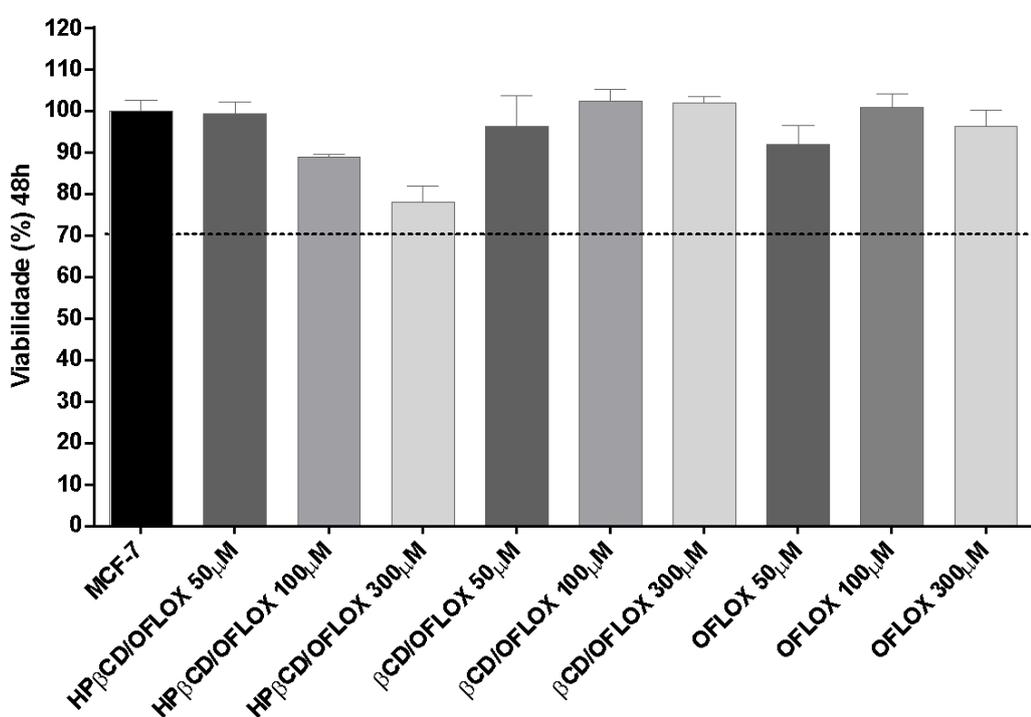
5. RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO EM CÉLULAS MCF-7

Como já descrito anteriormente, o ensaio de MTT é um teste colorimétrico que visa verificar a viabilidade celular após submeter as células às substâncias de interesse, sendo um dos métodos mais utilizados por apresentar um baixo custo, ser altamente eficiente e rápido na avaliação das amostras em estudo (ABBASI et al., 2021). Esse método se baseia na redução enzimática da molécula de MTT a formazan quando exposto a células biologicamente ativas, resultando em uma mudança de cor da molécula de MTT (GANOT et al., 2013).

Na figura abaixo estão representados os resultados da viabilidade celular de MCF-7 após 48 horas de cultura submetidas ao tratamento com OFLOX, β CD/OFLOX, HP β CD/OFLOX.

Figura 5- Avaliação da citotoxicidade do OFLOX, β CD/OFLOX e HP β CD/OFLOX na concentração de 300 μ M, 100 μ M e 50 μ M em células MCF-7 após 48 horas de cultura.

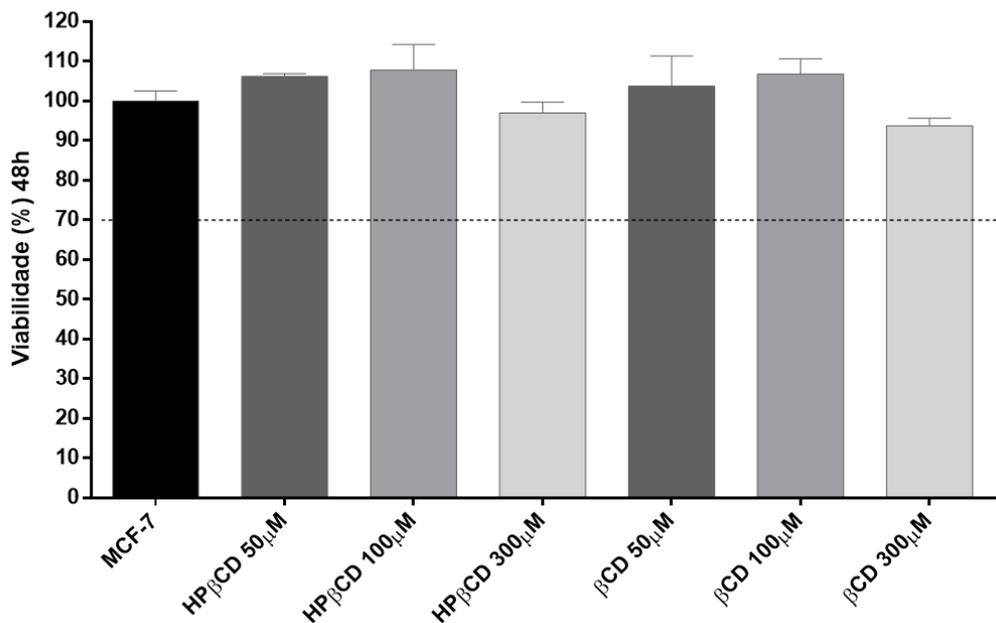


Legenda: OFLOX: ofloxacino; β CD/OFLOX: complexo de inclusão β -ciclodextrina/ofloxacino; HP β CD/OFLOX: complexo de inclusão hidroxipropil- β -ciclodextrina/ofloxacino.

Conforme apresentando no gráfico é possível observar que a viabilidade celular de MCF-7 foi superior a 90% após 48 horas de exposição com o OFLOX nas concentrações de 50 μM , 100 μM e 300 μM . Esse efeito também foi observado para o complexo $\beta\text{CD}/\text{OFLOX}$, onde a viabilidade celular se manteve a valores superiores a 90%. O complexo $\text{HP}\beta\text{CD}/\text{OFLOX}$ nas concentrações de 50 μM e 100 μM seguiu o mesmo perfil, porém na maior concentração testada (300 μM) a viabilidade celular foi superior a 70% após o período de tratamento. Os resultados demonstraram que o tratamento de células MCF-7 em diferentes concentrações de OFLOX e dos CI's resultaram em uma redução mínima na viabilidade celular, logo, não promoveram efeito citotóxico nas concentrações testadas após 48 horas de tratamento. É importante salientar que segundo a ISO 10993-5 (2009), em ensaios de MTT, os compostos que não reduzem a viabilidade celular a valores inferiores a 70%, são considerados não citotóxicos.

A alteração da atividade celular de MCF-7 foi também analisada com as ciclodextrinas puras (βCD e $\text{HP}\beta\text{CD}$) nas mesmas concentrações dos complexos de inclusão, porém como demonstrado na figura 6 não houve redução da viabilidade celular.

Figura 6- Avaliação da citotoxicidade de βCD e $\text{HP}\beta\text{CD}$ na concentração de 300 μM , 100 μM e 50 μM . em células MCF-7 com 48 horas de cultura.

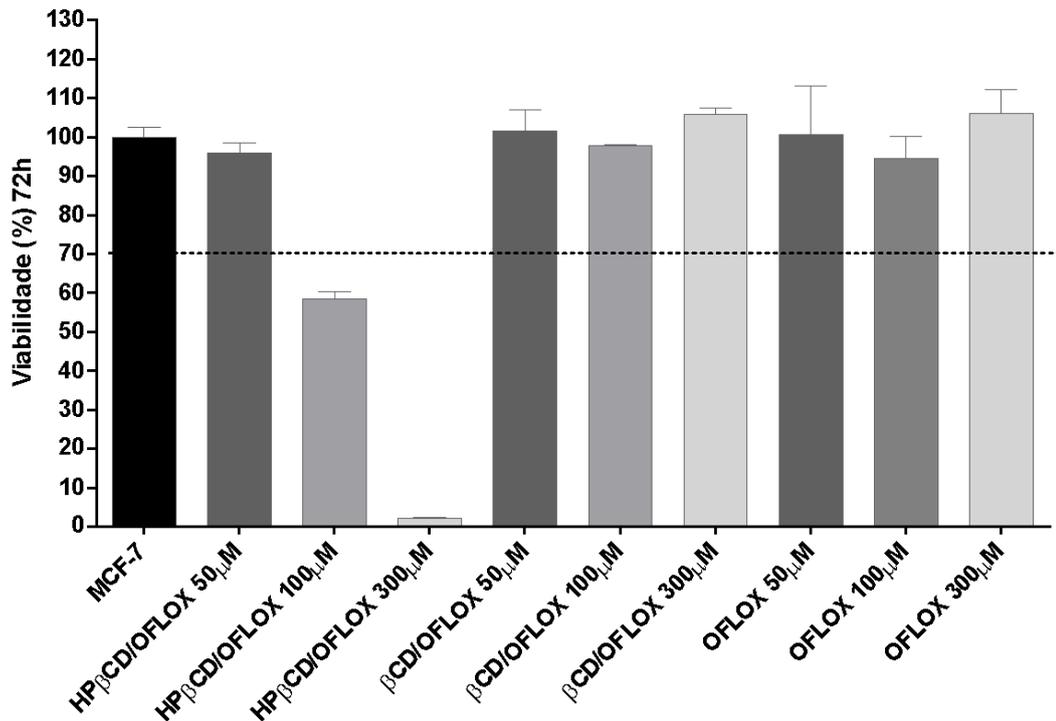


Legenda: βCD : β -ciclodextrina; $\text{HP}\beta\text{CD}$: hidroxipropil- β -ciclodextrina.

Portanto, conforme demonstrado nas figuras 5 e 6, pode-se observar que o tratamento com OFLOX e os complexos de OFLOX com ciclodextrinas não promoveram efeito citotóxico nas concentrações testadas após 48 horas de cultura de células MCF-7.

A viabilidade das células MCF-7 também foi avaliada em um período de 72 horas de tratamento com OFLOX, β CD/OFLOX e HP β CD/OFLOX. Conforme demonstrado na figura 7, a viabilidade celular após 72 horas de tratamento foi mais afetada em relação ao ensaio de 48 horas. Entre os complexos de inclusão a HP β CD/OFLOX na maior concentração (300 μ M) promoveu melhores resultados quando comparado com o grupo controle (MCF-7 não tratada), inibindo a viabilidade a valores inferiores a 10%. Além disso, pode ser observado que esse mesmo complexo em uma concentração de 100 μ M alterou a viabilidade celular a valores inferiores a 60%. HP β CD/OFLOX apresentou, portanto, uma redução relevante da atividade celular quando comparados com o OFLOX e β CD/OFLOX.

Figura 7- Avaliação da citotoxicidade do OFLOX, β CD/OFLOX e HP β CD/OFLOX na concentração de 300 μ M, 100 μ M e 50 μ M. em células MCF-7 com 72 horas de cultura.



Legenda: OFLOX: ofloxacino; β CD/OFLOX: complexo de inclusão β -ciclodextrina/ofloxacino; HP β CD/OFLOX: complexo de inclusão hidroxipropil- β -ciclodextrina/ofloxacino.

Em relação ao efeito potencial efeito antitumoral do OFLOX, vários estudos realizados com outras fluoroquinolonas foram realizados.

Sabe-se que as fluoroquinolonas são uma classe de antibióticos que interagem com os complexos de topoisomerases, inibindo a rejunção da hélice, levando a quebra de fitas duplas do DNA. Algumas dessas fluoroquinolonas exibem atividades não apenas contra a topoisomerase bacteriana II e a topoisomerase IV, mas também contra a topoisomerase II de células eucariontes, o que leva a crer que representantes dessa classe podem exibir uma citotoxicidade acentuada frente a diversas linhagens de células tumorais (BEBEROK, et al. 2018).

Mukherjee, Mandal e Das (2005) avaliaram a atividade antiproliferativa do enoxacino em células de câncer de mama e observaram que a inibição do crescimento é dependente da dose, e do tempo.

Beberok et al. (2018) demonstraram que o ciprofloxacino reduziu a viabilidade das células de câncer de mama MDA-MB-231 de maneira dependente do tempo e da concentração. Os autores observaram que o efeito citotóxico se intensificou com o aumento do tempo de incubação e concluíram que o ciprofloxacino diminuiu a viabilidade das células MDA-MB-231 em 67 e 74% em comparação com o controle após incubação por 48 e 72 horas, respectivamente.

Um outro estudo realizado por Seay Peretsman e Dixon (1996) onde investigaram o efeito antitumoral do ciprofloxacino e OFLOX em três linhagens de células de câncer de bexiga também obtiveram resultados similares e demonstraram que o efeito citotóxico do OFLOX é dependente da dose e tempo para todas as linhagens testadas. Corroborando com o presente estudo, onde foi observado este comportamento.

Levando em consideração os resultados obtidos nos tempos de 48 e 72 horas, observou-se que o complexo HP β CD/OFLOX apresentou resultados favoráveis frente as células MCF-7 quando comparados com OFLOX e β CD/OFLOX. Esse efeito ocorre possivelmente, devido a formação do complexo de inclusão CD/fármaco, que levou provavelmente à uma melhora da solubilidade do fármaco, promoveu aumento da estabilidade química e física e conseqüentemente uma melhora na distribuição do fármaco através de membranas biológicas (SAOKAHAM et al.2018). É importante destacar que entre as ciclodextrinas, a HP β CD tem o maior poder de solubilização de fármacos (MALANGA et al., 2016) o que pode ter contribuído para o resultado do presente estudo.

Esse resultado vai de encontro com o estudo de Amaro e colaboradores (2020) onde avaliaram a citotoxicidade do OFLOX após inclusão em β CD e HP β CD em células de adenocarcinoma de pulmão (A549) e observam que em uma concentração de 300 μ M o complexo HP β CD/OFLOX foi capaz de alterar a viabilidade de A549 a 47,06%.

Gontijo e colaboradores (2015) compararam o efeito do Erlotinibe puro e complexado com HP β CD em osteoblastos (células não cancerosas) e células de carcinoma epidermóide humano (A431) e observaram que o CI promoveu uma maior citotoxicidade em A431 quando comparado com o Erlotinibe puro em uma concentração de 37,5 μ M, sendo esta a maior concentração em estudo. O CI demonstrou o mesmo resultado para os osteoblastos, sendo mais ativo na maior concentração testada.

Em 2017 Kadari e colaboradores mostraram em um estudo que a fisetina (FST) complexado com HP β CD e encapsulado com nanopartículas de ácido poli-lactídeo-co-glicólico, não apenas aumentou sua atividade citotóxica contra células de câncer de mama (MCF-7) como melhorou sua biodisponibilidade oral, após ser demonstrado através do aumento da concentração plasmática máxima e absorção total do fármaco.

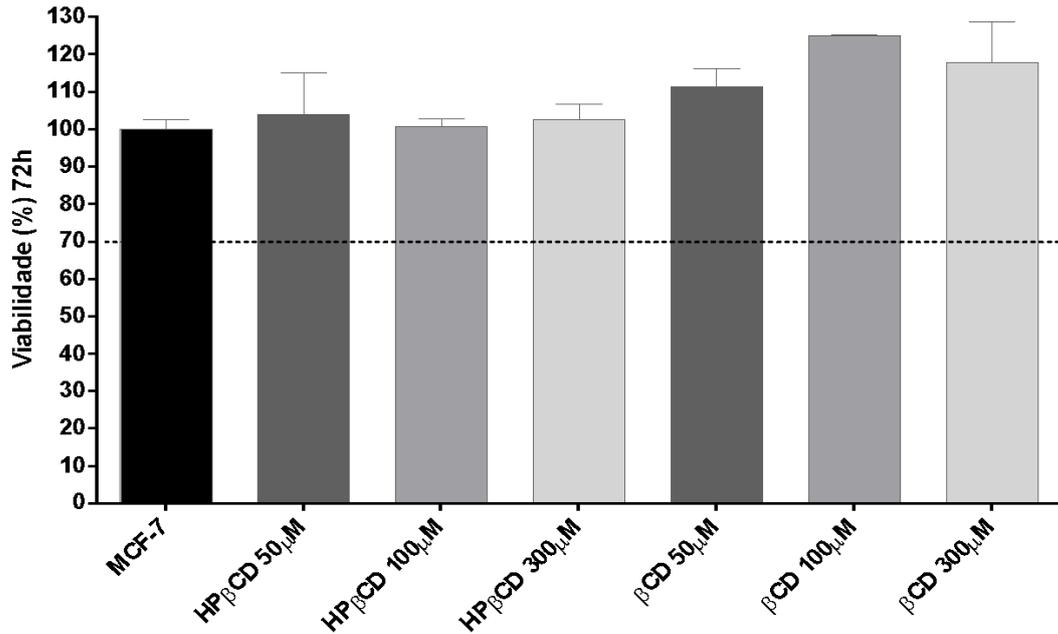
Em recente estudo realizado por Kloskowski e colaboradores (2021) onde tiveram como objetivo analisar e comparar in vitro as propriedades citotóxicas do ciprofloxacino e levofloxacino em linhagens celulares de câncer de bexiga e próstata, observaram que ambas as fluoroquinolonas testadas exibiram efeitos citotóxicos em todas as linhagens celulares, porém o ciprofloxacino mostrou ser mais vantajoso, ao demonstrar que em baixa dosagem obteve-se efeito citotóxico mais forte quando comparado ao levofloxacino. Além do mais, concluíram que tanto o ciprofloxacino e levofloxacino foram mais eficazes contra linhagens de células do câncer de bexiga.

Wang e colaboradores (2022) em estudo recente avaliaram a diferença da atividade antitumoral da Liquiritina pura e complexado com HP β CD em células de câncer de pulmão (A549). Os resultados demonstraram que o complexo aumentou significativamente a atividade antitumoral, quando comparado com a Liquiritina pura.

Como mencionados, esses estudos reforçam que assim como o presente trabalho, as ciclodextrinas melhoram as atividades do fármaco em questão, demonstrando ser um candidato promissor no tratamento contra o câncer.

A alteração da atividade celular de MCF-7 foi também analisada com as ciclodextrinas puras (β CD e HP β CD) nas mesmas concentrações dos complexos de inclusão, porém como demonstrado na figura 8 não houve redução da viabilidade celular.

Figura 8- Avaliação da citotoxicidade de β CD e HP β CD na concentração de 300 μ M, 100 μ M e 50 μ M. em células MCF-7 com 72 horas de cultura.



Legenda: HP β CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina; β CD: β - ciclodextrina.

5.2 AVALIAÇÃO DE APOPTOSE EM CÉLULAS MCF-7 TRATADAS COM OS COMPLEXOS DE INCLUSÃO

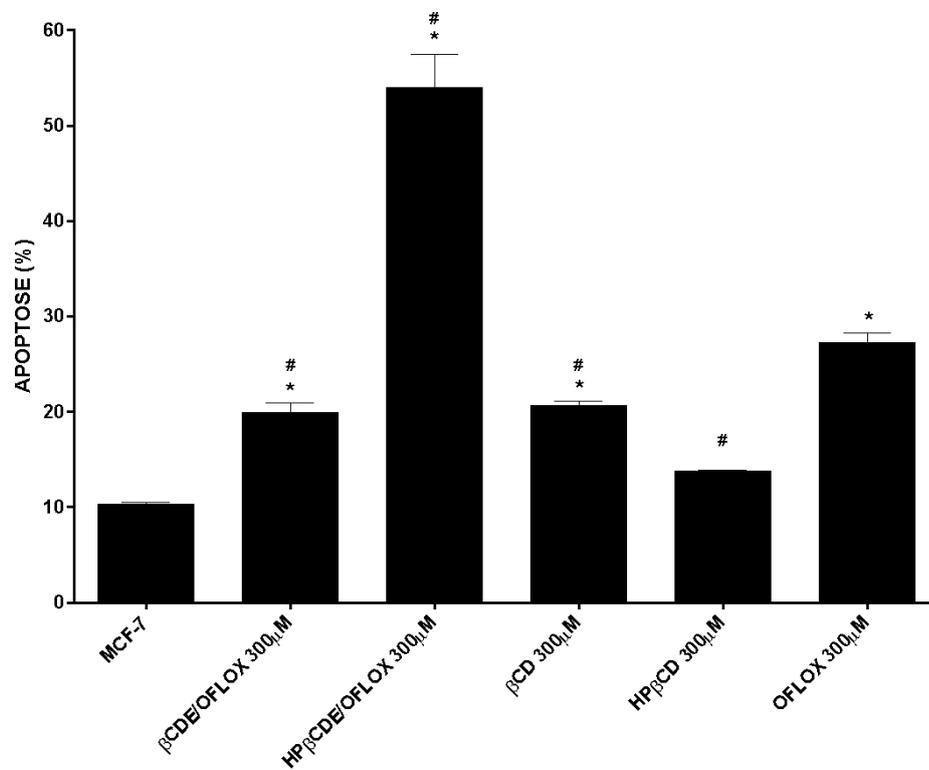
Como já mencionado anteriormente, a citometria de fluxo é uma técnica que possibilita a análise e quantificação de células ou partículas biológicas suspensas em meio líquido em fluxo. Permite verificar vários parâmetros simultaneamente, através da dispersão da luz frontal (*forward scatter- FSC*), que se correlaciona com o volume celular, luz lateral (*side 'scatter- SSC*), que estabelece a complexidade morfológica da célula e também a fluorescência emitida pelos fluorocromos ligados a anticorpos monoclonais (ADAN et al., 2017).

No intuito de verificar se houve indução da apoptose das células MCF-7 frente às substâncias em estudo, foi realizado o ensaio de apoptose por citometria de fluxo.

Na figura 9 estão apresentados os resultados de apoptose das células MCF-7 após 36 horas de tratamento com OFLOX, β CD/OFLOX, HP β CD/OFLOX, β CD e HP β CD em uma concentração de 300 μ M.

Os resultados obtidos demonstram que o complexo HP β CD/OFLOX promoveu uma indução de morte por apoptose significativa quando comparado com o controle não tratado (MCF-7).

Figura 9- Porcentagem de apoptose em células MCF-7 tratadas com OFLOX, β CD/OFLOX, HP β CD/OFLOX, β D e HP β CD a 300 μ M em 36 horas.



Legenda: OFLOX: ofloxacino; β CD/OFLOX: complexo de inclusão β -ciclodextrina/ofloxacino; HP β CD/OFLOX: complexo de inclusão hidroxipropil- β -ciclodextrina/ofloxacino; β CD; β -ciclodextrina-HP β CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina; * p <0,05 versus MCF-7 ou HP β CD/OFLOX. # p <0,05 versus OFLOX.

Como foi demonstrado nos testes de avaliação de citotoxicidade, utilizando o ensaio de MTT, o complexo HP β CD/OFLOX promoveu um melhor efeito quando comparado com o OFLOX puro e os demais CT's, seguindo o mesmo perfil dos resultados apresentados no ensaio de apoptose.

Aranha e colaboradores (2003), investigaram o efeito do ciprofloxacino em células de câncer de próstata (PC3) comparando os resultados obtidos com células epiteliais da próstata não tumorigênicas. Nesse estudo observaram que ciprofloxacino possui um potente efeito em induzir a apoptose em células de câncer de próstata, mas não em células não tumorais. Os autores analisaram que houve um aumento significativo na relação Bax/Bcl-2 com a translocação de Bax, que é uma proteína pró-apoptótica, para mitocôndrias com ativação concomitante da caspase 3 (executora) sugerindo que essa fluoroquinolona é um forte candidato como agente quimioterápico para câncer de próstata.

Em 2008 Sheng e colaboradores investigaram a indução do efeito apoptótico do OFLOX em condrócitos, onde avaliaram a ativação das caspases 9, 8 e 3, translocação do citocromo C das mitocôndrias para o citosol e a expressão das proteínas Bax, tBid e p53. Durante o estudo, foi observado que a ativação da caspase 3 é dependente das caspases 8 e 9, além do mais, verificaram que o OFLOX promoveu a despolarização do potencial de membrana mitocondrial, permitindo que o citocromo C fosse liberado do espaço intermembrana para o citosol, averiguaram que os níveis de p53, tBid e Bax exibiram aumento considerável.

Beberok e colaboradores em estudo realizado no ano de 2018, demonstraram que o tratamento com Ciprofloxacino estimulou a perda do potencial transmembrana mitocondrial através da via dependente de Bax/Bcl-2, levando, portanto, a indução de morte por apoptose em células MDA-MB-231 de câncer de mama.

Sabe-se que a apoptose pode ser descrita como uma morte celular programada, sendo esse um processo crucial para eliminar células que não são mais necessárias ou aquelas defeituosas. Diversas são as moléculas que estão envolvidas nesse processo no intuito de controlar as vias de ativação da apoptose, podendo citar, as proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas, além das caspases (GRIVICICH; REGNER, ROCHA, 2007) como já descrito anteriormente.

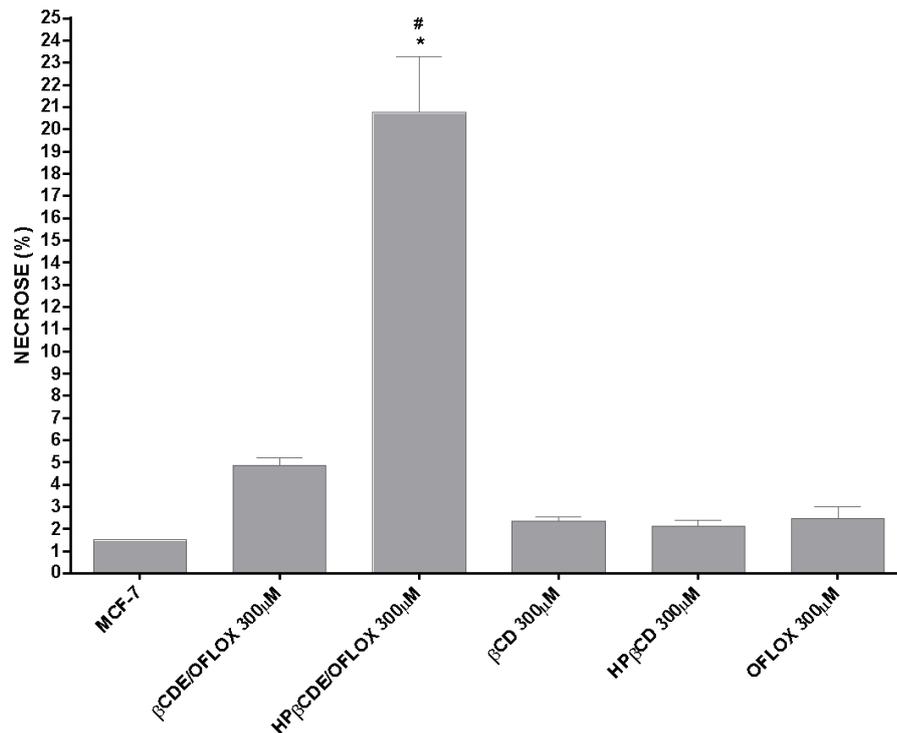
No presente estudo, verificou também a atividade do OFLOX, β CD/OFLOX, β CD e HP β CD em células MCF-7, e observou que todos esses compostos promoveram uma indução da apoptose, quando comparados com as células não tratadas.

5.3 AVALIAÇÃO DA NECROSE EM CÉLULAS MCF-7 TRATADAS COM OS COMPLEXOS DE INCLUSÃO

Para verificar se houve morte celular por necrose induzido pelo OFLOX, β CD/OFLOX, HP β CD/OFLOX, β CD e HP β CD nas células MCF-7 utilizou-se o ensaio de citometria de fluxo.

Na figura 10 demonstra os resultados de necrose em células MCF-7 após 36 horas de tratamento com OFLOX, β CD/OFLOX, HP β CD/OFLOX, β CD e HP β CD na concentração de 300 μ M. Pode ser observado que o complexo HP β CD/OFLOX promoveu uma indução de morte celular por necrose quando comparado com controle não tratado (MCF-7). Reforçando assim, os resultados anteriores, de apoptose e atividade citotóxica, onde foi demonstrado que o complexo HP β CD/OFLOX apresenta melhores efeitos que o fármaco puro e os demais complexos.

Figura 10- Porcentagem de necrose em células MCF-7 tratadas com OFLOX, β CD/OFLOX, HP β CD/OFLOX, β CD e HP β CD a 300 μ M em 36 horas.



Legenda: OFLOX: ofloxacino; β CD/OFLOX: complexo de inclusão β -ciclodextrina/ofloxacino; HP β CD/OFLOX: complexo de inclusão hidroxipropil- β -ciclodextrina/ofloxacino; β CD; β -ciclodextrina; HP β CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina.

Necrose pode ser dita como uma morte celular descontrolada, resultando em inchaço das organelas celulares, ruptura da membrana plasmática podendo levar a lise da célula e

extravasamento de conteúdo intracelular no tecido circundante, ocasionando danos aos tecidos, levando à necessidade de remoção imediata de detritos, retardando a regeneração necessária após a lesão e sustentando o dano inflamatório colateral (KHALID; AZIMPOURAN, 2022; WESTMAN; GRINSTEIN; MARQUES, 2020)

A necrose pode ser considerada como um processo passivo, pois não requer síntese de novas proteínas, tem apenas requisitos mínimos de energia e não é regulada por nenhum mecanismo homeostático. Em humanos, a morte celular necrótica ocorre geralmente em resposta a mudanças severas nas condições fisiológicas, incluindo hipóxia, isquemia, hipoglicemia, exposição a toxinas, exposição a metabólitos reativos de oxigênio, mudanças extremas de temperatura e privação de nutrientes (SYNTICHAKI, 2002).

Após lesões induzidas por sinalização ou dano, a necrose pode incluir sinais de processos controlados, como disfunção mitocondrial, geração aumentada de espécies reativas de oxigênio, depleção de ATP, proteólise por calpaínas e catepsinas e ruptura precoce da membrana plasmática (GOSTEIN; KROEMER, 2007).

Além da avaliação de morte celular por necrose em MCF-7 frente ao complexo H β CD/OFLOX, avaliou também a ação de β CD, HP β CD e OFLOX puro, porém essas substâncias não apresentaram resultados satisfatórios.

6. CONCLUSÃO

A atividade citotóxica do complexo HP β CD/OFLOX frente às células MCF-7 obtiveram melhores resultados quando comparado com o OFLOX puro e os demais complexos nas mesmas condições de experimento, sendo capaz de reduzir a viabilidade celular a valores inferiores que 70% de maneira dependente da dose e do tempo. Além do mais, o complexo HP β CD/OFLOX na maior concentração testada, induziu a morte por apoptose e necrose em células MCF-7. O aprimoramento nesses resultados, está associado a capacidade das ciclodextrinas em promover melhorias na solubilidade do fármaco, possivelmente, decorrente da redução do tamanho da partícula após inclusão, facilitando a entrada da molécula hóspede nas células. Vale ressaltar, que há uma diversidade de cânceres que demonstraram resistências a diversos antineoplásicos, o que torna o fármaco em questão promissor para estudos in vivo, devido apresentar efeito antitumoral, porém mais estudos e ensaios clínicos devem ser realizados para comprovar tal eficácia.

7. REFERÊNCIAS

- ABBASI, F. et al. The synergistic interference effect of silica nanoparticles concentration and the wavelength of ELISA on the colorimetric assay of cell toxicity. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 15133, 23 jul. 2021.
- ADAN, A. et al. Flow cytometry: basic principles and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 163–176, 14 jan. 2016.
- ADAN, A. et al. Flow cytometry: basic principles and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.37, n. 2, p. 163-176, 2017.
- AGGARWAL, S. et al. Drug repurposing for breast cancer therapy: Old weapon for new battle. **Seminars in Cancer Biology**, v. 68, p. 8-20, jan. 2021.
- AKRAM, M. et al. Awareness and current knowledge of breast cancer. **Biological Research**, v. 50, n. 1, 2 out. 2017.
- AL-OMAR, M. A. Chapter 6 ofloxacin. **Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology**, v. 34, p. 265–298, 2009.
- AMARO, B. et al. Multifunctionality of β CD/Ofloxacin and HP β CD/Ofloxacin Complexes: Improvement of the Antimicrobial Activity and Apoptosis Induction on Lung Adenocarcinoma A549 Cells. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 12, p. 2628-2637, 2020.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Breast Cancer**. Atlanta: American Cancer Society, 2021.
- ARANHA, O. et al. Suppression of human prostate cancer cell growth by ciprofloxacin is associated with cell cycle arrest and apoptosis. **International Journal of Oncology**, v. 22, n. 4, p. 787–794, 1 abr. 2003.
- BAJGELMAN, M. C. Principles and applications of flow cytometry. **In Data Processing Handbook for Complex Biological Data Sources**; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, p. 119–124, 2019.
- BEBEROK, A. et al. Ciprofloxacin triggers the apoptosis of human triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cells via the p53/Bax/Bcl-2 signaling pathway. **International Journal of Oncology**, v. 52, n. 5, p. 1727 – 1737, 8 mar. 2018.
- BEZAMAT, J. M. et al. Complexation of the local anesthetic pramoxine with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin can improve its bioavailability. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 55, p. 101475, 1 fev. 2020.
- BOCZAR, D.; MICHALSKA, K. Cyclodextrin Inclusion Complexes with Antibiotics and Antibacterial Agents as Drug-Delivery Systems - A Pharmaceutical Perspective. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 7, p. 1389, 30 jun. 2022.
- BRAGA, S. S. Cyclodextrins: Emerging Medicines of the New Millennium. **Biomolecules**, v. 9, n. 12, 28 nov. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas em Oncologia/Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde – Brasília: Ministério da Saúde, 2019.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 68, n. 6, p. 394–424, 12 set. 2018.

BRUM, A. P. Funed atua no tratamento da hanseníase como única produtora no Brasil da Talidomida. *Secretaria do Estado de Saúde de Minas Gerais*. 21, jan. 2020.

CAMARILLO, I. G. et al. Low and high voltage electrochemotherapy for breast cancer: an in vitro model study. *Electroporation-Based Therapies for Cancer*, p. 55–102, 2014.

CARNEIRO, B. A.; EL-DEIRY, W. S. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, v. 17, n. 7, p. 395–417, 23 mar. 2020.

CARNEIRO, S. B. et al. Cyclodextrin–Drug Inclusion Complexes: In Vivo and In Vitro Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 3, 2 fev. 2019.

CASTRO, S. B. R. et al. Synthesis of lipophilic genistein derivatives and their regulation of IL-12 and TNF- α in activated J774A.1 cells. *Chemical Biology & Drug Design*, v. 79, n. 3, p. 347-352, 2012.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **What Is Breast Cancer?** Centers for Disease Control and Prevention, 2022.

COMŞA, Ş.; CÎMPEAN, A. M.; RAICA, M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Research*, v. 35, n. 6, p. 3147–3154, 1 jun. 2015.

CRESTANI DE MIRANDA, J. et al. Cyclodextrins and ternary complexes: technology to improve solubility of poorly soluble drugs. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 47, n. 4, 2011.

CRINI, G. Review: A History of Cyclodextrins. *Chemical Reviews*, v. 114, n. 21, p. 10940–10975, 23 set. 2014.

CRUMLING, M. A.; KING, K. A.; DUNCAN, R. K. Cyclodextrins and Iatrogenic Hearing Loss: New Drugs with Significant Risk. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 11, 8 nov. 2017.

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

ELMORE, S. Apoptosis: a Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, v. 35, n. 4, p. 495–516, jun. 2007.

FAGAN, D. H. et al. Acquired Tamoxifen Resistance in MCF-7 Breast Cancer Cells Requires Hyperactivation of eIF4F-Mediated Translation. *Hormones & Cancer*, v. 8, n. 4, p. 219–229, 1 ago. 2017.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. **Agência Nacional de Vigilância Brasileira**, 6^a ed., Brasília, v. 2, p. IF274-00, 2019.

FENG, Y. et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. **Genes & Diseases**, v. 5, n. 2, p. 77–106, jun. 2018.

FIROOZBAKHT, F. et al. Computationally repurposing drugs for breast cancer subtypes using a network-based approach. **BMC Bioinformatics**, v. 23, n. 1, 20 abr. 2022.

GANDHI, S. R. et al. The use of cyclodextrin inclusion complexes to improve anticancer drug profiles: a systematic review. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 17, n. 8, p. 1069–1080, 1 ago. 2020.

GANOT, N. et al. Anticancer Metal Complexes: Synthesis and Cytotoxicity Evaluation by the MTT Assay. **Journal of Visualized Experiments**, n. 81, 10 nov. 2013.

GARCÍA-ARANDA, M.; REDONDO, M. Immunotherapy: A Challenge of Breast Cancer Treatment. **Cancers**, v. 11, n. 12, p. 1822, 20 nov. 2019.

GASQUE, K. C. DA S. et al. Cell density and solvent are critical parameters affecting formazan evaluation in MTT assay. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 3, p. 381–385, 25 fev. 2014.

GENG, Q. et al. The mechanism of bensulfuron-methyl complexation with β -cyclodextrin and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and effect on soil adsorption and bio-activity. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1882, 13 fev. 2019.

GOLSTEIN, P.; KROEMER, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 32, n. 1, p. 37–43, jan. 2007.

GONTIJO, S. M. L. et al. Erlotinib/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex: characterization and in vitro and in vivo evaluation. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 83, n. 3, p. 267-279, 2015

GRAHAM, D.B.; TRIPP, J. Ofloxacin. In: StatPearls [**Internet**]. Treasure Island (FL):StatPearls Publishing; jan. 2021.

GRELA, E.; KOZŁOWSKA, J.; GRABOWIECKA, A. Current methodology of MTT assay in bacteria - A review. **Acta histochemica**, v. 120, n. 4, p. 303–311, 2018.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. DA. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335–343, 28 set. 2007.

HARA, Y.; HONJO, Y. Ofloxacin and Levofloxacin (Tarivid/Cravit). **Drug Discovery in Japan**, p. 85–110, 2019.

HARBECK, N. et al. Breast cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, n. 1, 23 set. 2019.

HASHIDZUME, A. et al. Cyclodextrin. **Comprehensive Supramolecular Chemistry II**, v.1, p. 269 – 316, 2017.

- HERNÁNDEZ-LEMUS, E.; MARTÍNEZ-GARCÍA, M. Pathway-Based Drug-Repurposing Schemes in Cancer: The Role of Translational Bioinformatics. **Frontiers in Oncology**, v. 10, 14 jan. 2021.
- HOLLVILLE, E.; MARTIN, S. J. Measuring Apoptosis by Microscopy and Flow Cytometry. **Current Protocols in Immunology**, v. 112, n. 1, fev. 2016.
- HWANG, E. S.; NHO, J.-H. Lifestyle Intervention for Breast Cancer Women. **Journal of Lifestyle Medicine**, v. 9, n. 1, p. 12–14, 31 jan. 2019.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR. Controle do Câncer de Mama. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/gestor-e-profissional-de-saude/controlado-cancer-de-mama>>. Acesso em 10 de julho 2022.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR. Eu cuido da minha saúde todos os dias. E você? Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br>>. Acesso em 05 de novembro de 2022.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR. Fatores relacionados ao aumento do risco de desenvolver o câncer de mama. Rio de Janeiro: INCA 2022. Disponível em:< <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/gestor-e-profissional-de-saude/controlado-cancer-de-mama/fatores-de-risco>>. Acesso em 10 de julho de 2022.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR. Incidência. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/gestor-e-profissional-de-saude/controlado-cancer-de-mama/dados-e-numeros/incidencia#:~:text=Para%20o%20ano%20de%202022,territ%C3%B3rio%20e%20programa%C3%A7%C3%B5es%20locais.>>. Acesso em 10 de julho de 2022.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices - **Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity**. Geneva, 2009.
- JAIN, V.; GUPTA, O. P. Repositioning of drugs: Hydroxychloroquine. **J Mahatma Gandhi Inst Med Sci**, v. 20, 19 fev. 2015.
- JAN, R.; CHAUDHRY, G.-S. Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 9, n. 2, p. 205–218, 1 jun. 2019.
- JOURDAN, J. et al. Drug repositioning: a brief overview. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 72, n. 9, p. 1145–1151, 17 abr. 2020.
- KADARI, A. et al. Enhanced oral bioavailability and anticancer efficacy of fisetin by encapsulating as inclusion complex with HP β CD in polymeric nanoparticles. **Drug Delivery**, v. 24, n. 1, p. 224–232, 1 jan. 2017.
- KHALID N, AZIMPOURAN M. Necrosis. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; jan. 2022.

KHAN, H. J. et al. **Chapter 5 - Increasing opportunities of drug repurposing for treating breast cancer by the integration of molecular, histological, and systemic approaches**, p.121 – 172, jan. 2020.

KHAN, K. H.; BLANCO-CODESIDO, M.; MOLIFE, L. R. Cancer therapeutics: Targeting the apoptotic pathway. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 90, n. 3, p. 200–219, jun. 2014.

KLOSKOWSKI, T. et al. Ciprofloxacin and Levofloxacin as Potential Drugs in Genitourinary Cancer Treatment—The Effect of Dose–Response on 2D and 3D Cell Cultures. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, p. 11970, 4 nov. 2021.

KUETE, V.; KARAOSMANOĞLU, O.; SIVAS, H. Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. **Therapeutic Potential Against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases**, p. 271-297, 2017.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. Robbins e Cotran – **Patologia** – Bases Patológicas das Doenças. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

LEE, A. V.; OESTERREICH, S.; DAVIDSON, N. E. MCF-7 Cells--Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 7, p. djv073–djv073, 31 mar. 2015.

LI, Y. Y.; JONES, S. J. Drug repositioning for personalized medicine. **Genome Medicine**, v. 4, n. 3, mar. 2012.

LÜ, L. et al. Exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 26, n. 4, p. 636–44, 2012.

MAKKI, J. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. **Clinical Medicine Insights: Pathology**, v. 8, p. CPath.S31563, jan. 2015.

MALANGA, M. et al. “Back to the Future”: A New Look at Hydroxypropyl Beta-Cyclodextrins. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 9, p. 2921–2931, set. 2016.

MATHELIN, C. et al. Carcinoma ductal in situ. EMC - **Ginecología-Obstetricia**, v. 57, n. 1, p. 1–12, 1 jan. 2021.

MEHRIZI, M.; AMIRI, S.; BAHRAMI, S. H. PVA Nanofibers Containing Ofloxacin-Cyclodextrin Inclusion Complex: Improve Optical Stability of Ofloxacin. **Open Journal of Organic Polymer Materials**, v. 09, n. 02, p. 29–46, 2019.

MOHAMMAD JAFARI, R. et al. Drug Repositioning: A Review. **Journal of Iranian Medical Council**, v. 1, n. 1, p. 7–10, 1 set. 2018.

MOMENIMOVAHED, Z.; SALEHINIYA, H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, v. 11, p. 151–164, abr. 2019.

- MUKHERJEE, P.; MANDAL, E. R.; DAS, S. K. Evaluation of Antiproliferative Activity of Enoxacin on a Human Breast Cancer Cell Line. **International Journal of Human Genetics**, v. 5, n. 1, p. 57–63, mar. 2005.
- NADERER, T.; FULCHER, M. C. Targeting apoptosis pathways in infections. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 103, n. 2, p. 275–285, 26 jan. 2018.
- NIKZAD, S.; BARADARAN-GHAHFAROKHI, M.; NASRI, P. Dose-response modeling using MTT assay: a short review. **Life Science Journal**, v.11, n. 9s, p. 432 – 437, 2014.
- 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.
- ONRUST, S. V.; LAMB, H. M.; BARMAN BALFOUR, J. A. Ofloxacin. **Drugs**, v. 56, n. 5, p. 895–928, 1998.
- PAIXÃO, A. C. M. **As ciclodextrinas como uma nova abordagem terapêutica para a administração de fármacos no cólon**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia. Universidade de Coimbra, Coimbra, 2014.
- PARIS, J.-M. 1.3 Chirality in Antibacterial Agents. **Comprehensive Chirality**, v. 1, p. 30–53, 2012. Elsevier.
- PFEFFER, C. M.; SINGH, A. T. K. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 448, 2 fev. 2018.
- PRÄBST, K. et al. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. **Methods in Molecular Biology**, v. 1601, p. 1–17, 2017.
- PUND, S.; JOSHI, A. Nanoarchitectures for Neglected Tropical Protozoal Diseases: Challenges and State of the Art. **Nano- and Microscale Drug Delivery Systems**, p. 439-480, 2017.
- PUSHPAKOM, S. et al. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 18, n. 1, p. 41–58, 12 out. 2018.
- RISS, T.L. et al. Cell Viability Assays. All Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): **Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences**; 2004.
- RUAN, L. et al. Assay of Single-Cell Apoptosis by Ensemble and Single-Molecule Fluorescence Methods: Annexin-V/Polyethylene Glycol-Functionalized Quantum Dots as Probes. **Langmuir**, v. 34, n. 34, p. 10040–10047, 31 jul. 2018.
- RUDRAPAL, M.; KHAIRNAR, S. J.; JADHAV, A. G. Drug Repurposing (DR): An Emerging Approach in Drug Discovery. **Drug Repurposing**, 13 jul. 2020.
- SAHOO, B. M. et al. Drug Repurposing Strategy (DRS): Emerging Approach to Identify Potential Therapeutics for Treatment of Novel Coronavirus Infection. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 8, 26 fev. 2021.

- SAOKHAM, P. et al. Solubility of Cyclodextrins and Drug/Cyclodextrin Complexes. **Molecules**, v. 23, n. 5, p. 1161, 1 maio 2018.
- SEAY, T. M.; PERETSMAN, S. J.; DIXON, P. S. Inhibition of human transitional cell carcinoma in vitro proliferation by fluoroquinolone antibiotics. **The Journal of Urology**, v. 155, n. 2, p. 757–762, 1 fev. 1996.
- SHENG, Z. et al. Ofloxacin induces apoptosis in microencapsulated juvenile rabbit chondrocytes by caspase-8-dependent mitochondrial pathway. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 226, n. 2, p. 119–127, jan. 2008.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA CLÍNICA. Diretrizes de tratamentos oncológicos recomendados pela Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica – 2021.
- SOUZA, C. R. F.; FERRAZ-FREITAS, P. N.; OLIVEIRA, W. P. Binary, ternary and quaternary inclusion complexes containing *Lippia sidoides* essential oil. **Química Nova**, v. 39, n. 8, p. 979 – 986, 2016.
- STICK, R. V.; WILLIAMS, Spencer J. Monosaccharide Metabolism. **Carbohydrates: The Essential Molecules of Life**, [S.L.], p. 225-251, 2009. Elsevier.
- STRITTMATTER, S. M. Overcoming Drug Development Bottlenecks With Repurposing: Old drugs learn new tricks. **Nature Medicine**, v. 20, n. 6, p. 590–591, jun. 2014.
- SUN, Y.-S. et al. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. **International Journal of Biological Sciences**, v. 13, n. 11, p. 1387–1397, 1 nov. 2017.
- SYNTICHAKI, P. Death by necrosis: Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos? **EMBO Reports**, v. 3, n. 7, p. 604–609, 15 jul. 2002.
- SZEJTLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5, p. 1743-1753, 1998.
- TANG, C. et al. Traditional Tibetan Medicine in Cancer Therapy by Targeting Apoptosis Pathways. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 7 jul. 2020.
- TODD, P. A.; FAULDS, D. Ofloxacin. **Drugs**, v. 42, n. 5, p. 825–876, nov. 1991.
- TOMPKINS, K. D.; THORBURN, A. Regulation of Apoptosis by Autophagy to Enhance Cancer Therapy. **The Yale Journal of Biology and medicine**, v. 92, n. 4, p. 707–718, 20 dez. 2019.
- TUNKEL, A. R.; SCHELD, W. M. Ofloxacin. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 12, n. 9, p. 549–557, set. 1991.
- WAKS, A. G.; WINER, E. P. Breast Cancer Treatment. **JAMA**, v. 321, n. 3, p. 288, 22 jan. 2019.
- WANG, Q. et al. Liquiritin-Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin Inclusion Complex: Preparation, Characterization, Bioavailability and Antitumor Activity Evaluation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 111, n. 7, p. 2083–2092, jul. 2022.

WEINBERGER, R. Practical Capillary Electrophoresis. [s.l.] Elsevier, 2000.

WESTMAN, J.; GRINSTEIN, S.; MARQUES, P. E. Phagocytosis of Necrotic Debris at Sites of Injury and Inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 9 jan. 2020.

WONG, R. S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 30, n. 1, 26 set. 2011.

XU, X. et al. Flow Cytometry Method Analysis of Apoptosis. **Technology in Cancer Research & Treatment**, v. 14, n. 2, p. 237–241, jan. 2014.

XUE, H. et al. Review of Drug Repositioning Approaches and Resources. **International Journal of Biological Sciences**, v. 14, n. 10, p. 1232–1244, 2018.

YANUMULA, A.; CUSICK, J.K. Biochemistry, Extrinsic Pathway of Apoptosis. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; jan. 2022.

YOU, Y. et al. The suppression of apoptosis by α -herpesvirus. **Cell Death & Disease**, v. 8, n. 4, p. e2749–e2749, abr. 2017.