



Universidade de Brasília
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

NÚBIA MARIA PEREIRA DE SOUSA

Avaliação *in vitro* dos efeitos dos derivados de tetrahydroquinolina-2,5-dionas em células de câncer pancreático humano

Orientador: Prof. Dr. José Raimundo Corrêa

BRASÍLIA-2019

NÚBIA MARIA PEREIRA DE SOUSA

Avaliação *in vitro* dos efeitos dos derivados de tetrahydroquinolina-2,5-dionas em células de câncer pancreático humano

Orientador: Prof. Dr. José Raimundo Corrêa

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília para a obtenção do título de Doutor em Patologia Molecular.

NÚBIA MARIA PEREIRA DE SOUSA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS EFEITOS DOS DERIVADOS DE
TETRAHIDROQUINOLINA-2,5-DIONAS EM CÉLULAS DE CÂNCER
PANCREÁTICO HUMANO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Patologia Molecular da
Universidade de Brasília para a obtenção do
título de Doutor em Patologia Molecular.

Aprovado em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Raimundo Corrêa (Presidente)

Prof. Dra Consuelo Medeiros Rodrigues de Lima (Membro Titular)

Prof. Dr. Wagner Fontes (Membro Titular)

Prof. Dra. Heloisa D'Avila da Silva Bizarro (Membro Titular)

Prof. Dr. José Luiz Jivago de Paula Rôlo (Membro Suplente)

Dedico este trabalho ao tio HÉLIO que tanto
sofreu devido ao câncer de pâncreas.

Agradecimentos

É muito bom agradecer várias pessoas que ao longo desses anos compartilharam comigo momentos de tristeza, angústia, incerteza, cansaço, esperança e alegria.

Inicialmente ao meu imenso Deus, por ter me dado o dom da vida.

Ao orientador Prof. Dr. José Raimundo Corrêa, por me aceitar como sua aluna e pela oportunidade, confiança, paciência, compreensão, tempo disposto e orientação.

Ao Prof. Dr. Brenno Amaro da Silveira Neto, Coordenador do Laboratório de Química Medicinal e Tecnológica da Universidade de Brasília, e a aluna Haline pela síntese do composto que viabilizou a realização deste trabalho.

À minha querida família, minha mãe Eleusa, meu pai Tomaz, minha irmã Naiara, meu cunhado Fernando, ao meu marido Renato, e a minha linda Yasmin por terem me apoiado e entendido meus momentos de ausência. Amo demais vocês!

Ao tio Carlinhos, tia Carla, Doutor Flávio, vó Clemência, vó Maria, Dona Girlandes, Faiga e Adria pelas conversas e conselhos.

Agradeço imensamente à querida Bruna Guido, pois você foi essencial em todos esses anos de convivência, aprendi muito com você.

Aos amigos do Laboratório de Microscopia Eletrônica Eloísio, Ana Luísa, Barbára, Dayse, Dani, Diogo, Felipe, Guilherme, Ingrid, José, Karen, Laís, Lorena, Nabylla, Nih, Márcia, Melissa, Mirían e Yasmin.

Aos professores que permitiram o uso de equipamento e reagentes de seus laboratórios: Andrea Barretto Motoyama, Bergmann Ribeiro, Carlos André, Kelly Grace Magalhães, Marcella Lemos Brettas Carneiro, Sébastien O. Charneau, Sonia Bão, Tatsuya Nagata. Aos alunos que intermediaram o acesso aos reagentes: Alan, Igor, Márcio, Pasqua e Reynaldo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular.

À Universidade de Brasília pelo suporte e a estrutura física necessária para a realização do trabalho.

A CAPES, CNPq, FAPDF, DPP-UnB e Finatec pelo apoio financeiro.

‘A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, e sim em ter novos olhos.’

Marcel Proust, escritor francês (1871-1922)

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. O pâncreas é um órgão misto	1
Figura 2. O adenocarcinoma ductal pancreático origina-se nas células do epitélio pancreático ductal	5
Figura 3. Vias de modificações pós-traducionais mediadas pela farnesiltransferase (FTase) e geranilgeraniltransferase I (GGTase-I)	7
Figura 4. Atividade da proteína Ras	8
Figura 5: Gráfico com a porcentagem de mutações RAS associadas pra cada tipo de câncer	9
Figura 6. As mutações predominantes nas isoformas Ras	10
Figura 7. Sinalização oncogênica mediada por proteína Ras	11
Figura 8. A rede de sinalização PI3K-AKT	12
Figura 9 Fórmula estrutural da 5-fluoruracila	25
Figura 10. Fórmula estrutural da gencitabina	26
Figura 11. Fórmula estrutural da capecitabina	27
Figura 12. Fórmula estrutural dos compostos de platina	28
Figura 13. Fórmula estrutural dos taxanos	28
Figura 14. Fórmula estrutural do irinotecano hidrocloreto triidratado	30
Figura 15. Núcleo geral da tetrahydroquinolina-2,5-diona	34
Figura 16. Presença de vesículas acídicas em células CAPAN-2 e PANC-1	45
Figura 17. Efeito das TQDs sobre a viabilidade celular em células PANC-1.	47
Figura 18. Efeito das TQDs sobre a viabilidade celular em células CAPAN-2.	49
Figura 19. Efeito das TQDs sobre a viabilidade celular de HUVEC.	51
Figura 20. Alterações morfológicas em células CAPAN-2, PANC-1 e HUVEC após 72h de tratamento com TQDs	54
Figura 21. Os derivados das TQDs podem interferir com o ciclo celular	56
Figura 22 Tratamento com as TQDs induz morte celular por necrose e apoptose	58
Figura 23. TQDs inibem a proliferação de células de adenocarcinoma pancreático	59
Figura 24. Determinação dos fenótipos CD44 ⁺ /CD24 ⁺ para células CAPAN-2 e PANC-1	61

Figura 25. Efeito das TQDs selecionados na formação de colônia de células CAPAN-2	64
Figura 26. Efeito das TQDs selecionados na formação de colônia de células PANC-1	65
Figura 27: Níveis de expressão PI3K, AKT na linhagem CAPAN-2	66
Figura 28: Níveis de expressão PI3K, AKT na linhagem PANC-1	67

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Categorização dos fatores de risco em três escalas de associação com ADP	20
Tabela 2. IC ₅₀ dos compostos TQDs para células PANC-1.	48
Tabela 3. IC ₅₀ dos compostos TQDs para as células CAPAN-2	50
Tabela 4. IC ₅₀ dos compostos TQDs para as células HUVEC	52
Tabela 5. IC ₅₀ estabelecido para os compostos selecionados para linhagem celular CAPAN-2	52
Tabela 6. IC ₅₀ estabelecido para os compostos selecionados para linhagem celular PANC-1	53
Tabela 7. Porcentagem das subpopulações definidas pela combinação dos marcadores de células tronco-tumorais, CD44 e CD24, em células CAPAN-2 controle ou não tratadas	62
Tabela 8. Porcentagem das subpopulações definidas pela combinação dos marcadores de células tronco-tumorais, CD44 e CD24, em células PANC-1 controle ou não tratadas	63
Tabela 9. Compilação dos resultados	68

LISTA DE ABREVIATURAS

ADM	Metaplasia acinar-ductal
ADP	Adenocarcinoma ductal pancreático
AKT	Treonina-proteína cinase
CDKN2A	Inibidor da cinase dependente de ciclina 2A
CTTs	Células-tronco tumorais
5'-DFCR	5'-desoxi-5-fluorcitidina
5'-DFUR	5'-desoxi-5-fluoruridina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTMP	2'desoxitimidilato
DUMP	2'desoxiuridilato
FDA	Food and Drug Administration
FDUMP	Monofosfato de fluordesoxiuridina
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GDP	Difosfato de guanosina
GTP	Trifosfato de guanosina
HUVEC	Células Endoteliais da Veia Umbilical Humana
IC ₅₀	Concentração inibitória capaz de inibir e 50% o crescimento celular
IMC	Índice de massa corporal
KRAS	Proto-oncogene do vírus do sarcoma de rato Kirsten
MCRs	Reações multicomponentes (<i>multicomponent reaction</i>)

MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium
PanINs	Neoplasias intra-epiteliais pancreáticas
PBS	Tampão fosfato salino
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinase
PP	Polipeptídeo pancreático
PTMs	Modificações pós-traducionais
SFB	Soro fetal bovino
TBS	Solução salina tamponada com tris
TEM	Transição epitelial-mesenquimal
TP53	Proteína Tumoral 53
UnB	Universidade de Brasília
WHO	<i>World Health Organization</i>

ÍNDICE GERAL

RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O pâncreas	1
1.1.1 Regulação das ilhotas pancreáticas	3
1.2 Câncer de pâncreas	4
1.3 Proteínas RAS	6
1.4 Vias efetoras de RAS	10
1.5 Epidemiologia	15
1.6 Fatores de risco	16
1.7 Sinais e sintomas	21
1.8 Diagnóstico	22
1.9 Tratamento	23
1.10 Quimioterapia	24
1.10.1 Análogos das pirimidinas	24
1.10.2 Compostos de platina	27
1.10.3 Taxanos	28
1.10.4 Irinotecano	29
1.10.5 Folfirinox	30
1.11 Terapia do câncer direcionada a PI3K/AKT	31
1.12 Derivados de tetrahydroquinolina-2,5-dionas	33
2. JUSTIFICATIVA	35
3. OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo geral	35

3.2	Objetivos específicos	35
4.	MATERIAL E MÉTODOS – DESENHO EXPERIMENTAL	36
4.1	Reagente e equipamentos	36
4.2	Manutenção das linhagens celulares	37
4.3	Síntese dos derivados de tetrahydroquinolina-2,5-diona	37
4.4	Ensaio de Autofagia	38
4.5	Ensaio da viabilidade celular	38
4.6	Análise das alterações morfológicas causadas pelos tratamentos com derivados de tetrahydroquinolina-2,5-diona	39
4.7	Análise do conteúdo de DNA por marcação com iodeto de propídio (PI)	39
4.8	Caracterização da morte celular induzida por TQDs	40
4.9	Análise de proliferação celular	41
4.10	Análise da população de células-tronco tumorais	42
4.11	Análise da capacidade de formação de colônia após tratamento	42
4.12	Análise da expressão de proteínas por eletroforese em gel	43
4.13	Análise estatística	44
5.	RESULTADOS	44
5.1	Interferência das TQDs no processo autofágico	44
5.2	Análise da citotoxicidade	46
5.3	Análise da morfologia celular após tratamento com TQDs	53
5.4	Interferência do tratamento com as TQDs no ciclo celular	55
5.5	Análise do perfil de morte celular provocado por TQDs	57
5.6	Efeitos das TQDs na proliferação de células de adenocarcinoma pancreático	59
5.7	Análise de células tronco tumorais após o tratamento com TQDs	60
5.8	Efeitos das TQDs na capacidade de sobrevivência e formação de colônias	63

5.9 Análise da expressão de PI3K e AKT	66
5.10 Compilação dos resultados	68
6. DISCUSSÃO	69
7. CONCLUSÃO	74
8. PERSPECTIVAS	75
10. REFERÊNCIAS	76
11. ANEXOS	93

RESUMO

O adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) é uma neoplasia altamente agressiva, caracterizada por não apresentar sintomas precoces e ter um potencial metastático elevado, o que determina seu prognóstico muito ruim. Na maioria dos casos, o ADP é iniciado pelo mutante oncogênico KRAS e geralmente apresenta resistência inata aos agentes quimioterapêuticos convencionais. Neste trabalho, testamos seis derivados de tetrahydroquinolina-2,5-dionas (TQDs 2, 7, 9, 10, 12 e 17) que foram sintetizados por reação multicomponente (MCR), metodologia inovadora de síntese que proporciona economia de átomos. Foi realizada uma triagem *in vitro* para identificação de TQDs capazes de induzir efeitos citotóxicos nas linhagens celulares de adenocarcinoma CAPAN-2 (KRAS^{G12V} mutado) e PANC-1 (KRAS^{G12D} mutado). Dos seis compostos testados, quatro (TQDs 2, 7, 10 e 12) foram capazes de induzir efeitos citotóxicos em células de adenocarcinoma pancreático. Nas células CAPAN-2, as TQDs 2 e 10 promoveram a parada do ciclo celular na fase G1. Nas células PANC-1, as TQDs 7, 10 e 12 também promoveram a parada do ciclo na fase G1, enquanto TQD2 promoveu a parada do ciclo celular na fase G2/M. As TQDs 2, 10 e 12 provocam alteração no perfil de morte celular e inibição da proliferação celular. As TQDs 2, 10 e 12 não interferiram de maneira significativa na quantidade de células tronco tumorais (CD44⁺/CD24⁺). A TQD 7 e 10 promoveram alterações na capacidade de formação de colônia. A TQD 10 foi capaz de regular negativamente a ativação da via de sinalização PI3K/AKT em células de câncer de pâncreas. Como os compostos interferiram com eventos chaves da homeostasia clular e com isso dificultam ou impedem a progressão da vida das células pancreáticas tumorais *in vitro*, os nossos resultados se mostram encorajadores, uma vez que a classe das TQDs pode representar uma arquitetura molecular promissora para o desenvolvimento de novos fármacos para a aplicação no controle do câncer de pâncreas.

Palavras-chave: câncer, pâncreas, adenocarcinoma ductal pancreático, quimioterapia, tetrahydroquinolina-2,5-dionas.

ABSTRACT

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is a highly aggressive neoplasm characterized by not presenting early symptoms and having a high metastatic potential, which determines its very poor prognosis. In most cases, PDAC is initiated by the oncogenic mutant KRAS and generally demonstrates innate resistance to conventional chemotherapeutic agents. In this work, we tested six tetrahydroquinoline-2,5-dione derivatives (TQDs 2, 7, 9, 10, 12 and 17) that were synthesized by multicomponent reaction (MCR), an innovative synthesis methodology which lead to reduction of used atoms. An in vitro screening was performed to identify TQDs capable of inducing cytotoxic effects on CAPAN-2 (mutated KRAS^{G12V}) and PANC-1 (mutated KRAS^{G12D}) adenocarcinoma cell lines. Of the six compounds tested, four (TQDs 2, 7, 10 and 12) were able to induce cytotoxic effects on pancreatic adenocarcinoma cells. In CAPAN-2 cells, TQDs 2 and 10 promoted cell cycle arrest in the G1 phase. In PANC-1 cells, TQDs 7, 10 and 12 also promoted G1 phase arrest, while TQD 2 promoted G2/M phase arrest. TQDs 2, 10 and 12 caused alteration in cell death profile and inhibition of cell proliferation. TQDs 2, 10 and 12 did not significantly affect the amount of tumor stem cells (CD44⁺/CD24⁺). TQD 7 and 10 promoted changes in colony formation capacity. TQD 10 was able to negatively regulate PI3K/AKT signaling pathway activation in pancreatic cancer cells. Because the compounds interfered with key events that hinder or impair the in vitro live of pancreatic cancer cell, our results are encouraging, showing that the TQDs class may represent a promising molecular architecture for the development of new drugs for pancreatic cancer control.

Keywords: cancer, pancreas, pancreatic ductal adenocarcinoma, chemotherapy, tetrahydroquinoline-2,5-diones.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O pâncreas

A palavra pâncreas deriva do grego “pan”, que significa “tudo” e “creas”, que significa “carne”. Nos seres humanos é um órgão retroperitoneal que mede cerca de 12-25 cm de comprimento e pesa aproximadamente 60-170 gramas (Figura 1). É dividido em três partes: cabeça (proximal), corpo e cauda (distal). A primeira encontra-se em íntimo contato com o duodeno, enquanto a última com o hilo esplênico e flexura cólica esquerda. O canal de Winsurg é um ducto excretório, o qual acompanha toda a extensão do pâncreas. Conecta-se ao duodeno através da ampola de Vater, onde se junta ao ducto biliar. O esfíncter de Oddi, juntamente com a ampola de Vater, regula a secreção pancreática no trato gastrointestinal. O istmo corresponde ao estrangulamento do pâncreas unindo a cabeça ao corpo. O corpo se alonga da direita para a esquerda e continua-se com a cauda pancreática (KNOOP; WEINHOLD; BECKER, 2015; SLACK, 1995).

O pâncreas é composto de unidades que regulam processos importantes como a digestão de proteínas, carboidratos e homeostasia da glicose. É uma glândula mista que possui duas populações distintas de células, células exócrinas e endócrinas (BARON et al., 2016; DUNNE; HEZEL, 2015; MILLER et al., 2017).

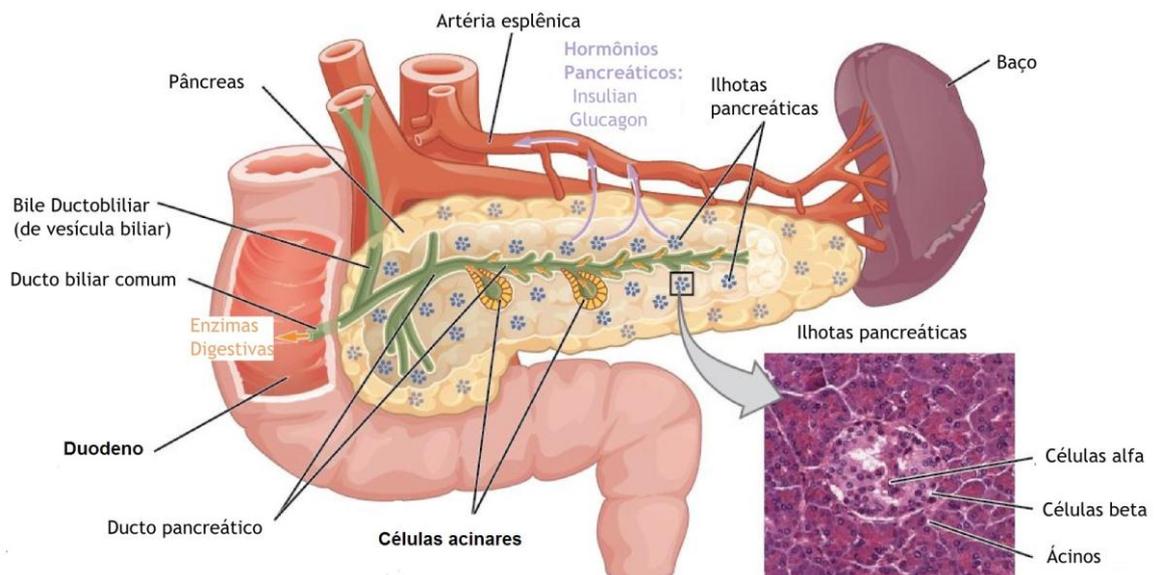


Figura 1. O pâncreas é um órgão misto. Anatomia do pâncreas e disposição das principais células que constituem o pâncreas endócrino. (Modificado de MONTENEGRO JR; CHAVES; FERNANDES, 2016).

A parte exócrina do pâncreas corresponde a 80% do órgão, sendo constituída de células acinares organizadas na forma de ácinos. As células acinares produzem e secretam várias enzimas digestivas em sua forma inativa, tais como amilases, proteases, lipases e nucleases. Estas enzimas são secretadas nos ductos pancreáticos e transportadas até o duodeno, onde são ativadas. Possui também o epitélio ductal que produz mucina e fluídos ricos em bicarbonato, úteis na neutralização do conteúdo ácido estomacal e que contribuem para a digestão dos alimentos (EDLUND, 2002; PERERA; BARDEESY, 2012; SLACK, 1995; ZHOU; MELTON, 2018). A secreção pancreática consiste em um componente aquoso o bicarbonato, e um componente enzimático oriundo das células acinares, sendo que sua liberação é regulada pela estimulação hormonal dada principalmente pela secretina, colecistocinina e gastrina e também por estímulos neurais (DOLENŠEK et al., 2017; SLACK, 1995).

A função endócrina do pâncreas é desempenhada por aglomerados de células, dispersas no tecido acinar pancreático, denominados Ilhotas de Langerhans ou pancreáticas. Foram descritas pela primeira vez em 1869, por Paul Langerhans. O pâncreas adulto normal, contém cerca de 1 milhão de ilhotas, o que constitui até 2% da massa pancreática. São distribuídas irregularmente pelo parênquima exócrino, mais densamente na região da cauda (MONTENEGRO JR; CHAVES; FERNANDES, 2016). Existem pelo menos 6 tipos de células pancreáticas descritas: α , δ , β , PP, G e ϵ .

Células α : Localizadas na periferia das ilhotas e correspondem a cerca de 15-20% das células. São responsáveis pela síntese e secreção de glucagon, glicentina, GRPP (peptídeo pancreático relacionado com glicentina), GLP 1 e GLP 2 (peptídeo tipo glucagon 1 e 2) (EDLUND, 2002; MONTENEGRO JR; CHAVES; FERNANDES, 2016).

Células β : Localizadas na parte central das ilhotas pancreáticas e correspondem a aproximadamente 70 – 80% das células. São responsáveis pela síntese e pela secreção, principalmente, da insulina e alguns polipeptídeos como amilina e peptídeo C (DUNNE; HEZEL, 2015; EDLUND, 2002; SLACK, 1995).

Células δ : Representam 5-10% das células das ilhotas pancreáticas. Produzem principalmente somatostatina, glucagon e hormônio do crescimento (EDLUND, 2002; MONTENEGRO JR; CHAVES; FERNANDES, 2016).

Células PP: Representam 1% das células das ilhotas pancreáticas, e são encontradas particularmente na região posterior da cabeça do pâncreas. São responsáveis pela síntese do polipeptídeo pancreático, que é liberado durante alimentação e outros estímulos vagais (SLACK, 1995).

Células G: Representam 1% das células das ilhotas pancreáticas e produzem gastrina (MONTENEGRO JR; CHAVES; FERNANDES, 2016).

Células ϵ : São as menos numerosas, respondendo por 0,5-1% das células das ilhotas pancreáticas e são responsáveis pela produção de grelina (MONTENEGRO JR; CHAVES; FERNANDES, 2016).

1.1.1 Regulação das ilhotas pancreáticas

O pâncreas é innervado pelos nervos parassimpático e simpático. As fibras eferentes parassimpáticas se originam do núcleo motor dorsal do nervo vago (localizado no tronco encefálico) e sinapse com as células ganglionares intrapancreáticas e ativam os neurônios pós-ganglionares. Neurotransmissores como acetilcolina e hormônios peptídicos modulam a secreção pancreática através de alterações na atividade parassimpática.

Os neurotransmissores provenientes de fibras parassimpáticas modulam a secreção hormonal das ilhotas pancreáticas. A acetilcolina estimula a liberação de insulina, glucagon e polipeptídeo pancreático. Já o polipeptídeo intestinal vasoativo é amplamente distribuído nas fibras parassimpáticas que innervam as ilhotas pancreáticas e o trato gastrointestinal. O polipeptídeo liberador de gastrina é abundante nas fibras parassimpáticas do pâncreas, sendo liberado sob estimulação vagal. Estimula a secreção de insulina, glucagon, somatostatina e polipeptídeo pancreático. Assim como a acetilcolina, age ativando a fosfolipase C, a via inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG), aumentando a concentração de cálcio intra-celular (CHANDRA; LIDDLE, 2009; ROSSI et al., 2005).

As ilhotas pancreáticas também podem sofrer ação dos neurotransmissores provenientes de fibras simpáticas como a noradrenalina, galanina e neuropeptídeo Y. A noradrenalina inibe a secreção de insulina, diminuindo a concentração de AMPc e de cálcio intra-celular e estimula a secreção do glucagon. Tanto a secreção basal de insulina quanto a secreção estimulada podem ser inibidas pela galanina, presente tanto nas fibras simpáticas que innervam as ilhotas, como no pâncreas exócrino. Já o neuropeptídeo presente tanto na porção endócrina, quanto exócrina do pâncreas, inibe a secreção de insulina basal e estimulada (BORDEN et al., 2013).

As células das ilhotas pancreáticas interagem entre si, permitindo regular e sincronizar a liberação hormonal. O mecanismo ainda não está totalmente esclarecido, porém existem algumas possibilidades, como o contato “célula-a-célula”, via

comunicações juncionais, permitindo a passagem de moléculas e íons, despolarização da membrana e propagação de estímulos. O padrão de microvasculatura da ilhota pancreática parece favorecer o fluxo sanguíneo arterial do centro à periferia e permite melhor ação da insulina nas células α e β . Pode ocorrer também uma interação parácrina devido à difusão facilitada pelo interstício (MONTENEGRO JR; CHAVES; FERNANDES, 2016).

1.2 Câncer de pâncreas

Os dois principais tipos de tumor pancreático são o adenocarcinoma (ADP) que representa aproximadamente 95 % dos casos e os tumores pancreáticos endócrinos que correspondem a menos de 5% (CONWAY et al., 2019; HIDALGO et al., 2015; ILIC; ILIC, 2016). O mau prognóstico desta neoplasia resulta da natureza silenciosa da doença que leva ao diagnóstico tardio, do seu elevado potencial metastático e da resistência à quimioterapia e radioterapia convencionais (HOSSEINI et al., 2017; PORUK; FIRPO; MULVIHILL, 2014).

O Adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) origina-se nas células do epitélio pancreático ductal em que a sua transformação leva ao desenvolvimento de lesões pré-malignas e progressão para carcinoma invasivo. A maioria dos estudos que utiliza o termo ADP tem como sinônimo adenocarcinoma de células ductais, adenocarcinoma tipo tubular, carcinoma de células ductais ou câncer de pâncreas (SAMUEL; HUDSON, 2011; SINGH et al., 2015).

As células acinares são bem conhecidas por seu alto grau de plasticidade, o que leva à regeneração do pâncreas, pois ao contrário de outros órgãos do trato gastrointestinal, o pâncreas parece não ter um compartimento definido de células tronco. Em um processo chamado metaplasia acinar-ductal (ADM), as células acinares se diferenciam para fenótipos mais epiteliais, do tipo ductal, ao receber estímulos como por exemplo, danos nos tecidos, condições inflamatórias ou de estresse (HRUBAN; FUKUSHIMA, 2007). Durante a ADM, as células acinares adquirem características semelhantes a células progenitoras que as tornam mais suscetíveis a acertos pró-oncogênicos, como a exercida pelo proto-oncogene *KRAS*, eventualmente transformando-as em neoplasias intra-epiteliais pancreáticas (PanINs), sendo presentes na maioria dos tumores ADP (> 90%). Essa transformação é geralmente considerada como o passo inicial no desenvolvimento de ADP, seguido de progressão sequencial envolvendo acertos

genéticos em vários genes supressores de tumores como mostrado na figura 2. Além disso, treonina-proteína cinase (AKT2) é frequentemente superexpressa, e a atividade de seu regulador fosfoinositida 3-cinase (PI3K) é frequentemente elevada no ADP, levando ao aumento da sobrevivência das células tumorais (ORTH et al., 2019; YU et al., 2018).

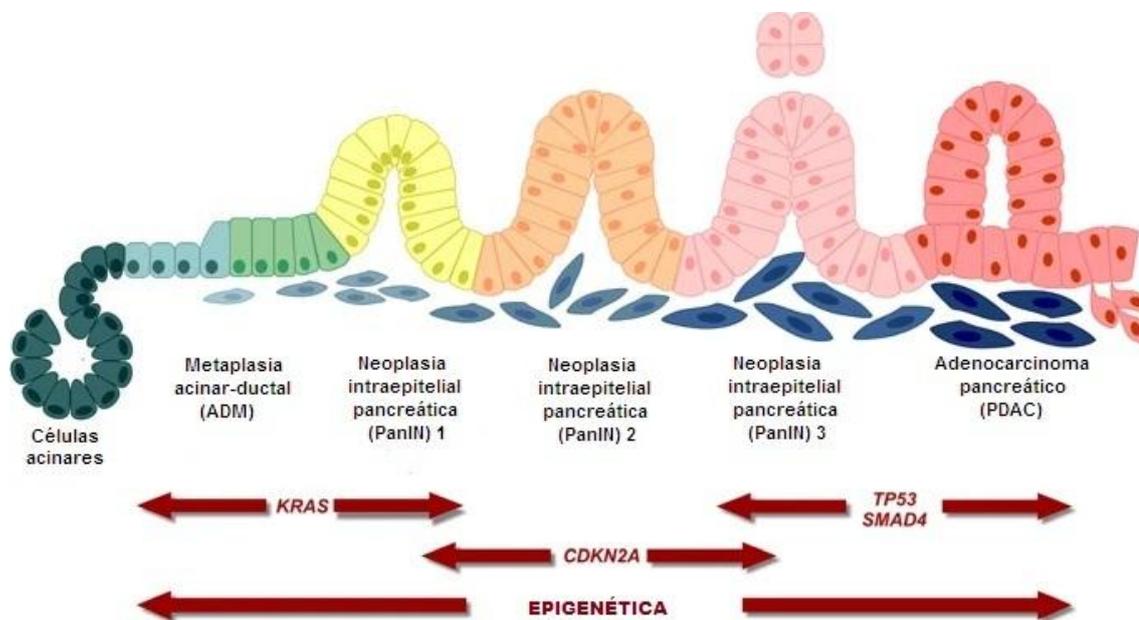


Figura 2. O adenocarcinoma ductal pancreático origina-se nas células do epitélio pancreático ductal. O KRAS constitutivamente ativo é suficiente para iniciar o desenvolvimento de neoplasia intra-epitelial pancreática (PanIN) e adenocarcinoma ductal pancreático (ADP). (Modificado de ORTH et al., 2019)

Geralmente, o adenocarcinoma pancreático surge na cabeça do pâncreas infiltrando os tecidos circundantes, incluindo vasos linfáticos, baço e cavidade peritoneal, e a metástase ocorre frequentemente no fígado e nos pulmões (VAREEDAYAH; ALKAADE; TAYLOR, 2018). Ao contrário de muitos outros tipos de câncer, a marca registrada do câncer de pâncreas é a presença de um estroma fibroso denso (desmoplasia), que é constituído por fibroblastos, células inflamatórias, pequenos vasos sanguíneos, citocinas e fatores de crescimento (AMRUTKAR; GLADHAUG, 2017). Essa quantidade excessiva de tecido cicatricial que circunda as células epiteliais malignas pode ser responsável por até 90% do volume total do tumor. O microambiente estromal formado atua como um contribuidor ativo para o crescimento e disseminação do tumor, uma vez que promove um microambiente tumoral hipóxico, ácido e impermeável

aos medicamentos, criando assim uma barreira às opções de tratamento para ação de moléculas terapêuticas (DUNNE; HEZEL, 2015; MURTHY; ATTRI; SINGH, 2018).

1.3 Proteína RAS

Aproximadamente 150 pequenas GTPases foram identificadas pertencentes à Superfamília RAS, que pode ser dividida em cinco famílias principais baseado nas diferenças de sequência, estrutura e função que são: RAS, RHO, RAN, RAB e ARF. A própria família RAS está dividida em seis subfamílias: RAS, RAL, RIT, RAP, RHEB e RAD (YAN; THEODORESCU, 2018).

As proteínas Ras pertencem à família das proteínas G com atividade intrínseca de GTPásica, que rege várias vias de sinalização celular. Ras regula vários processos celulares como expressão de genes, diferenciação, proliferação, sobrevivência celular, entrada no ciclo celular e dinâmica do citoesqueleto (AHEARN et al., 2011; BOURNE; SANDERS; MCCORMICK, 1990; GOODSSELL, 1999; RAJASEKHARAN; RAMAN, 2013).

Desde a identificação da proteína RAS na década de 1960, numerosos estudos foram realizados para elucidar o mecanismo de atividade, a regulação, o tráfego intracelular e as vias regulatórias (VASAN; BOYER; HERBST, 2014). As modificações pós-traducionais (PTMs) a que a proteína Ras é submetida permitem o seu correto dobramento, localização adequada, sinalização, senescência e degradação. Assim, as proteínas Ras podem sofrer PTMs de diversas maneiras, incluindo farnesilação, geranilgeranilação, proteólise, metilação, palmitoilação, isomerização, fosforilação, nitrosilação e ubiquitinação (AHEARN et al., 2011).

A proteína RAS termina numa sequência CAAX, em que C é uma cisteína, A é normalmente um aminoácido alifático e X representa qualquer aminoácido (AHEARN et al., 2011; NGUYEN; GOODY; ALEXANDROV, 2010). A farnesiltransferase (FTase) e geranilgeraniltransferase tipo I (GGTase-I) reconhecem a sequência CAAX, promovem a ligação dos grupos farnesilo e geranilgeranilo à proteína, respectivamente. Sendo que, o resíduo X é que determina se ocorrerá a farnesilação ou geranilgeranilação da proteína com a terminação CAAX. Se o resíduo X for uma serina, metionina ou glutamina, a proteína será substrato preferencialmente de uma FTase; mas se X for leucina ou fenilalanina, o substrato será ativado preferencialmente por GGTase-I (FU et al., 1996; SEABRA et al., 1991). A FTase catalisa a adição de um grupo farnesilo à proteína RAS

que é constituído de 15 carbonos, já GGTase-I adiciona um grupo geranylgeranilo formado por 20 carbonos (AHEARN et al., 2011; WALKER; OLSON, 2005).

A Ras para exercer sua atividade na transdução de sinais deve estar localizada na região citoplasmática aderida à membrana celular para ser ativada, de onde medeia sinais externos para o núcleo. Assim, a Ras presente no citosol irá passar pela ação catalítica da FTase ou GGTase-I, para que lhe seja adicionado um grupo isoprenóide farnesilo ou geranylgeranilo (Figura 3), respectivamente, à cisteína do resíduo CAAX. O complexo CAAX-proteína-isoprenóide formado fica ligado à superfície do retículo endoplasmático e será clivado pela enzima conversora de Ras (Rce1), promovendo a remoção dos resíduos AAX. Em seguida, o resíduo de cisteína é metilado por isoprenilcisteína metiltransferase (Icmt). Em seguida a Palmitoil CoA adiciona grupos de cadeia longa à cisteína, o que aumenta a hidrofobicidade da Ras, favorecendo sua interação com a membrana. O complexo é transportado para membrana plasmática pela palmitoil transferase (COX; DER, 2002; SHEN et al., 2015).

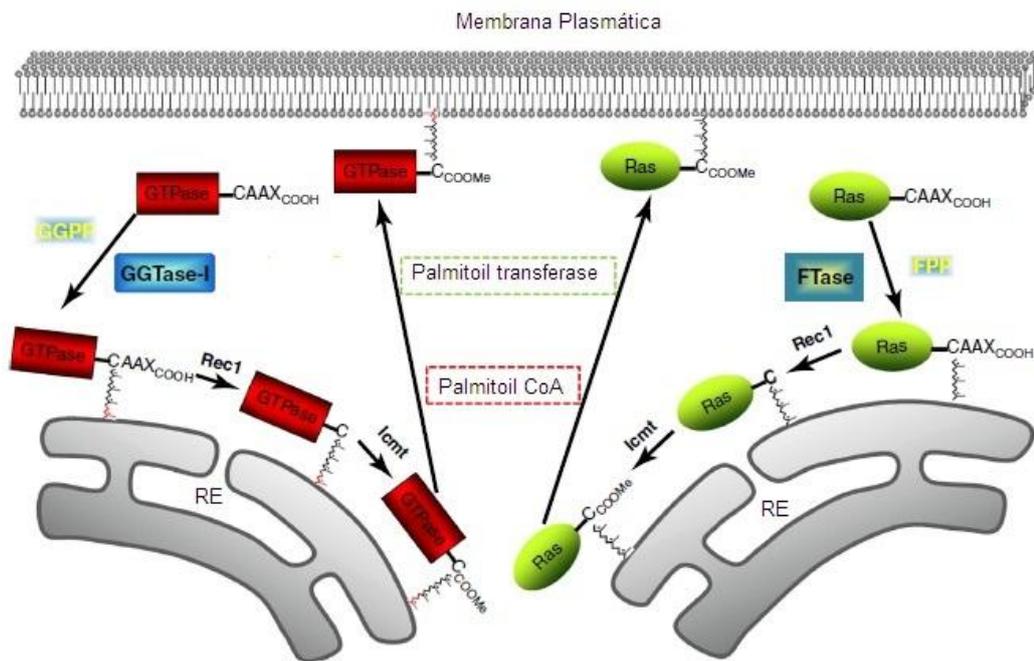


Figura 3. Vias de modificações pós-traducionais mediadas pela farnesiltransferase (FTase) e geranylgeraniltransferase I (GGTase-I). Enzima conversora de Ras (Rec1), Isoprenilcisteína metiltransferase (Icmt), Retículo endoplasmático (RE). (modificado SHEN et al., 2015)

RAS recebe um sinal estimulatório, que substitue o difosfato de guanosina (GDP) a ela associado por trifosfato de guanosina (GTP); esse processo é catalisado por fatores de troca de nucleotídeo de guanina (GEFs) presentes no citoplasma das células. A RAS se encontra no estado “ativado” quando ligada à GTP, nesta condição se torna ativa e capaz de se ligar a numerosas proteínas parceiras, denominadas “efetoras”, nas quais as interações ras-efetor induzem a uma cascata de sinalizações. A hidrólise de GTP é mediada pela sua interação com proteínas ativadoras de guanina (GAPS), também presentes no citoplasma das células, que conduzem a proteína ao seu estado “inativado” através da desfosforilação da molécula de GTP, deixando a RAS ligada a GDP (Figura 4 a). Se as interações com GEFs ou GAPs não forem adequadamente controladas, isto pode aumentar os níveis de proteínas Ras na condição “ativada” conduzindo à hiperatividade da proteína Ras (Figura 4 b) o que desencadeia a sinalização oncogênica (CHANDRASHEKAR; ADAMS, 2013; GOODSSELL, 1999; RAJASEKHARAN; RAMAN, 2013; VASAN; BOYER; HERBST, 2014). Mutações pontuais podem bloquear proteína RAS no seu estado ativo, o que leva a uma sinalização celular aberrante mesmo na ausência de sinais externos, o que leva ao desenvolvimento do câncer. (RAJASEKHARAN; RAMAN, 2013).

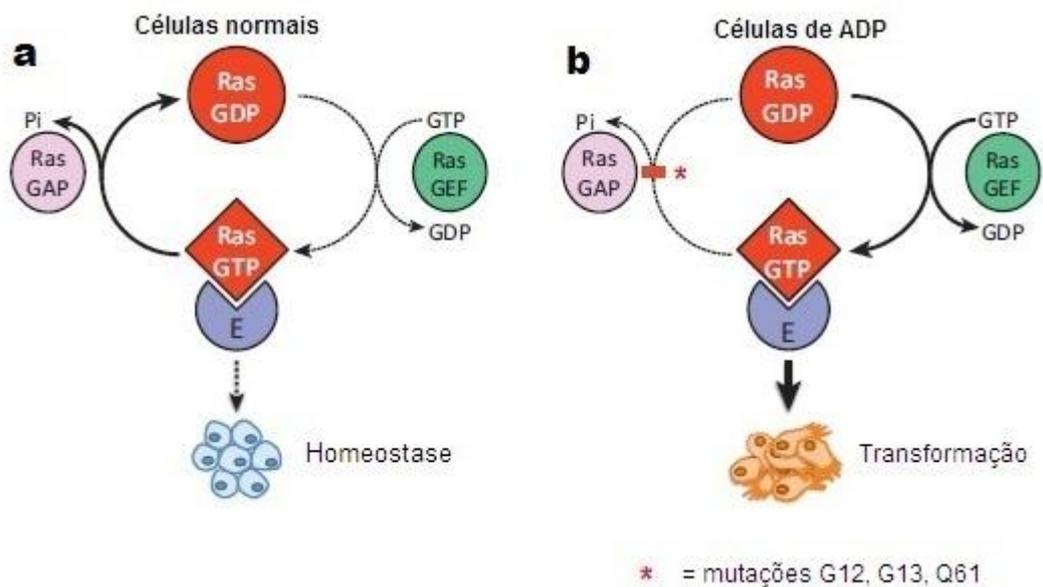


Figura 4. Atividade da proteína Ras. a- Sinalização de Ras normal. b- Sinalização de Ras oncogênica. As mutações de Ras as mantêm retidas no seu estado ativado ligada à GTP ativada e a célula recebe continuamente sinais proliferativos. Fatores de troca de

nucleotídeo de guanina (GEF), Proteína ativadora de guanina (GAP), difosfato de guanosina (GDP), trifosfato de guanosina (GTP), (modificado BRYANT et al., 2014).

O genoma humano possui três genes que codificam quatro isoformas da proteína RAS: HRAS, KRAS4a, KRAS4b e NRAS (MITIN; ROSSMAN; DER, 2005; WENNERBERG; ROSSMAN; DER, 2005). O domínio catalítico, também referido como o domínio G, é altamente homólogo entre três proteínas RAS, a K-Ras, H-Ras e N-Ras. Os primeiros 80 aminoácidos são idênticos, e os subsequentes 85 aminoácidos diferem em apenas 5 % (GYSIN et al., 2011).

De modo geral, para adquirir malignidade as células cancerígenas passam por uma série de mutações genéticas sequenciais (XIAO et al., 2014). Os genes com potencial tumorigênico primeiramente identificados foram H-ras (Harvey) e K-ras (Kirsten) os quais foram identificados em vírus relacionados ao sarcoma em ratos (DOWNWARD, 2003). Estudos posteriores identificaram um terceiro gene, o N-ras relatado pela primeira vez em células de neuroblastoma humano (RAJASEKHARAN; RAMAN, 2013). Em termos de distribuição de mutações Ras no câncer (Figura 5), a mutação Kras representa 85%, Nras 12%, Hras 3%. As mutações Kras são mais comuns no câncer de pâncreas (90% forma predominante), do cólon, trato biliar e do pulmão. Já Nras são mais comuns no câncer de pele e sistema hematopoiético. As alterações de Hras são as mais comuns no câncer de cabeça, pescoço e trato urinário (VASAN; BOYER; HERBST, 2014).

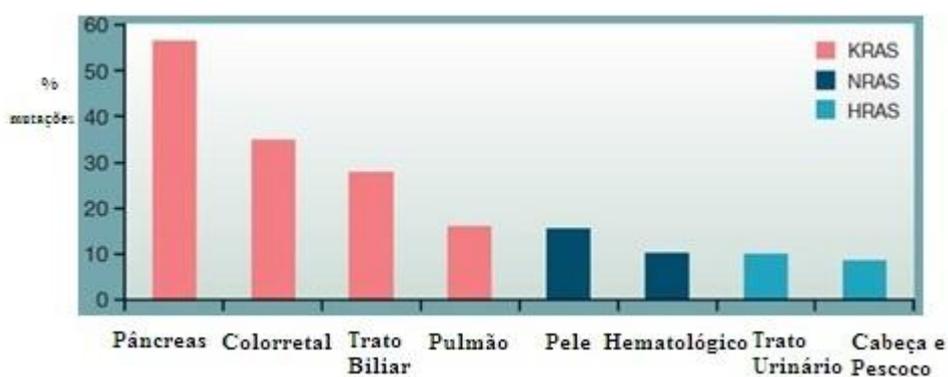


Figura 5: Gráfico com a porcentagem de mutações RAS associadas pra cada tipo de câncer (VASAN; BOYER; HERBST, 2014).

Entre as isoformas de Ras (Figura 6), as mutações mais comuns estão nos resíduos G12, G13 e Q61. Mutantes G12 e G13 dificultam a ligação de Ras ao GAPs, já mutante Q61 impede a coordenação de uma molécula de água necessária para a hidrólise de GTP,

o que resulta em Ras-GTP que é seu estado “ligado” (SCHEIDIG; BURMESTER; GOODY, 1999; VASAN; BOYER; HERBST, 2014). No câncer de pâncreas as mutações mais comuns de Kras são G12D, G12V e G12R. Ao contrário de Hras e Nras, as mutações Q61 em Kras são muito raras (BRYANT et al., 2014; PYLAYEVA-GUPTA; GRABOCKA; BAR-SAGI, 2011)

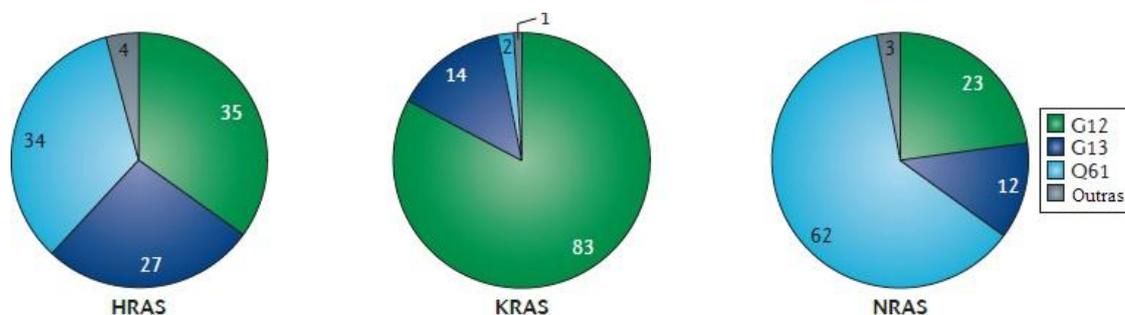


Figura 6. As mutações predominantes nas isoformas Ras (modificado de (COX et al., 2014).

A sinalização desregulada de Ras leva à progressão oncogênica por promover desajustes no ciclo celular, na proliferação, na diferenciação celular, na motilidade, alterações no processo apoptótico e no metabolismo celular, modificações no microambiente, evasão da resposta imune, aumento da angiogênese e metastáse (BRYANT et al., 2014; COX; DER, 2003; DOWNWARD, 2003; SHIELDS et al., 2000; VASAN; BOYER; HERBST, 2014).

1.4 Vias efetoras de RAS

As vias de sinalização são importantes para manter as funções biológicas de todos os subtipos celulares, dentro de um organismo, operando tanto em células saudáveis quanto em células cancerígenas. A desregulação das redes celulares interconectadas resulta em várias doenças, incluindo o câncer. A sinalização celular aberrante também regula outras características moleculares do câncer, como a evasão de supressores de crescimento, a resistência à morte celular, a replicação desregulada, angiogênese, o metabolismo do tumor, a modulação imunológica, a perda de adesão ao tecido de origem e ativação da migração celular, tais características resultam na colonização de locais restrito do tecido a outros tipos celulares, a invasão de vasos sanguíneos e linfáticos, dispersão pelo organismo e colonização de regiões distantes do tumor primário o que é

caracterizado como metástase (CREIXELL et al., 2015; FOUAD; AANEI, 2017; HANAHAN; WEINBERG, 2011; MURTHY; ATTRI; SINGH, 2018).

Acredita-se que a sinalização oncogênica do KRAS no ADP passe por três vias efetoras altamente complexas: Raf/Mek/Erk; PI3K/ Pdk1/AKT e a via do fator de troca de nucleotídeos da guanina Ral que são mostradas na figura 7. A ativação aberrante dessas vias promove a sobrevivência celular e crescimento e proliferação ilimitados, impulsionando a carcinogênese (CAO et al., 2019).

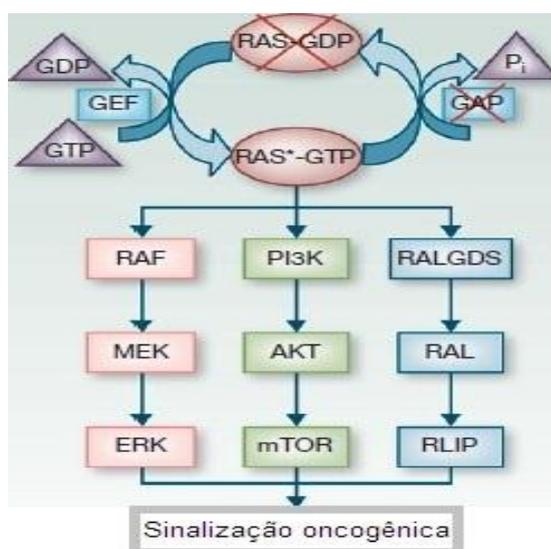


Figura 7. Sinalização oncogênica mediada por proteína Ras. (MEK) cinase da proteína cinase regulada por sinal extracelular, (ERK) cinase regulada por sinal extracelular, (PI3K) fosfatidilinositol 3-cinase, (AKT) Treonina-proteína cinase, (mTOR) alvo da rapamicina em mamífero (RALGDS), Estimulador de dissociação de nucleotídeos de guanina Ral, (RLIP) Proteína 1 de ligação a RalA (VASAN; BOYER; HERBST, 2014).

Aproximadamente 60% de todos os pacientes com ADP apresentam desregulação na via de sinalização PI3K / AKT (Figura 8), devido à modulação da sinalização de K-Ras mutante. A atividade da fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) é importante para a proliferação celular, apoptose, migração, metabolismo, síntese de proteínas, rearranjo do citoesqueleto e resposta a fatores de crescimento e transformação celular. Além disso, demonstrou-se que cerca de 4% dos casos de tumores ADP apresentam mutação no gene PIK3CA. Além do K-Ras, o PI3K pode ser ativado por uma variedade de mutações

oncogênicas e receptores de fatores de crescimento presentes na superfície das células cancerígenas. O PI3K regula diversas cascatas de sinalização como: mTOR, fator nuclear kB (NF-κB), glicogênio sintase cinase beta 3 (GSK3β), vias p27 e Bad-Bax, entre outras (ESER et al., 2014; FOUAD; AANEI, 2017; LI et al., 2018; MURTHY; ATTRI; SINGH, 2018).

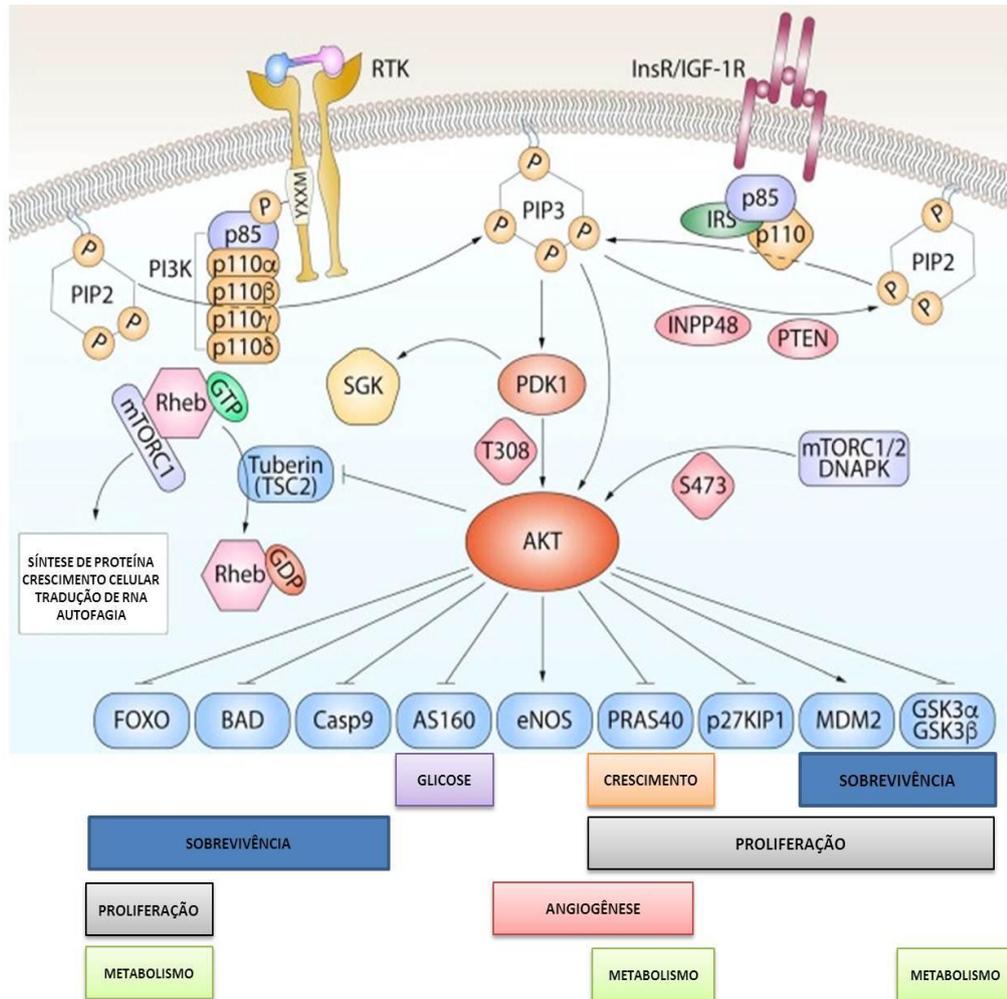


Figura 8. A rede de sinalização PI3K-AKT. Esquemáticamente, fatores de crescimento, citocinas ou quimiocinas podem estimular a ativação tirosina cinases receptoras (RTK). Isso permite a ativação de intermediários importantes de sinalização capazes de ativar PI3K. Essas cinases catalisam a conversão de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) em fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato (PIP3), que são capazes de recrutar proteínas contendo o domínio da homologia da pleckstrina (PH), como AKT, complexo mTOR 2 (mTORC2) e cinase 1 dependente de fosfoinositida (PDK1); a interação de PDK1 ou mTORC2 com AKT pode desencadear sua ativação. Finalmente, o AKT ativa o complexo mTOR 1 (mTORC1), que promove o crescimento celular e síntese de proteínas. AKT fosforila

uma série de proteínas celulares incluindo GSK3 α , GSK3 β , fatores de transcrição FOXO, MDM2, BAD e p27KIP1 para facilitar a sobrevivência e a entrada no ciclo celular. Além disso, o AKT fosforila e inativa Tuberina, uma proteína ativadora de GTPase (GAP) para o homólogo de Ras, Rheb. Inativação de Tuberina permite que o Rheb ligado ao GTP acumule e ative o complexo mTOR /mTORC1, que regula a síntese de proteínas, tradução de RNA, crescimento celular e autofagia. Modificado (O'DONNELL et al., 2018).

A família de lipídios-cinases denominadas fosfatidilinositol 3-cinase foi identificada em meados da década de 1980, cuja atividade é a transformação do grupo 3'-OH do anel inositol em fosfatidilinositóis (PI) (VANHAESEBROECK et al., 2010). As PI3Ks foram classificadas em quatro grupos que são expressos na maioria das linhagens celulares de câncer de pâncreas (CAO et al., 2019; MURTHY; ATTRI; SINGH, 2018):

-PI3K I é dividida em IA e IB, e foram amplamente estudadas, sendo implicadas no câncer de pâncreas. A PI3K IA é composta por três isoformas da subunidade catalítica conhecida como p110 α , p110 β e p110 δ , sendo ativada pelo receptor tirosina cinase (RTK). Já a classe IB abrange apenas p110 γ sendo ativada pelos receptores acoplados à proteína G. A cascata de sinalização PI3K é ativada por estimulação de RTKs, o que resulta no recrutamento de PI3Ks, que impulsiona PIP₂ gerando fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃). O segundo mensageiro PIP₃ resultante recruta ainda proteínas de sinalização para a membrana celular. Uma dessas proteínas é a serina / treonina cinase, cinase dependente de fosfoinositida 1 (PDK1), que é um ativador conhecido da AKT (BAER et al., 2015) .

-PI3K II é composta por PI3KC2 α , β e γ . PI3KC2 interage com proteínas adaptadoras que controlam etapas distintas dos processos de tráfego vesicular, como endocitose e reciclagem de vesículas, sua região terminal C se liga a membranas contendo PIP₂ , permitindo o recrutamento de PI3KC2 α pela membrana (MURTHY; ATTRI; SINGH, 2018).

-PI3K III, possui uma única subunidade catalítica chamada Vps34, catalisa a síntese de fosfatidilinositóis (PtdIns) em membranas intracelulares distintas e desempenha um papel crítico na regulação de proteínas, formação de autofagossomos, maturação endossomo-lisossomo e citocinese (MURTHY; ATTRI; SINGH, 2018).

-PI3K IV são proteínas cinases Ser / Thr, incluindo ataxia telangiectasia mutada (ATM), telangiectasia de ataxia e proteína dependente de DNA relacionada a Rad3 e mTOR (CAO et al., 2019).

O AKT, também chamado de proteína cinase B (PKB), pertence à família AGC cinase, e é um mediador primário da via de sinalização PI3K. Inicialmente foi identificada como um regulador da sinalização do receptor de insulina. A família AKT cinase inclui AKT1, AKT2 e AKT3, que apresentam homologia estrutural, mas possuem características distintas. AKT é composta pelos três domínios a seguir: (1) um domínio PH de homologia de pleckstrina N-terminal, (2) um domínio de extensão C-terminal (EXT) contendo um motivo hidrofóbico regulador (HM) e (3) um catalisador de cinase central domínio da subunidade (CAT) (CHENG et al., 2005). Após a ativação do PI3K, AKT é recrutado para a membrana plasmática através da interação do domínio de homologia da pleckstrina com lipídios da membrana. A AKT recrutada é fosforilada por PDK1 nos resíduos Thr308 e por mTORC2 em Ser473 (MURTHY; ATTRI; SINGH, 2018). A AKT ativada é translocada para o núcleo e medeia a ativação e inibição de vários alvos, resultando em sobrevivência celular e crescimento e proliferação celular (MEIER et al., 2005).

A via Ras-MAPK vem sendo identificada em uma variedade de células e tecidos cancerosos, em que defeitos em H-ras, K-ras e N-ras são frequentemente detectados, e são conhecidos por desequilibrar essas vias de sinalização, levando ao desenvolvimento de tumores (FERNÁNDEZ-MEDARDE; SANTOS, 2011; GYSIN et al., 2011; RAJASEKHARAN; RAMAN, 2013; TAKAI; SASAKI; MATOZAKI, 2001). As proteínas ERK estão envolvidas em respostas celulares a fatores de crescimento e outros mitógenos e exercem ações regulatórias sobre mecanismos de proliferação e diferenciação (THOMAS; HUGANIR, 2004). A via de sinalização ERK é iniciada por diversos estímulos extracelulares, capazes de ativar receptores tirosina cinase (RTK), que através de uma proteína adaptadora, como Grb2/SOS pode ativar Ras, uma proteína G. Ras recruta Raf (MAP3K), uma serina-treonina cinase, que ativa MEK (cinase da proteína cinase regulada por sinal extracelular), uma MAP2K, que fosforila ERK num resíduo de treonina e tirosina, ativando-a (KIM; CHOI, 2010).

Na última década a via de sinalização RALGDS-RAL surgiu como um terceiro importante eixo efetor de sinalização da RAS. O gene RAL foi identificado inicialmente em 1986, sendo importante em várias atividades celulares, incluindo, glicólise, autofagia,

secreção, manutenção da polaridade, apoptose e transcrição. Já os genes RALA e RALB humanos foram identificados três anos depois (YAN; THEODORESCU, 2018). RALA e RALB, apesar de compartilharem 82% de semelhança entre si no nível de aminoácidos, estão associados a funções biológicas distintas especialmente no câncer humano. O RALA é importante para o crescimento do tumor, enquanto o RALB é importante para a metástase e invasão do tumor (GUIN; THEODORESCU, 2015).

1.5 Epidemiologia

O câncer de pâncreas é uma das mais letais neoplasias, sendo considerada a quarta principal causa de mortes relacionadas ao câncer em todo o mundo (ORTH et al., 2019). É considerado o décimo primeiro câncer mais comum, no entanto, a maior incidência e mortalidade ocorrem em países desenvolvidos. Tipicamente após o diagnóstico, apenas 24% das pessoas sobrevivem 1 ano e de 2014 a 2018 a taxa de sobrevivência de 5 anos para o câncer de pâncreas aumentou de 6% para 9%, o que mostra avanços no conhecimento dos potenciais fatores de risco e em ferramentas para diagnóstico precoce (CHITTIBOYINA et al., 2018; ILIC; ILIC, 2016; RAWLA; SUNKARA; GADUPUTI, 2019).

Segundo GLOBOCAN 2018, o câncer pancreático causou 432.242 novas mortes (4,5% de todas as mortes causadas por câncer), sendo que 458.918 novos casos de câncer foram relatados em 2018 (representando 2,5% de todos os cânceres). Estima-se uma tendência no aumento da incidência de câncer pancreático e mortalidade de 2018 a 2040 (BRAY et al., 2018).

A taxa de mortalidade do câncer de pâncreas em homens e mulheres aumenta com a idade, e quase 90% de todas as mortes ocorrem após os 55 anos de idade. Em 2018, foram relatados mundialmente 243.033 casos em homens e 215.885 em mulheres. Na última década, foi observada uma tendência para o aumento da incidência e das taxas de mortalidade de câncer pancreático, independentemente do sexo (BRAY et al., 2018; RAWLA; SUNKARA; GADUPUTI, 2019a).

O câncer de pâncreas é responsável por cerca de 3% de todos os cânceres nos EUA e cerca de 7% de todas as mortes por câncer. As estimativas para o câncer de pâncreas nos Estados Unidos para 2019 são: aproximadamente 56.770 pessoas (29.940 homens e 26.830 mulheres) serão diagnosticadas com câncer de pâncreas e cerca de 45.750 pessoas (23.800 homens e 21.950 mulheres) morrerão de câncer de pâncreas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

No Brasil, o câncer de pâncreas é responsável por cerca de 2% de todos os tipos de câncer diagnosticados e por 4% do total de mortes por câncer. Não dispomos de publicações atualizadas sobre a ocorrência do câncer de pâncreas, uma vez que as taxas de incidência desse tumor registradas pelo INCA não são publicadas junto à estimativa anual das neoplasias mais frequentes no país. Em 2015 o número de mortes causadas por câncer de pâncreas foi de 9.464, sendo 4.654 homens e 4.808 mulheres (INCA, 2018).

1.6 Fatores de risco

A identificação dos fatores de risco é essencial para a prevenção da doença, uma vez que alguns fatores podem ser potencialmente modificados (ILIC; ILIC, 2016). Atualmente, as causas do câncer de pâncreas são insuficientemente conhecidas, embora alguns fatores tenham sido identificados, entre eles estão incluídos: idade avançada, sexo, raça, obesidade, diabetes, tabagismo, história familiar, etilismo, dieta, pancreatite, inatividade física, doenças familiares hereditárias, etnia e atividade ocupacional. Também foram identificadas associações entre câncer de pâncreas com o vírus da imunodeficiência humana, vírus da hepatite B, grupo sanguíneo ABO, e *Helicobacter pylori* (ARDENGH; COELHO; OSVALDT, 2008; YEO, 2015).

A idade avançada é um fator de risco importante para o desenvolvimento da maioria dos tipos de câncer, principalmente do adenocarcinoma pancreático (BOSETTI et al., 2012). O predomínio da ocorrência deste tipo de câncer é entre as idades de 40 a 80 anos, sendo que em média o diagnóstico do câncer pancreático se dá aos 71 anos. Em apenas 0,1% dos casos são encontrados em indivíduos com menos de 20 anos de idade, cerca de menos de 3% dos casos são diagnosticados em pessoas com menos de 44 anos e 54% dos casos são encontrados entre pessoas dentro da faixa etária 65 e 84 anos (ORTH et al., 2019; YEO; LOWENFELS, 2012).

O sexo masculino é ligeiramente mais propenso a desenvolver câncer pancreático quando comparado ao sexo feminino. Isto pode dever-se, pelo menos em parte, pela taxa de tabagismo mais alta nos homens do que nas mulheres (MAISONNEUVE; LOWENFELS, 2010). Um estudo de coorte realizado por Andersson et al. relata no entanto, que a taxa de incidência de câncer de pâncreas não diferiu significativamente entre homens e mulheres, o que confirma a taxa de incidência contemporânea igual de câncer de pâncreas entre os sexos (ANDERSSON et al., 2016).

Negros com câncer de pâncreas têm um prognóstico geral pior quando comparado aos brancos, estágio por estágio, com maior taxa de incidência e mortalidade, e ainda estão mais sujeitos a ficarem de fora de coberturas de estratégias de tratamento atualmente disponíveis. Durante décadas, a taxa de incidência de câncer de pâncreas entre os negros foi 30% a 70% maior do que em outros grupos raciais nos Estados Unidos e a taxa de sobrevivência em 5 anos é de aproximadamente 5%. Diabetes e obesidade foram identificados como fatores potencialmente predisponentes ao câncer de pâncreas e ambos são mais comuns entre os negros (RAWLA; SUNKARA; GADUPUTI, 2019). O tabagismo continua a ser um dos fatores de risco mais importantes para o câncer de pâncreas e as taxas de tabagismo são mais altas entre os negros do que em outros grupos raciais. Há também evidências sobre diferenças raciais nas alterações de metilação do DNA no tecido normal e durante a oncogênese, incluindo o desenvolvimento de câncer de pâncreas (SCARTON et al., 2018). Além disso os negros possuem 2-3 vezes maior risco de desenvolver pancreatite do que os brancos (YADAV; MUDDANA; O'CONNELL, 2012).

A obesidade é um fator de risco para vários tipos de câncer, incluindo câncer de pâncreas (YADAV; LOWENFELS, 2013). O excesso de índice de massa corporal (IMC) representa o segundo fator de risco mais associado ao ADP com um aumento na morte por câncer de mais de 20 a 40% (CASCETTA et al., 2018). O índice de massa corporal de pelo menos 30 Kg/m² foi associado com um risco maior de desenvolver câncer pancreático comparado com um IMC inferior a 23 Kg/m² (DE GONZALEZ; SWEETLAND; SPENCER, 2003; LARSSON et al., 2005). Nos Estados Unidos cerca de 16,9% de todos os casos de ADP são estimados como atribuíveis ao excesso de peso corporal. Além de promover a tumorigênese, a obesidade também pode complicar o tratamento de câncer já estabelecido, não apenas alterando a farmacocinética e a farmacodinâmica dos medicamentos administrados, mas também modulando o microambiente tumoral (CHANG; EIBL, 2019). Com base nas evidências acumuladas, a via de sinalização PI3K/AKT é necessária para o metabolismo normal devido às suas características, e seu desequilíbrio leva ao desenvolvimento de obesidade e diabetes mellitus tipo 2 (CANTLEY, 2018; HUANG et al., 2018).

O tabagismo aumenta o risco de câncer de pâncreas em pacientes com pancreatite hereditária de 54 vezes para 154 vezes em comparação com a população de não fumantes (LOWENFELS et al., 2001). A fumaça do cigarro contém uma mistura complexa de mais

de 4000 compostos que apresentam efeitos cancerígenos, que influenciam nos aspectos da biologia do tumor, incluindo iniciação, progressão e metástase por meio de mutações, inflamação e imunossupressão. A exposição à fumaça pode aumentar a expressão dos fatores de crescimento, levando a uma progressão mais rápida do ADP. Nos Estados Unidos cerca de 10,2 % de todos os casos de ADP são devido ao tabagismo (CHANG; EIBL, 2019). O câncer de pâncreas pode desenvolver em média 20 anos antes em fumantes do que em não fumantes (BRAND et al., 2007).

Apesar de pacientes que nunca consumiram álcool poderem desenvolver pancreatite, o álcool parece aumentar a sensibilidade do pâncreas às lesões por outros fatores (PANDOL et al., 2011). A ingestão crônica de álcool pode causar comprometimento estrutural e funcional no pâncreas. Essas alterações levam ao contato avançado entre a catepsina B (enzima lisossômica que ativa o tripsinogênio) e as enzimas digestivas, resultando em ativação intracelular prematura das enzimas digestivas e lesão autodigestora no pâncreas (ZHANG et al., 2017). O alto consumo de álcool (mais de três doses por dia) aumenta o risco de câncer de pâncreas (CAMARA et al., 2016).

Fatores alimentares têm impacto de 30 a 50% no câncer de pâncreas, e há evidências de que certos alimentos estão associados a um risco maior, enquanto outros são até protetores (RAWLA; SUNKARA; GADUPUTI, 2019). O consumo de carnes vermelhas (especialmente quando cozidas em alta temperatura), carnes processadas, colesterol, frituras e outros alimentos contendo nitrosaminas pode aumentar o risco de câncer de pâncreas. Em um estudo de coorte multiétnico foi mostrado que o consumo de carne vermelha processada foi associado a um risco aumentado de câncer de pâncreas (PANG et al., 2019). As substâncias cancerígenas relacionadas com os métodos de preparação da carne podem ser responsáveis pela associação com o surgimento do câncer de pâncreas (NÖTHLINGS et al., 2005). Os resultados de uma metanálise que incluiu 11 estudos de controle de casos mostraram que a ingestão de carne vermelha aumentou o risco de câncer de pâncreas em cerca de 48%. Por outro lado, o alto consumo de vegetais e frutas, especialmente os enriquecidos com antioxidantes, tem ação protetora, diminuindo o risco do desenvolvimento do adenocarcinoma pancreático (PALUSZKIEWICZ et al., 2012).

Ran e colaboradores (2016) realizaram uma metanálise de atualização de estudos de coorte para verificar a associação entre o consumo de café e o risco de câncer de pâncreas e concluíram que alto consumo de café está associado a um risco reduzido de câncer pancreático (RAN; WANG; SUN, 2016). Já um estudo de meta-

análise mostrou que o consumo de café está relacionado com o risco crescente de câncer de pâncreas de maneira dose-resposta (LI et al., 2019b). No câncer de pâncreas exócrino, o gene K-ras pode ser ativado com menor frequência entre os bebedores de café não regulares do que entre os bebedores regulares. Assim a cafeína ou outros compostos do café parecem modular a ativação de K-ras (PORTA et al., 1999, 2009). A associação entre o consumo de café e o risco de câncer de pâncreas tem sido extensivamente estudada; no entanto, não há conclusão consistente, sendo necessários mais estudos. Dieta rica em flavonoides, ômega-3, vitamina D, frutas e legumes parecem proteger células acinares, reduzindo o risco de câncer pancreático (BARONE et al., 2016).

A proporção global de câncer de pâncreas que pode ser atribuída à fatores de risco ocupacional não excede 5% (LOWENFELS; MAISONNEUVE, 2003). Em uma revisão publicada em 2012, Andreotti e Silverman descreveram associações positivas em que a exposição à compostos organoclorados presentes em pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, metais pesados, nitrosaminas e radiações ionizantes estão envolvidos na fase de iniciação do câncer de pâncreas. Assim, é consenso que os compostos organoclorados e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos são os principais agentes ligados a exposição ocupacional e ao risco do desenvolvimento do câncer de pâncreas (ANDREOTTI; SILVERMAN, 2012; BARONE et al., 2016). Os agricultores, os trabalhadores de manutenção predial e da indústria de petróleo são os grupos com maior exposição à substâncias que aumentam o risco de desenvolver esta doença (INCA 2018).

A susceptibilidade ao câncer de pâncreas pode estar associada ainda ao tipo sanguíneo. Indivíduos com grupo A, AB ou B estão no grupo de maior probabilidade de desenvolver carcinoma pancreático em comparação com indivíduos com o tipo sanguíneo O (BARONE et al., 2016; RAWLA; SUNKARA; GADUPUTI, 2019).

O câncer de pâncreas é comumente associado a mutações ativadoras no oncogene *KRAS* (mutada em mais de 90% de todos os casos de ADP) (ORTH et al., 2019). Para um subgrupo de aproximadamente 10% de todos os pacientes com ADP, as predisposições genéticas representam um fator de risco, como mutações na linha germinativa nos genes *BRCA1/2*, *PALB2*, *ATM*, *MLH1*, *MSH2*, *TP53*, *SMAD4* e *CDKN2A / p16*, *PRSS1* e *STK11* (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019). Por outro lado, as alterações na metilação do DNA dos genes *FAM150A*,

ONECUT1 e RASSF10 estão fortemente associadas à progressão do câncer de pâncreas (SCARTON et al., 2018).

Os fatores de risco são categorizados em três escalas de associação com ADP: baixo (aquele aumentado de 1 vez a 5 vezes a chance de desenvolver ADP, se comparado a população normal), moderado (5 a 10 vezes) e o elevado (superior a 10 vezes o normal de desenvolver ADP) (ARDENGH; COELHO; OSVALDT, 2008; BRAND et al., 2007). Estes dados estão indicados na tabela 1.

Tabela 1 Categorização dos fatores de risco em três escalas de associação com ADP Modificado (ARDENGH; COELHO; OSVALDT, 2008; BRAND et al., 2007)

Risco baixo
Sexo masculino
Negros
Judeus de ascendência asquenaze
Obesos
Fumantes
Diabéticos
Indivíduos com infecção por <i>Helicobacter pylori</i>
Indivíduos com história de qualquer tipo de câncer (parente de primeiro grau)
Indivíduos com câncer colorretal hereditário não polipose
Indivíduos com história familiar de câncer de pâncreas (parente de primeiro grau)
Indivíduos com mutação genética BRCA1
Risco moderado
Indivíduos com história familiar de câncer de pâncreas (dois parentes de primeiro grau)
Indivíduos com fibrose cística
Indivíduos com pancreatite crônica
Indivíduos com mutação genética BRCA2
Risco alto
Histórico familiar de melanoma atípico familiar com mutação p16 e pelo menos um caso de câncer de pâncreas em parente de primeiro grau ou segundo grau
Indivíduos com Síndrome de Peutz-Jeghers
Indivíduos com pancreatite hereditária
Histórico familiar de câncer de pâncreas em três ou mais parentes de primeiro, segundo ou terceiro grau
Indivíduos com mutações em BRCA1 e BRCA2, com pelo menos um parente de primeiro e segundo grau com câncer de pâncreas

1.7 Sinais e sintomas

O adenocarcinoma ductal pancreático pode ser considerado uma "doença silenciosa", uma vez que frequentemente não apresenta sintomas até que a doença esteja em estágio avançado e tenha metastizado para órgãos circunvizinhos. O ADP é uma neoplasia maligna altamente agressiva caracterizada pela ausência de sintomas precoces e com um potencial metastático elevado, o que determina o seu mau prognóstico (VYCHYTILOVA-FALTEJSKOVA et al., 2015).

O estágio inicial da doença geralmente não apresenta sintomas específicos, o que contribui para o retardo do diagnóstico, no entanto, este tipo de câncer é mais difícil de tratar quando ele é encontrado em suas fases mais tardias. Assim sintomas vagos muitas vezes são ignorados como astenia, anorexia, saciedade que geralmente precedem quatro meses antes da icterícia indolor (olhos e pele amarelos, urina escura) e ou da dor abdominal. A icterícia e a dor abdominal são os sintomas que levam o paciente a procurar atendimento médico (GULLO et al., 2001; MODOLELL; GUARNER; MALAGELADA, 1999; PORTA et al., 2005).

Outros sintomas mais perceptíveis são perda de apetite e perda maciça de peso, fraqueza, diarreia e tontura (BAER et al., 2015). Podem apresentar também esteatorreia, dor ao ingerir alimentos, dispepsia, perda de apetite, náusea e vômito, diabetes, trombose venosa profunda e depressão (GÄRTNER et al., 2016).

Nem todos os pacientes terão os sintomas relatados, uma vez que os sintomas dependem da região onde está localizado o tumor. O tumor que atinge a cabeça do pâncreas provoca icterícia indolor devido à pressão exercida sobre o ducto biliar, possivelmente ocorre a esteatorreia (HACKERT; SCHÜTTE; MALFERTHEINER, 2014). A bilirrubina normalmente é responsável pela cor marrom das fezes, se o ducto biliar estiver bloqueado, as fezes podem se tornar pálidas ou acizentadas. Além disso, as fezes se tornam gordurosas, uma vez que a bile e enzimas pancreáticas não podem chegar até o intestino para realizar a quebra da gordura. Pacientes com tumor no corpo ou cauda do pâncreas geralmente não apresentam icterícia, mas o tumor pode crescer o bastante e começar a pressionar outros órgãos próximos, o que pode causar uma dor na parte superior do abdômen irradiando para a parte de trás (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

1.8 Diagnóstico

Durante os últimos anos, muitos estudos estão sendo realizados para determinação de biomarcadores que podem estar presentes durante as fases iniciais do desenvolvimento do tumor pancreático. Vários biomarcadores foram propostos para a detecção de câncer pancreático, porém ainda não possuem aplicabilidade clínica. O antígeno de carboidrato CA 19-9 é atualmente o único biomarcador recomendado para ADP, uma vez que fornece importantes informações em relação ao prognóstico, avaliação da ressecabilidade e tomada de decisão sobre a terapia neoadjuvante (SWORDS et al., 2016). O CA 19-9 descrito por Klopowski em 1979, é uma glicoproteína do tipo mucina, de alto peso molecular (>400 KDa), que possui uma estrutura siálica originada do antígeno do grupo sanguíneo Lewis, sendo um tetrasacarídeo (com a sequência Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3[Fuc α 1-4]GlcNAc β) que usualmente está associado à superfície das células através de ligação O-glicana, desempenhando papel central nos processos de reconhecimento célula-célula. É sintetizada normalmente pelas células pancreáticas, ductos biliares, epitélio do estômago, cólon, endométrio e glândula salivar (BÜNGER et al., 2011; LEE et al., 2013). Embora tenha sido originalmente usado como um marcador para carcinoma colorretal verificou-se que tinha um melhor desempenho servindo como um marcador para o câncer pancreático (SWORDS et al., 2016).

As principais limitações do CA19-9 incluem o seu frequente aumento em condições não malignas, como na estenose biliar benigna, icterícia obstrutiva, colangite, pancreatite e cirrose. É de salientar ainda que o CA19-9 pode estar elevado no carcinoma gastrointestinal, como o esofágico, gástrico, colorretal e das vias biliares (GOONETILLEKE; SIRIWARDENA, 2007; TZENG et al., 2014). Este marcador pode ainda ser encontrado em níveis elevados em doenças não tumorais como pancreatite, cirrose e doenças dos ductos biliares. Este teste pode fornecer resultados falso-negativo nos indivíduos com genótipo Lewis negativo (5-10% da população Caucasiana), uma vez que nestas pessoas o CA19-9 não é produzido por nenhuma célula, mesmo na presença de câncer do pâncreas. Isto ocorre porque pessoas Lewis negativas são deficientes na enzima fucosiltransferase necessária para a produção do antígeno de Lewis (LOCKER et al., 2006). Uma outra limitação é o fato de o CA19-9 ter uma baixa sensibilidade para tumores de pequeno diâmetro (GOONETILLEKE; SIRIWARDENA, 2007; HERREROS-VILLANUEVA et al., 2013).

São empregados vários métodos de imagem para identificar tumores em doentes sintomáticos ou naqueles em que há suspeita de doença maligna no pâncreas. As principais modalidades de imagem para a detecção do ADP são tomografia computadorizada, a ressonância magnética, ultrassonografia, colangiopancreatografia e angiografia (ARDENGH; COELHO; OSVALDT, 2008; FURLOW, 2015; TUMMALA; JUNAIDI; AGARWAL, 2011). Devido à biologia agressiva da doença, é de extrema importância diagnosticar e classificar o câncer de pâncreas em estágios iniciais, com intuito de reduzir a mortalidade (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019). O diagnóstico de câncer de pâncreas permanece demasiadamente invasivo e dispendioso. As promessas de métodos não invasivos de detecção, como no sangue, saliva e fezes permanecem subdesenvolvidos (CHAN; DIAMANDIS; BLASUTIG, 2013; KIM; AHUJA, 2015).

1.9 Tratamento

O câncer de pâncreas se descoberto na fase inicial, apresenta chances de cura. Há casos em que a cirurgia é indicada, mas outros procedimentos podem ser utilizados associados ou não com a radioterapia e quimioterapia, processo conhecido como quimiorradiação ou quimiorradioterapia, que é realizado com o intuito de reduzir o tamanho do tumor e aliviar os sintomas (INCA, 2018).

A cirurgia continua sendo o único tratamento curativo e é frequentemente aplicada com quimioterapia adjuvante, mas apenas 10% a 15% dos pacientes são elegíveis ao diagnóstico inicial (CONWAY et al., 2019). Nos casos em que a cirurgia é uma opção, pode-se realizar cirurgia potencialmente curativa, que permite remover todo o tumor (ressecção). Já na cirurgia paliativa, o câncer já está disseminado, mas é realizada para aliviar sintomas ou evitar complicações relacionadas, como obstrução do canal biliar ou intestino, mas o objetivo não é a cura do câncer. São cirurgias complexas, das quais o paciente pode levar semanas a meses para se recuperar (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

A decisão por determinado tipo de tratamento deve levar em conta o estado de saúde geral do paciente, o tipo de tumor, o estadiamento e se o tumor pode ou não ser removido. Menos de 1 em cada 5 cânceres pancreáticos parecem estar confinados no pâncreas no momento em que são encontrados, assim a maioria dos pacientes apresenta doença irresssecável e/ou metastática, o que dificulta optar pela cirurgia. Para levar em

conta a realização da cirurgia deve-se avaliar a complexidade e a morbidade cirúrgica, o risco de ressecção incompleta e o alto risco de recorrência mesmo após ressecção completa. Na doença irresssecável, a quimioterapia paliativa pode prolongar a sobrevida e auxiliar no controle da doença. Já no tumor ressecável (localizado), após sua ressecção quase sempre há indicação de quimioterapia adjuvante com o objetivo de reduzir o risco de recorrência. Na ressecabilidade limítrofe, faz-se a opção de quimioterapia pré-operatória (neo-adjuvante), seguida da tentativa de ressecção cirúrgica, e, se necessário, quimioterapia pós-operatória (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

1.10 Quimioterapia

A natureza letal do câncer decorre de sua propensão a se disseminar rapidamente para o sistema linfático e órgãos distantes. Esta biologia agressiva e resistente a agentes terapêuticos convencionais e direcionados pode levar a uma apresentação clínica típica de doença incurável no momento do diagnóstico (HEZEL et al., 2006).

Alguns medicamentos empregados na quimioterapia são usados no tratamento do câncer de pâncreas como a 5-fluorouracil, gencitabina, capecitabina, oxaliplatina, cisplatina, Irinotecano (lipossomal), paclitaxel (ligado à albumina), docetaxel, e FOLFIRINOX (ácido folínico, fluorouracil, irinotecano e oxaliplatina). Em pacientes que se encontram suficientemente saudáveis, duas ou mais drogas são geralmente dadas em conjunto. Já para outros pacientes, um único fármaco, geralmente gencitabina, 5-FU ou capecitabina é usado. A quimioterapia pode ser administrada em ciclos, que geralmente duram semanas, com cada período de tratamento seguido de um período de repouso (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

As reações adversas de maneira geral que podem ocorrer são: náusea e vômito, perda de apetite, alopecia, aftas, diarreia ou constipação, fadiga, falta de ar, leucopenia e plaquetopenia (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

1.10.1 Análogos das pirimidinas

Os análogos das pirimidinas utilizados no tratamento de câncer de pâncreas são: 5-fluorouracil (5-FU), gencitabina e capecitabina.

A partir de 1957, a 5-Fluoruracila (Figura 9) começou a ser usada e foi considerada a única opção de fármaco quimioterápico para o tratamento de câncer de pâncreas por cerca de 20 anos até a introdução da gencitabina (SCHOBER et al., 2015). É

um análogo da uracila, em que o átomo de hidrogênio da posição 5 foi substituído pelo átomo de flúor. É específico para a fase S do ciclo celular. A enzima timidilato sintetase promove a conversão de 2' desoxiuridilato (DUMP) em 2' desoxitimidilato (DTMP). A 5-fluoruracila é convertida em um nucleotídeo “falso”, o monofosfato de fluordesoxiuridina (FDUMP), que interage com a timidilato sintetase, mas não pode ser convertido em 2'-desoxitimidilato (DTMP). O resultado é a inibição da síntese do DNA e em menor extensão do RNA (MARING et al., 2005; RANG, H. P., ET AL., 2011).

Os efeitos adversos que podem ocorrer são anorexia, náusea, vômito, diarreia, fadiga, estomatite, leucopenia, trombocitopenia, alopecia, dermatite, conjuntivite, ataxia (KOROLKOVAS, A.; DE FRANÇA, F. F. A. C., 2010; RANG, H. P., ET AL., 2011).

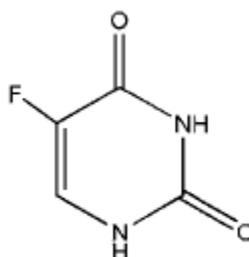


Figura 9. Fórmula estrutural da 5-fluoruracila (MARING et al., 2005).

Em 1997, gencitabina (Figura 10) tornou-se o fármaco de primeira escolha de linha para pacientes com adenocarcinoma de pâncreas devido a uma maior sobrevivência dos pacientes tratados com gencitabina quando em comparação com pacientes tratados com 5-FU (SCHOBER et al., 2015). As propriedades antiproliferativas são dependentes de várias ações inibitórias na síntese do DNA, bloqueando a progressão do ciclo celular através da fase G1/S (AMRUTKAR; GLADHAUG, 2017; KOROLKOVAS, A.; DE FRANÇA, F. F. A. C., 2010).

A gencitabina quimicamente é a 2'-desoxi-2',2'-difluorcitidina (dFdC). A dFdC passa por biotransformação intracelular pelas cinases-nucleosídeo sendo convertida aos nucleosídeos ativos difosfato (dFdCDP) e trifosfato (dFdCTP). Primeiro, o dFdCDP inibe a ribonucleotídeo redutase que é responsável pela catalização das reações que geram os deoxinucleosídeos trifosfatos para a síntese do DNA. Segundo, o dFdCTP compete com a desoxicitidina trifosfato dCTP para incorporação no DNA. Assim, a redução na concentração intracelular de dCTP potencializa a incorporação de dFdCTP no DNA. Após a gencitabina ser incorporada ao DNA, é adicionado um nucleotídeo ao crescimento

das cadeias de DNA. Após esta adição, há uma inibição completa na síntese subsequente de DNA (MINI et al., 2006).

Os efeitos adversos que podem ocorrer com o uso de gencitabina são mielodepressão, náuseas, vômitos, diarreia, hematúria, proteinúria, dispneia, broncoespasmo, sonolência, insônia, astenia, cefaleia, calafrios, mialgia, anorexia, tosse, rinite, sudorese, edema, alopecia reversível, constipação leve e hipotensão (GALLELLI et al., 2004; HERRMANN et al., 2007).

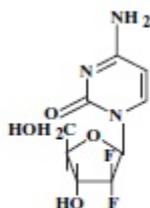


Figura 10. Fórmula estrutural da gencitabina (MINI et al., 2006)

A figura 11 mostra a fórmula estrutural da capecitabina (N-pentoxicarbonil-5'-desoxi-5-fluorocitidina) que é um profármaco aprovado para uso desde 1998 que se torna ativo após passar por três etapas enzimáticas. Na primeira etapa, que ocorre no fígado, a capecitabina é substrato para ação enzimática da carboxilesterase, o que resulta na formação de 5'-desoxi-5-fluorocitidina (5'-DFCR). Em seguida, numa segunda etapa que ocorre no fígado e/ou células tumorais, pela ação enzimática citidina-desaminase há a formação de 5'-desoxi-5-fluoruridina (5'-DFUR). Numa terceira etapa, a enzima timidina-fosforilase, enzima altamente concentrada em tumores sólidos, promove a formação em maior concentração do metabólito ativo 5-FU especificamente no tumor o que diminui a ocorrência de efeitos adversos. Por ser uma medicação de administração oral, sua vantagem em relação ao 5-FU é a facilidade de administração, uma vez que o 5-FU é injetável, apresentando meia vida curta, além da necessidade de acesso venoso central, produzindo maior desconforto para o paciente e risco de complicações como infecção. Além disso, sua eficácia é comparável ao 5-FU intravenoso com um melhor perfil de segurança sendo observada menor incidência de estomatite, alopecia, diarreia, náuseas e neutropenia nos doentes tratados com este fármaco (LAM; GUCHELAAR; BOVEN, 2016; LEICHER et al., 2017; WALKO; LINDLEY, 2005).

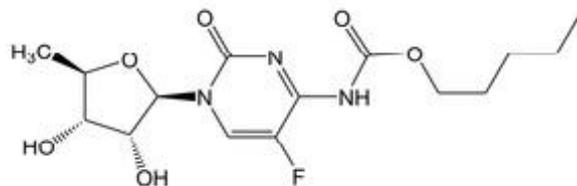


Figura 11. Fórmula estrutural da capecitabina (ROHLICEK et al., 2009).

1.10.2 Compostos de platina

Os fármacos pertencentes a essa classe utilizados para o tratamento do câncer de pâncreas são a cisplatina e oxaliplatina (Figura 12). Consistem em um complexo de coordenação plano hidrossolúvel, constituído por um átomo de platina central cercado por átomos de cloro e dois grupos amônia. O mecanismo de ação é baseado no estabelecimento de ligação cruzada com as fitas do DNA. No interior da célula, o cloro dissocia-se, tornando o complexo reativo que reage com a água e, então, interage com o DNA. Assim, ocorre entrecruzamento intrafilamentoso com as moléculas de guanina adjacentes, resultando na desnaturação local do DNA (RANG, H. P., ET AL., 2011).

No ano de 2015 completou o 50º aniversário da descoberta da cisplatina. Em 1965, foram descobertas as propriedades anticancerígenas da cisplatina, mas sua introdução na clínica foi somente na década de 1970, o que representou uma revolução no tratamento de tumores sólidos. É administrada na forma injetável ou infusão intravenosa lenta, sendo altamente nefrotóxica, apresentando baixa mielotoxicidade, podendo causar náuseas e vômitos muito intensos (RANCOULE et al., 2017).

A oxaliplatina é um medicamento de platina de terceira geração usado para tratamento de câncer colorretal, gástrico e pancreático. É administrada por via intravenosa, sendo sua farmacocinética caracterizada por uma curta fase inicial de distribuição e uma longa fase final de remoção do medicamento que ocorre nos rins após 48 horas da administração do medicamento (MARTINEZ-BALIBREA et al., 2015).

As reações adversas que podem ocorrer com o uso de compostos de platina são: perda auditiva, distúrbios visuais, alterações no paladar, reações alérgicas, astenia, alopecia, estomatite, hipomagnesemia, neuropatias, hipocalcemia, hiponatremia, hipopotassemia e hipofosfatemia, podendo ocorrer, mielossupressão com leucopenia, trombocitopenia, neutropenia e anemia (RANCOULE et al., 2017).

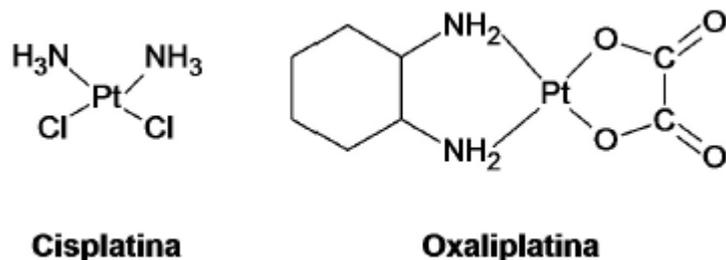


Figura 12. Fórmula estrutural dos compostos de platina (DE ALMEIDA, S. M. V. et al., 2014).

1.10.3 Taxanos

Os fármacos da classe dos taxanos disponíveis são o paclitaxel e o docetaxel (Figura 13). São assim chamados, por terem sido inicialmente isolados de plantas do gênero *Taxus*, da família Taxaceae. O paclitaxel é um alcaloide extraído da casca do *Taxus brevifolia*. Já o docetaxel é preparado a partir de um precursor não citotóxico extraído do *Taxus baccata*. São compostos semissintéticos, uma vez que o precursor é esterificado com cadeia lateral sintética que é citotóxica. (KOROLKOVAS, A.; DE FRANÇA, F. F. A. C., 2010; WALL; WANI, 1996).

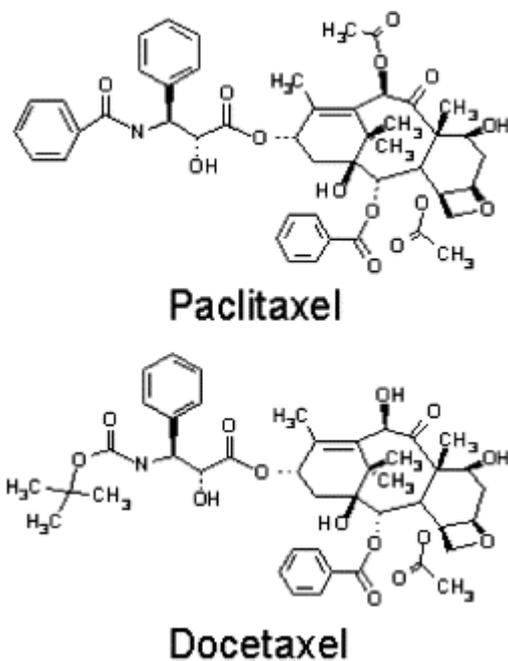


Figura 13. Fórmula estrutural dos taxanos (FITZPATRICK; WHEELER, 2003).

Como agentes antimicrotúbulos, estabilizam os microtúbulos citoplasmáticos nas células como resultado de sua ligação à tubulina polimerizada. Os efeitos inibitórios provocados por ele sobre a despolimerização dos microtúbulos interrompem o ciclo celular na fase G2 final ou na mitose (MAGNANI et al., 2009; SOUZA, 2004).

As reações adversas que podem ocorrer durante o tratamento com derivados do taxol são: náusea, vômitos, granulocitopenia, anemia, trombocitopenia, edema, hipotensão e aumento permeabilidade capilar, diarreia, fadiga. São relatadas com o uso do uso de paclitaxel as seguintes manifestações clínicas: bradicardia, hipertensão, mialgia, artralgia, alopecia. Já com o uso docetaxel foram observadas astenia, artralgias, mialgias, erupções cutânea, hipo ou hiperpigmentação, edema, ascite, derrame pleural, derrame pericárdico, e ganho de peso (HO; MACKKEY, 2014; KOROLKOVAS, A.; DE FRANÇA, F. F. A. C., 2010).

A formulação de paclitaxel na forma em nanopartículas ligadas à albumina têm mostrado ter atividade aumentada em relação ao paclitaxel livre. Esta nova formulação apresenta a vantagem de não provocar reações de hipersensibilidade e de diminuir alguns problemas relacionados à tolerância e/ou resistência, que podem ocorrer durante o tratamento de alguns tipos de câncer (HENNENFENT; GOVINDAN, 2006; OKADA et al., 2017; ROWINSKY; CALVO, 2006).

1.10.4 Irinotecano

O irinotecano é um inibidor de topoisomerase I (Figura 14), que foi descoberto e sintetizado no Japão em 1983, sendo um análogo semissintético da camptotecina. É um profármaco, que é convertido pela carboxilesterase no seu metabólito ativo SN-38. A formação de um complexo clivável fármaco-topoisomerase-DNA resulta na ruptura da cadeia dupla de DNA promovendo a morte de células especificamente durante a fase S (FUJITA et al., 2015; ROTHENBERG, 2001; XU; VILLALONA-CALERO, 2002).

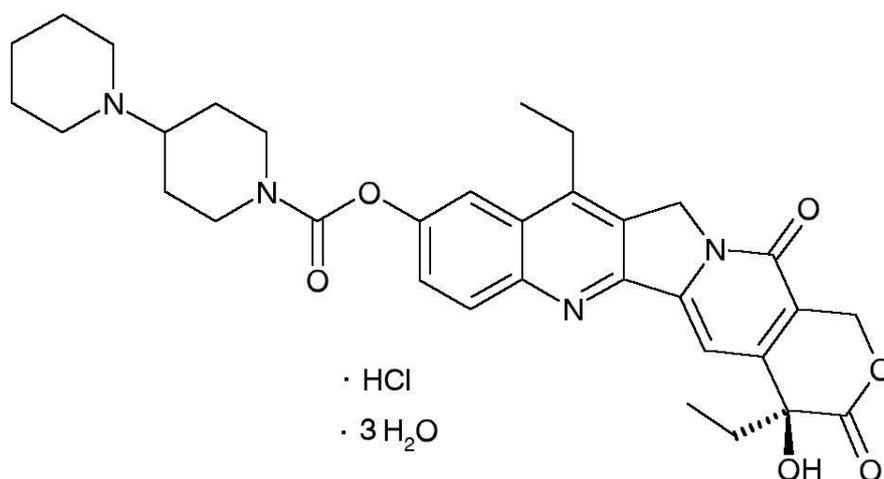


Figura 14. Fórmula estrutural do irinotecano hidrocloreto triidratado (REDDY; SUDHAKAR BABU; KUMAR, 2013)

As reações adversas que podem ocorrer durante o uso deste fármaco são: náusea e vômito, anorexia, constipação, estomatite, diarreia, fadiga, insônia cefaleia, tontura, dispneia, febre, edema, sudorese, exantema, alopecia podendo provocar ainda anemia e mielossupressão (CUNNINGHAM et al., 1998; DOUILLARD et al., 2000).

1.10.5 Folfirinox

Em 2010 surgiu um protocolo de quimioterapia composto por 4 fármacos: 5-fluoruracila, ácido folínico, irinotecano e oxaliplatina. O ácido folínico, um derivado da vitamina B, reduz os efeitos secundários da fluoruracila. A fluoruracila é um análogo de pirimidina que se incorpora no DNA molecular e impede a síntese de DNA. O irinotecano é um inibidor de topoisomerase que impede a replicação do DNA. A oxaliplatina inibe a síntese ou a reparação do DNA. Esta combinação de fármacos foi apoiada por estudos pré-clínicos que demonstraram a eficácia de seu emprego contra o câncer de pâncreas e a atividade sinérgica da combinação (SCHOBER et al., 2015; TAKAYA et al., 2003).

Estudo publicado em 2011 verificou que o FOLFIRINOX produzia a mais consistente melhoria na qualidade e expectativa de vida dos pacientes com câncer pancreático avançado, os quais viviam por aproximadamente quatro meses a mais do que aqueles que recebiam o tratamento convencional com gencitabina (CONROY et al., 2011; POLISH; JOSEPH; MARSH, 2019).

O FOLFIRINOX tem sido uma das opções de primeira linha para o câncer de pâncreas avançado, embora induza efeitos adversos significativos como vômito, fadiga, diarreia, alopecia, úlceras, alterações hepáticas, visão borrada, erupções cutâneas, amenorreia, neutropenia, trombocitopenia, anemia (CONROY et al., 2011; HOSHI et al., 2015; TONG et al., 2018).

1.11 Terapia do câncer direcionada a PI3K/AKT

Os pacientes com ADP que possuem alta atividade da via PI3K apresentam uma menor sobrevida do que aqueles com baixa ativação dessa via. Em 95% dos casos, o câncer de pâncreas é impulsionado pela ativação de mutações no KRAS, que por sua vez ativa a sinalização PI3K através da subunidade p110 α , junto com outro componente da via PDK1, indicando que uma grande proporção de pacientes poderiam se beneficiar de um tratamento direcionado de forma eficaz para esta via (CONWAY et al., 2019). Porém, poucos medicamentos anticâncer direcionados à via PI3K foram aprovados para uso clínico e sua eficácia é particularmente limitada em relação a certos tumores, como por exemplo o de câncer de pâncreas (CASARI et al., 2019).

Até o momento, numerosos inibidores foram desenvolvidos, tendo como alvo PI3K, AKT ou mTOR, sendo que mais de 40 compostos foram testados em uso clínico em uma variedade de cânceres. Porém, os testes clínicos de muitas moléculas foram encerrados antes de ensaios clínicos de fase tardia devido à atividade antitumoral limitada e / ou a alta toxicidade no hospedeiro. Poucos inibidores da PI3K e de mTOR foram aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) para tratamento clínico de cânceres. Os inibidores da AKT ainda estão na fase inicial dos testes clínicos, no entanto, devido à extensa semelhança da bolsa de ligação a ATP das AKT cinases com a família de cinases AGC, tem sido particularmente difícil desenvolver inibidores competitivos para ATP que visam a especificidade com cinases AKT (CAO et al., 2019; MURTHY; ATTRI; SINGH, 2018).

O idelalisibe (ZYDELIG) foi o primeiro inibidor de PI3K δ aprovado pela FDA, de administração oral; é uma opção de tratamento eficaz e segura para pacientes com leucemia linfóide crônica recidivada e linfoma folicular recidivante. O uso de idelalisibe podem causar lesão intestinal, hepatotoxicidade, diarreia, colite e pneumonite (RAEDLER, 2015).

O copanlisibe (ALIQOPA) é o primeiro inibidor intravenoso da fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) com atividade inibidora preferencial contra as isoformas PI3K- α e PI3K- δ . É usado no tratamento de linfoma folicular recidivante em pacientes que receberam pelo menos duas terapias sistêmicas anteriores. O copanlisibe está associado a uma alta taxa de elevações menores das enzimas séricas durante o tratamento e tem sido relatado como causador de lesão hepática aguda clinicamente aparente que pode ser grave e até fatal (ELTANTAWY et al., 2019). Foram relatadas reações adversas como pneumonia, pneumonite, hiperglicemia, leucopenia, trombocitopenia, diarreia, hipertensão, náusea e infecções do trato respiratório inferior (MENSAH; BLAIZE; BRYAN, 2018).

A FDA aprovou em 23 de maio de 2019 para o tratamento do câncer de mama metastático/localmente avançado, com mutação do PIK3CA, positivo para receptores hormonais (RH +), o inibidor seletivo oral de PI3K α , alpelisib (Piqray, Novartis). Foram observados com o uso de alpelisib a ocorrência dos seguintes efeitos adversos: hiperglicemia, toxicidades, náusea, vômito e diarreia e fadiga. O alpelisib é um inibidor seletivo oral da isoforma da classe I PI3K (ANDO et al., 2019).

Atualmente, novos agentes e várias gerações de inibidores de PI3K estão sendo avaliados em ensaios clínicos. Os inibidores de PI3K que atuam visando a inativação de todas as 4 isoformas de PI3K classe I mostraram eficácia clínica modesta em ensaios clínicos como buparlisibe e pictilisibe, o que limita a utilidade clínica desses agentes. Portanto, há uma necessidade de explorar opções de tratamento mais toleráveis, como inibidores de PI3K seletivos para isoformas que visam uma PI3K específica. As fracas propriedades farmacocinéticas de vários inibidores PI3K, como Wortmannin e LY294002, levaram à evolução dos inibidores de PI3K para uma nova geração de compostos que incluem medicamentos de moléculas pequenas, como BKM120, GDC0941, GSK2126458 (VAN DORT et al., 2015). Apesar do sucesso de muitos desses fármacos, a seleção de células com resistência aos medicamentos durante o tratamento se tornou um dos principais desafios e o fator que contribui para a resposta abaixo do ideal é o desenvolvimento de resistência a medicamentos. A existência de complexas vias de sinalizações cruzadas e ciclos de retroalimentação entre essas vias continua sendo um dos principais fatores na determinação do desenvolvimento de resistência a esquemas terapêuticos nos mais diversos tipos de câncer (MURTHY; ATTRI; SINGH, 2018).

De maneira geral, os estudos mostram que a monoterapia apresenta baixa eficácia contra tumores, e que a eficácia desejada pode ser alcançada por combinação de vários fármacos (LIU et al., 2019; MA et al., 2018). Um estudo recente demonstrou que a

supressão da via PI3K / AKT / mTOR resulta em uma ativação compensatória da via MAPK / MEK, assim é de grande importância a identificação de novas terapias combinadas direcionadas a obter uma resposta superior às terapias já empregadas para o tratamento do câncer de pâncreas (LI et al., 2019a; VAN DORT et al., 2015).

1.12 Derivados de tetrahydroquinolina-2,5-dionas

Os compostos heterocíclicos, especialmente heterocíclicos nitrogenados são uma classe de compostos importantes na indústria agroquímica, usados como pesticidas e na indústria farmacêutica correspondem a cerca de 60% de todas as substâncias medicamentosas. Em particular, o anel tetrahydroquinolina é um motivo estrutural presente em numerosos produtos naturais biologicamente ativos e farmacologicamente relevantes (SRIDHARAN; SURYAVANSHI; MENÉNDEZ, 2011).

As moléculas de tetrahydroquinolinas substituídas de origem natural ou sintéticas, apresentam uma ampla variedade de atividades biológicas e farmacológicas como antiúlcera (UCHIDA et al., 1990), antitrombótica (JACOBS et al., 2000), antialérgica (RAMACHARY; SHRUTHI, 2014), antifertilidade (SRIDHARAN; SURYAVANSHI; MENÉNDEZ, 2011), antiviral (AMMOSOVA et al., 2014; SU et al., 2009), antimaláricos (KAUR et al., 2010), antifúngico (KOUZNETSOV et al., 2012; SRIDHARAN; SURYAVANSHI; MENÉNDEZ, 2011), antibacteriano (NAMMALWAR; BUNCE, 2013), agente antiarrítmico (KIMURA; IMANISHI; ARITA, 1989), anticancerígeno (KARJALAINEN et al., 2017; LIN et al., 2019; MOUSTAFA; BAKARE, 2019; NAMMALWAR; BUNCE, 2013), antidepressivo (SRIDHARAN; SURYAVANSHI; MENÉNDEZ, 2011), antioxidante (RODRIGUEZ NÚÑEZ et al., 2019), no controle da doença Alzheimer (STERN et al., 2007) sendo também descritos como inibidores da enzima farnesiltransferase (BENDALE et al., 2007).

Sendo assim, a classe das tetrahydroquinolinas vem nos últimos anos adquirindo grande relevância na química medicinal, uma vez que podem representar um promissor caminho, no que diz respeito à sua arquitetura molecular, devido à possibilidade de serem adicionados diferentes radicais ao núcleo tetrahydroquinolínico para o desenvolvimento de potenciais novos fármacos (RODRÍGUEZ et al., 2016). Nesse contexto, algumas novas abordagens foram relatadas visando o desenvolvimento de novas rotas sintéticas que levam a produção de derivados de tetrahydroquinolina-2,5-dionas (ENDERS et al., 1987; MURAHASHI et al., 1993; YAO et al., 2012, 2013), núcleo mostrado na figura 15,

porém apenas algumas abordagens foram descritas utilizando reações multicomponentes MCRs (Multicomponent Reaction) (TAKAYA et al., 2003; TU et al., 2006).

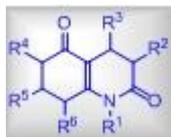


Figura 15. Núcleo geral da tetrahydroquinolina-2,5-diona.

Atualmente, há uma grande preocupação com o desenvolvimento de novas rotas sintéticas que proporcionem altos rendimentos e mínima formação de resíduos e poluentes. Assim, as reações multicomponentes MCRs (Multicomponent Reaction) resultam em alta convergência, na qual a combinação de três ou mais reagentes em uma única reação leva a um produto incorporando a maioria dos átomos do material de partida (ALVIM et al., 2014; BRAUCH; VAN BERKEL; WESTERMANN, 2013). Assim, estas sínteses orgânicas apresentam algumas vantagens como economia de átomos, elevada eficiência e produtividade, boa relação custo/benefício e fácil execução e minimização da geração de resíduos (DÖMLING; WANG; WANG, 2012). São reações conhecidas há mais de 100 anos, que vêm ganhando espaço nos últimas décadas, devido à possibilidade de síntese de uma diversidade de moléculas, com diferentes ações biológicas e farmacológicas (BIGGS-HOUCK; YOUNAI; SHAW, 2010).

Nosso grupo vem trabalhando no desenvolvimento de reações multicomponentes com o objetivo de sintetizar derivados das tetrahydroquinolinas (TQDs) visando o seu emprego em diversas áreas da saúde como no controle de doenças infecciosas, doenças inflamatórias e no câncer, que foi o tema deste trabalho.

2. JUSTIFICATIVA

Vários estudos com novas drogas têm sido conduzidos para a definição do melhor tratamento adjuvante e paliativo para o câncer de pâncreas, porém pouco êxito foi obtido na diminuição das taxas de progressão, recidiva e óbito (CAO et al., 2019; GHOSN et al., 2014). Dessa forma, há uma necessidade urgente de busca por novos compostos cuja atividade possa trazer melhores resultados para o tratamento do câncer pancreático. Assim, a prospecção da atividade inibitória dos eventos celulares que medeiam a progressão do câncer de pâncreas pelos derivados de tetrahydroquinolina-2,5-diona, se alinha a um grande esforço mundial em prol da extensão da vida e melhoria da sua qualidade em pacientes com câncer de pâncreas. A via PI3K/AKT vem sendo alvo de estudos há vários anos, uma vez que já foi descrita como desregulada em vários tipos de cânceres. Portanto, a produção de inibidores visando a interferência em vários níveis dessa via vem sendo o foco do desenvolvimento de novos agentes anticâncer que sejam mais efetivos, apresentem atividade altamente específica, sendo assim menos citotóxicos às células normais. Aliado ao baixo custo de produção destas moléculas, estas características se tornaram os objetivos mais procurados dentro da produção de fármacos candidatos ao tratamento de câncer. Este trabalho segue a fase de síntese destas moléculas e poderá abrir um novo caminho para o desenvolvimento de drogas baseadas nas arquiteturas moleculares selecionadas pelos nossos ensaios. O que poderá trazer relevante impacto para as futuras abordagens sintéticas e terapêuticas voltadas para o tratamento do câncer pâncreas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Este trabalho teve como objetivo avaliar a citotoxicidade de 6 compostos derivados da tetrahydroquinolina-2,5-dionas (TQDs) no modelo de adenocarcinoma pancreático humano *in vitro*, utilizando as linhagens celulares CAPAN-2 e PANC-1.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar *in vitro* a citotoxicidade provocada pelos derivados da tetrahydroquinolina-2,5-dionas, sobre os eventos celulares regulados pela atividade das proteínas Ras mutadas no

modelo adenocarcinoma pancreático humano.

-Verificar os efeitos destes derivados sobre a viabilidade celular, morfologia, autofagia, ciclo celular, perfil de morte celular, proliferação celular, perfil da população de células tronco tumorais, capacidade de formação de colônia no modelo *in vitro* do câncer de pâncreas.

-Avaliar a expressão de proteínas relacionadas à via PI3K/AKT.

4. MATERIAL E MÉTODOS – DESENHO EXPERIMENTAL

4.1 Reagente e equipamentos

Os derivados de tetrahydroquinolina-2,5-diona foram sintetizados e cedidos pelo Laboratório de Química Medicinal & Tecnológica (LaQuiMeT) da Universidade de Brasília, coordenado pelo Prof. Dr. Brenno Amaro DaSilveira Neto. Reagentes: McCoy's 5a; Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Soro fetal bovino (SFB), Tripsina 0,25%, GIBCO- Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA); MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), Iodeto de Propídio, Anexina-V conjugada a Alexa 488, CellTrace™ CFSE cell Proliferation Kit, todos da Molecular Probes - Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA); 3-Metiladenina, Rapamicina, Albumina de soro bovino (BSA), Colchicina, DMSO, da Sigma-Aldrich (St. MO, EUA); laranja de Acridina, da empresa ImmunoChemistry Technologies (Bloomington, MN, EUA).

Os anticorpos utilizados neste trabalho foram: AKT (#9272), Phospho-AKT (#9271S) e Anti-PI3K (CA92590), todos da Cell Signalling (gentilmente cedidos pela Prof. Dr. Andrea Barretto Montoyama - UNB); Monoclonal Anti GAPDH (G8795), α Mouse IgGHRP conjugate (Sigma- Aldrich); anti-Rb IgG HRP conjugate (#31460), INVITROGEN.

Para os ensaios de western blotting, utilizou-se Triton X-100, Tween 20, Glicina, e Albumina de Soro Bovino (BSA), todos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA); Dodecil Sulfato de sódio (Thermo Scientific); leite desnatado Molico; ECL™ Prime Western Blotting System Reagent (Ge Healthcare); 30% Acrylamide/Bis Solution (Bio Rad); Brad Ford Reagente e Phosphatase inibidor da Sigma-Aldrich; Bio rad Precision Plus Protein™ Dual Color Standart; Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Complete tablets, mini EDTA-free, da Roche.

Equipamentos utilizados foram: Microscópio de luz Axiovert (Zeiss, Alemanha); Spectramax M5 (Molecular Devices, LLC, EUA); Lupa binocular, Stemi 508, ZEISS; Citômetro de fluxo FACS Calibur BD (BD Biosciences, Inc.); Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Inglaterra). Programas software AxionVision 100 (Zeiss, Alemanha) SoftMax Pro 5.2 (Molecular Devices, LLC, EUA); programa FlowJo v.5.2.7, (Tree Star, Inc.); programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) e programa ImageJ (NIH, EUA).

4.2 Manutenção das linhagens celulares

As linhagens celulares de adenocarcinoma pancreático humano CAPAN-2, PANC-1 e HUVEC (Células Endoteliais da Veia Umbilical Humana) foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro. As células CAPAN-2 e PANC-1 foram cultivadas em meio McCoy's e no meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), respectivamente. As células HUVEC foram utilizadas como controle de células normais e foram cultivadas em meio DMEM com meio F12. Todos os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) e 100.000 U/L de penicilina e 100mg/L de estreptomicina. As linhagens foram mantidas em atmosfera contendo 5% de CO₂ a 37° C.

4.3 Síntese dos derivados de tetrahydroquinolina-2,5-diona

Seis compostos foram sintetizados pela reação multicomponente (Multicomponent Reaction – MCR) com aprimoramento da reação. As reações multicomponentes são processos que envolvem reações sequenciais entre três ou mais reagentes em quantidades equimolares, adicionados ao mesmo tempo à mistura reacional, levando ao produto desejado de maneira convergente, agregando características de cada material de partida, incorporando a maioria dos átomos. Além de formarem várias ligações químicas em uma única etapa, reduzindo o número de materiais, métodos de separação e mínima formação de resíduos e poluentes. Esta síntese foi realizada pelo Laboratório de Química Medicinal e Tecnológica da Universidade de Brasília, coordenado pelo Prof. Dr. Brenno Amaro DaSilveira Neto. Os seis derivados foram solubilizados em DMSO para os

estudos *in vitro*. A fórmula estrutural e a massa moléculas dos seis compostos testados neste trabalho estão contidos no **ANEXO I**.

4.4 Ensaio de Autofagia

A detecção de vesículas acídicas intracelulares presentes no processo de autofagia foi realizado pela marcação com Laranja de Acridina. É uma base fraca que se acumula no ambiente ácido dos autofagossomos maduros e autofagolisossomos, produzindo fluorescência vermelha e cora o citoplasma e núcleo celulares produzindo fluorescência verde. Em placa de 24 poços, foram adicionadas $1,9 \times 10^5$ células CAPAN-2 ou PANC-1 por poço. Após 24 horas, as células foram tratadas com TQDs 2, 7, 9, 10, 12, 17 na concentração de 100 μ M. Como controle negativo foi utilizado somente células, controle indutor de autofagia utilizou-se Rapamicina (100 nanomolar) e 3 MA (5 mM) controle inibidor de autofagia. Após 24 horas de tratamento retirou-se o meio de cultura e cada poço foi lavado 3 vezes com 500 μ L de PBS. Em seguida, foi adicionado 500 μ L laranja de acridina (0,005 mg) em cada poço, deixado por 15 minutos, 37 °C. Após a retirada do laranja de acridina, cada poço foi lavado com 1 mL de PBS. Para desaderir as células foi adicionado 400 μ L (CAPAN-2) ou 200 μ L (PANC-1) de tripsina em cada poço, por 10 minutos. Foi adicionado em cada poço 500 μ L de meio de cultura as células foram recolhidas e transferidas para tubos tipo eppendorf e centrifugadas 1500 rpm, 20 °C por 5 min. O sobrenadante foi retirado e as células foram ressuspensas em 500 μ L de PBS. Foram adquiridos 10.000 eventos de cada amostra por citometria de fluxo e a análise das fluorescências dos canais FL1-H e FL3-H foram analisadas no software *FlowJo*. As análises foram feitas a partir de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

4.5 Ensaio da viabilidade celular

A viabilidade das células tratadas com os compostos derivados de tetrahydroquinolina-2,5-diona foi determinada pelo ensaio padrão por brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) segundo as recomendações do fabricante. Baseia-se na capacidade das células viáveis reduzirem o sal de tetrazólico a cristais de formazan, por ação de enzimas mitocondriais ou citoplasmáticas, os quais podem ser solubilizados com DMSO, gerando uma coloração púrpura, que pode ser

mensurada por espectrofotometria. Células CAPAN-2, PANC-1 e HUVEC foram semeadas em placas de 96 poços e tratadas com diferentes concentrações dos derivados de tetrahydroquinolina-2,5-diona e analisadas quanto à viabilidade e proliferação em uma cinética temporal de 24, 48 e 72 horas. Como controle negativo foi feito incubando-se as células com meio de cultura suplementando contendo DMSO, nas mesmas concentrações testadas. Foram semeadas 5×10^3 células CAPAN-2, 3×10^3 células PANC-1 e 4×10^3 células HUVEC por poço em placas de 96 poços e incubadas overnight a 37 °C. Após adesão celular, as células foram tratadas com derivados de tetrahydroquinolina-2,5-diona 2, 7, 9, 10, 12 e 17 nas concentrações de 25 µM a 800 µM ou 1 nanomolar a 1M. Após o período de tratamento de 24, 48 e 72 h, as placas foram incubadas por 4h, protegidas da luz e a 37 °C, com 150 µL da solução de MTT. Em seguida a solução de MTT foi retirada e 200 µL de DMSO foram adicionados a cada um dos poços para a dissolução dos cristais de formazan. As placas foram lidas no espectrofotômetro Spectramax M5 (Molecular Devices – USA). O experimento foi realizado em triplicata para cada composto e concentração utilizada e três experimentos independentes.

Para o cálculo dos valores da concentração inibitória 50 (IC₅₀), foi utilizado Software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) em que a porcentagem de células viáveis foi estimada frente a dose de tratamento em escala logarítmica. Os tratamentos para todos os experimentos posteriores foram realizados utilizando-se os compostos que apresentaram melhor atividade citotóxica no teste de viabilidade celular por MTT nas concentrações do IC₅₀.

4.6 Análise das alterações morfológicas causadas pelos tratamentos com derivados tetrahydroquinolina-2,5-diona

As análises das alterações morfológicas nas células Capan-2, Panc-1 e Huvec devido ao tratamento de 72h com derivados tetrahydroquinolina-2,5-diona foram avaliadas por microscopia de luz (Microscópio Zeiss Axiovert 100) e com magnificação 10x as imagens foram capturadas com o auxílio do *software AxioVision* (Zeiss).

4.7 Análise do conteúdo de DNA por marcação com iodeto de propídio (PI)

O Iodeto de Propídeo (PI) é um intercalante de DNA, assim a quantidade de marcação presente na célula está relacionada à quantidade de DNA que a célula possui.

Assim, as populações podem ser divididas de acordo com a quantidade de DNA, células possuindo $2n$ de DNA se encontram na fase G1, células com $4n$ de DNA se encontram na fase G2 ou M e células com quantidades intermediárias de DNA se encontram na fase S.

CAPAN-2 (2×10^5 células) e PANC-1 (1×10^5 células) foram semeadas em placas de 12 poços. Após 24h as células foram tratadas com seu IC_{50} dos derivados de tetrahydroquinolina-2,5-diona 2, 7, 9, 10, 12 e 17 por 72h. As células foram centrifugadas por 3 minutos, 300g e o *pellet* foi ressuscitado em 500 μ l de PBS, e fixadas com etanol 70% gelado, e mantidas por 2 h no gelo. Então as células foram novamente centrifugadas por 5 minutos 300g e lavadas com PBS e novamente centrifugadas. Em seguida, as células foram ressuscitadas em 1 mL solução de iodeto de propídio (0,1% de Triton X-100, 10 μ g /ml de PI e 100 μ g/ml de RNase livre de DNase) diluído em PBS, por 10 min a 37 °C. Após esse período, as amostras foram centrifugadas, ressuscitadas em PBS. Foram adquiridos 10.000 eventos de cada amostra por citometria de fluxo e analisada a fluorescência no canal FL2 em escala linear. O conteúdo de DNA celular foi determinado utilizando-se a plataforma de ciclo celular do software *FlowJo*. As análises foram feitas a partir de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

4.8 Caracterização da morte celular induzida por TQDs

A análise do tipo de morte induzida pelos tratamentos foi realizada pela marcação das células de adenocarcinoma pancreático, CAPAN-2 e PANC-1 com Anexina V conjugada com Alexa 488 e Iodeto de propídio (PI). Este teste permite a identificação e quantificação de subpopulações de células em células viáveis, células em apoptose inicial, células em apoptose tardia e células em necrose. As células em apoptose inicial possuem a membrana celular intacta devido à exposição de fosfatidilserina no folheto externo da membrana celular, sendo assim marcada com anexina V. Já as células que apresentam perda da integridade da membrana plasmática, como as células em apoptose tardia e em necrose ocorre a dupla marcação ou marcação apenas para PI, respectivamente. Células viáveis são duplamente negativas. Para o controle experimental, a apoptose foi induzida com 20% de DMSO em meio de cultura, por 15 minutos e o controle de células necróticas foi obtido fervendo as células por 15 minutos em meio de cultura. 1×10^5 células foram semeadas em placa de 24 poços, após 24h, receberam os tratamentos por 72 h com os compostos com seus respectivo valores de IC_{50} . Após o tempo de tratamento, o sobrenadante foi recolhido, e as células foram desaderidas e

lavadas com PBS. Em seguida, as células foram ressuspensas em 100 µL de tampão de ligação de anexina V (10 mM HEPES, 140 mM NaCl e 2,5 mM de CaCl₂ – pH 7,4) contendo 5 µL de anexina-V conjugada a Alexa 488, por 15 min a temperatura ambiente, protegidas da luz. Após este período, 400 µL do tampão de ligação da Anexina V foram adicionados aos tubos que foram mantidos no gelo e 500 µL da solução de PI (2µg/mL) foram adicionados posteriormente, por 5 minutos, a 4°C protegido da luz. Os dados foram adquiridos no citômetro FACSCalibur (BD Biosciences - CA) com o auxílio do *software CellQuest-Pro*, sendo foram adquiridos 10.000 eventos e analisadas as fluorescências nos canais FL1-H e FL3-H em escalas logarítmicas. A análise dos dados foi realizada usando a porcentagem de células presente em cada quadrante. As análise foram feitas a partir de 3 experimentos independentes.

4.9 Análise de proliferação celular

O CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester) é um marcador incorporado por células viáveis, que após sua clivagem por esterases intracelulares resulta na molécula fluorescente atóxica, verde , a carboxifluoresceína. A cada divisão celular, o conteúdo citoplasmático vai sendo distribuído entre as células-filhas e a intensidade da fluorescência cai pela metade a cada divisão. Dessa forma em cada nova geração de células há metade da fluorescência da geração anterior.

A análise da atividade proliferativa das células CAPAN-2 e PANC-1 tratadas ou controle foi realizada por meio da marcação com CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester) na concentração final de 10 µM (diluído em PBS/BSA 0,1%), 10 minutos, 37° C . Células semeadas em placas de 12 poços na concentração 1 x 10⁵ para CAPAN-2 e 5 x 10⁴ células para PANC-1, foram tratadas com os compostos na concentração do seu IC₅₀ em cinética de 72 horas. Para o controle experimental de células que não proliferaram, um grupo será tratado com 10 µM de colchicina por 1h a 37°C e, em seguida, os poços foram lavados com meio suplementado e deixados em cultura pelo mesmo tempo que todos os outros grupos. Após 72h de tratamento, através do citômetro de fluxo foram adquiridos 10.000 eventos e analisada a fluorescência no canal FL1-H e o cálculo da atividade proliferativa foi realizado utilizando-se a plataforma de proliferação Celular do *software FlowJo*. As análise foram feitas a partir de 3 experimentos independentes .

4.10 Análise da população de células-tronco tumorais

As células-tronco do câncer de pâncreas expressam os marcadores de superfície celular CD24 e CD44 (MIYAKE et al., 2015) As populações de células-tronco tumorais foram definidas conforme os perfis de expressão das proteínas de superfície CD44 e CD24. Para esta análise, 1×10^5 células foram cultivadas em placas de 12 poços e após sua adesão receberam tratamento por 72 horas. Após o tempo de tratamento, as células foram desaderidas com tripsina, coletadas e lavadas com PBS/BSA 1% e incubadas por 30 min, no gelo, com os anticorpos anti-CD24-PE e anti-CD44-FITC, ambos na concentração de 1:20 em PBS/BSA 1% . Os controles isotípicos (IgG2B-FITC, IgG1-PE) foram incubados nas mesmas condições experimentais. Após a incubação, as células foram centrifugadas e lavadas com PBS/BSA 1%. As análises foram realizadas por meio da aquisição de 10.000 eventos no citômetro de fluxo.

4.11 Análise da capacidade de formação de colônia após tratamento

O ensaio clonogênico ou de formação de colônia é um ensaio de sobrevivência celular *in vitro*, amplamente utilizado para estudar a capacidade de uma única célula após receber um tratamento se transformar em uma colônia e sendo uma medida para ver o efeito antiproliferativo dos agentes citotóxicos (FRANKEN et al., 2006; GUZMÁN et al., 2014).

As células Capan-2 (3×10^5) e Panc-1 (1×10^5) foram plaqueadas em placas de 24 poços. Após sua adesão, as células foram tratadas com IC50 das TQDs ou não (controle negativo) por 24 h e 48 h, respectivamente. As células sobreviventes foram novamente plaqueadas 2×10^3 células por poço, para Panc-1 e deixadas em cultivo por 7 dias. Já para Capan-2 foi plaqueado 3×10^4 em placas de 6 poços e deixadas em cultivo por 10 dias. O meio de cultura foi renovado a cada 3 dias. Ao final dos tempos os poços foram lavados 2 vezes com PBS, as células foram então fixadas com metanol puro por duas vezes durante banhos de 5 minutos. Em seguida, foram coradas por 5 minutos com cristal violeta 0,5% em água destilada. O corante foi retirado e os poços foram lavados abundantemente com água destilada. As colônias formadas foram observadas em lupa Binocular (Zeiss) e as imagens foram capturadas com auxílio do software AxionVision (Zeiss). O experimento foi realizado em duplicata.

4.12 Análise da expressão de proteínas Western blot

A expressão e fosforilação das proteínas sinalizadoras da via PI3K/AKT no lisado protéico das linhagens Panc-1 e Capan-2 foram avaliadas por Western Blot. A proteína GAPDH foi utilizada como controle interno. As células foram adicionadas a placas de 6 poços em quantidades de 8×10^5 para Panc-1 e 1×10^6 para Capan-2. Após o tratamento por 24 horas as células foram lisadas com 50 μ L de tampão de lise (Tris-HCl 50 mM Ph 7,5; NaCl 200 mM; Triton X 100 1%; inibidor de protease, inibidor de fosfatase) diretamente no poço, e foram lisadas com o auxílio de um espalhador de células (*cell scraper*). As amostras foram coletadas em tubos tipo eppendorf e incubadas no gelo por 10 minutos e vortexadas 5 vezes. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos, 4°C, 14000 rpm, e os sobrenadante foi recolhido. O teor de proteínas de cada extrato celular foi verificado pelo teste de Bradford de acordo com as recomendações do fabricante e armazenadas a -20°C.

No gel de poliacrilamida de 8%, foram aplicados 20 μ g de proteínas totais de cada amostra previamente fervidas por 5 minutos. A corrida do gel foi realizada a 120 V, utilizando o tampão Tris-Glicina (25 mM Tris; 250 mM Glicina; 1% SDS). Após a corrida, o gel foi transferido para a membrana de nitrocelulose com tampão de transferência (24 mM Tris, 192 mM Glicina, 20% Metanol), por 60 minutos, a 100 V. A membrana foi bloqueada com tampão de bloqueio (5% leite desnatado Molico e 0,05% Tween-20 em PBS ou 5% BSA, 0,1% Tween-20 em TBS) por 30 min em agitação, a temperatura ambiente. Em seguida, os anticorpos primários foram diluídos em tampão de bloqueio nas seguintes concentrações: 1:1000 PI3K; 1:1000 AKT Total, 1:1000 p-AKT, 1:10.000 GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) e incubados com a membrana overnight, a -4°C. O GAPDH foi usado como controle interno das células. Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes por 5 minutos em 0,05% Tween-20 em PBS ou TBS e incubadas com os anticorpos secundários conjugados à HRP diluídos 1:10.000 em solução de bloqueio por 2 hora sob agitação, a temperatura ambiente. Após a incubação com anticorpo secundário as membranas foram lavadas três vezes por 5 minutos e PBS ou TSB em Tween-20 0,05% em PBS e reveladas utilizando 1ml de cada solução do kit ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent, por 5 minutos. Após a captura de imagens, a análise das quantidades de proteínas foi realizada pela normalização das intensidades das bandas de proteínas alvo para a intensidade de GAPDH.

Após a captura da imagem de pAKT foi realizado o stripping. Para a realização do mesmo, a membrana de pAKT foi lavada 3 vezes por 5 min com TBS e incubada por aproximadamente 8 minutos com o reagente RestoreTM PLUS Western Blot Stripping Buffer. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes por 5 min com TBS e incubada com a solução de bloqueio (5% BSA, 0,1% Tween-20 em TBS) por 30 min em agitação, a temperatura ambiente. Em seguida, foi incubada com o anticorpo primário AKT Total (1:1000) diluído em tampão de bloqueio e deixado overnight, a -4°C. Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes por 5 minutos em 0,05% Tween-20 em TBS e incubadas com o anticorpo secundário anti-Rb IgG HRP (1:10.000) em solução de bloqueio por 2 hora sob agitação, a temperatura ambiente. Após a incubação com anticorpo secundário as membranas foram lavadas três vezes por 5 minutos com TSB em Tween-20 0,05% e reveladas como já descrito.

4.13 Análise estatística

As análises estatísticas compreenderam os testes ANOVA. Experimentos feitos em triplicata, com valores de p menores do que 0,05 foram considerados significativos. Cálculos e gráficos feitos no programa GraphPad Prism 8, GraphPad Software, Inc.

5. RESULTADOS

5.1 Interferência das TQDs no processo autofágico

O desenvolvimento de vesículas ácidas no citoplasma das células é uma das características do processo autofágico. O laranja de acridina é um corante verde que uma vez aprisionado em vesículas ácidas sofre uma alteração no seu espectro de emissão para o vermelho. Quanto maior a autofagia, maior será a quantidade de vesículas ácidas e, portanto, maior essa conversão para o vermelho deixando a razão FL3/FL1 maior. Os resultados por marcação com Laranja de Acridina são mostrados na Figura 16. Os compostos 7 e 12 promoveram inibição significativa do processo autofágico em ambas as linhagens do câncer de pâncreas e o composto 17 promoveu diminuição da autofagia na CAPAN-2.

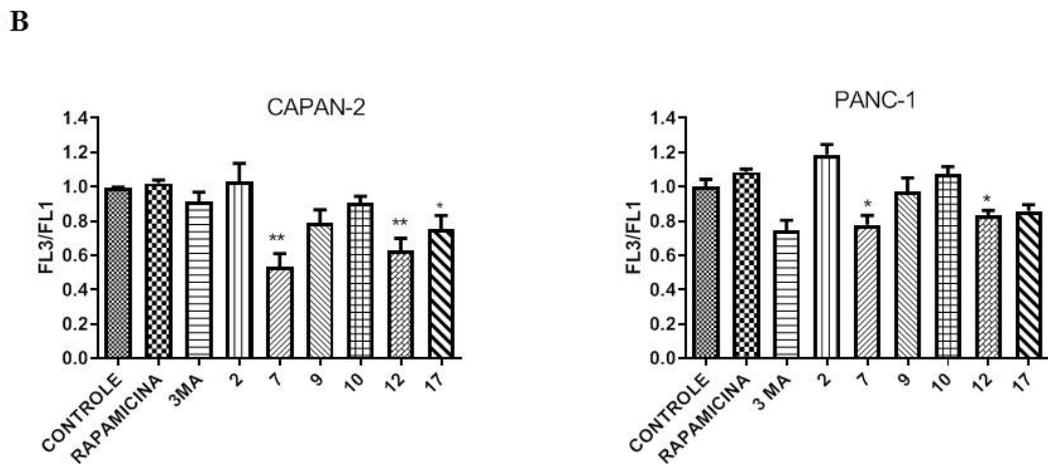
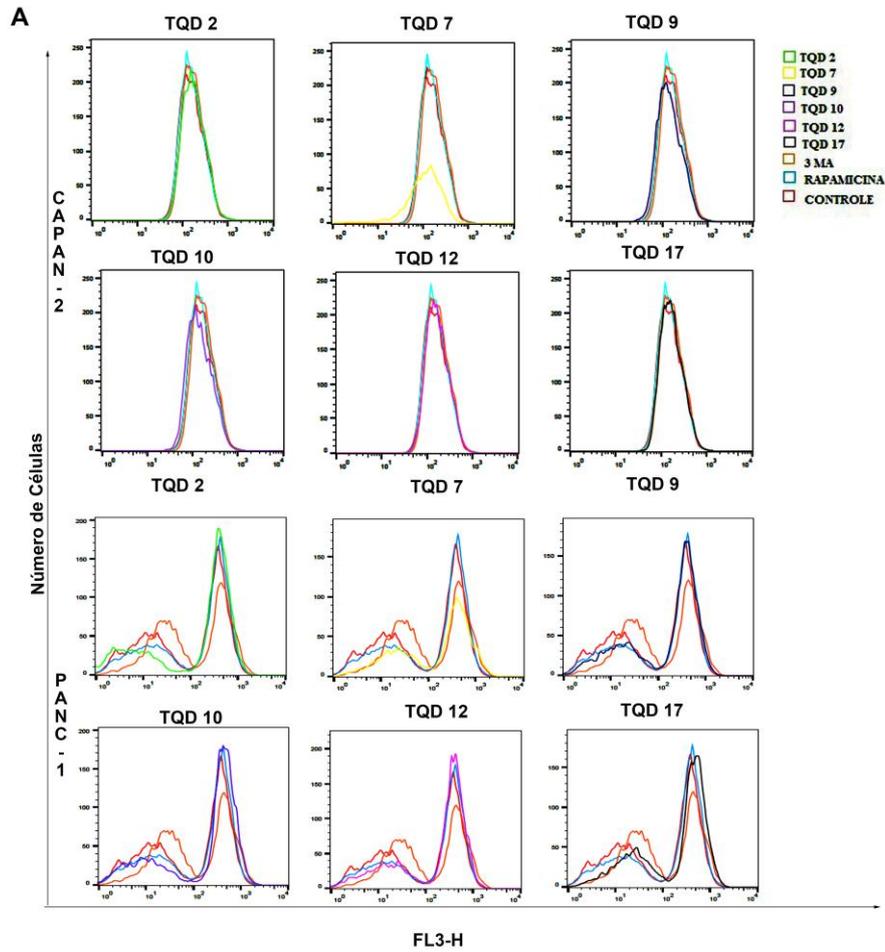


Figura 16. Presença de vesículas ácidas em células CAPAN-2 e PANC-1. A- Histograma representativo de três experimentos independentes **B-** Gráfico mostra que os compostos TQDs 7 e 12 promoveram redução da presença de vesículas ácidas em ambas as linhagens, e o composto 17 promoveu redução de vesículas ácidas nas células

CAPAN-2. Cada coluna representa a média e \pm SEM de três repetições experimentais. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

5.2 Análise da citotoxicidade

A triagem inicial teve como objetivo selecionar os compostos com atividade citotóxica maior contra as linhagens de adenocarcinoma pancreático, bem como verificar os efeitos citotóxicos contra as células normais. A atividade antitumoral dos seis TQDs foi verificada pelo ensaio de viabilidade celular por MTT utilizando-se as células de adenocarcinoma pancreático CAPAN-2 e PANC-1 e como controle de células normais HUVEC. Os ensaios foram realizados nos tempos de 24, 48 e 72 horas de tratamento.

As células PANC-1 mostraram-se mais sensíveis ao tratamento (Figura 17). No período de 24 horas de tratamento os compostos TQDs 2, 10 e 12 foram significativamente citotóxicos somente a partir da concentração de 400 μ M, o que foi observado também nos tempos de 48 h e 72 h. O composto TQD 7 induziu citotoxicidade significativa (Figura 17 B) em todas as concentrações utilizadas (25-400 μ M) e tempos analisados. Para a identificação do IC₅₀ para este derivado, foram realizados novos testes de viabilidade pelo método do MTT empregando-se concentrações inferiores das já utilizadas (Figura 17 C) em comparação com uma das drogas de escolha para o tratamento do câncer de pâncreas que é a 5- fluoruracila (5-FU). No tratamento por 24 horas a TQD 7 e a 5-FU induziram citotoxicidade significativa apenas quando empregados na concentração de 1 mM. O tratamento nos tempos de 48 h e 72 h a TQD 7 e a 5-FU induziram citotoxicidade significativa na concentração de 0,100 mM.

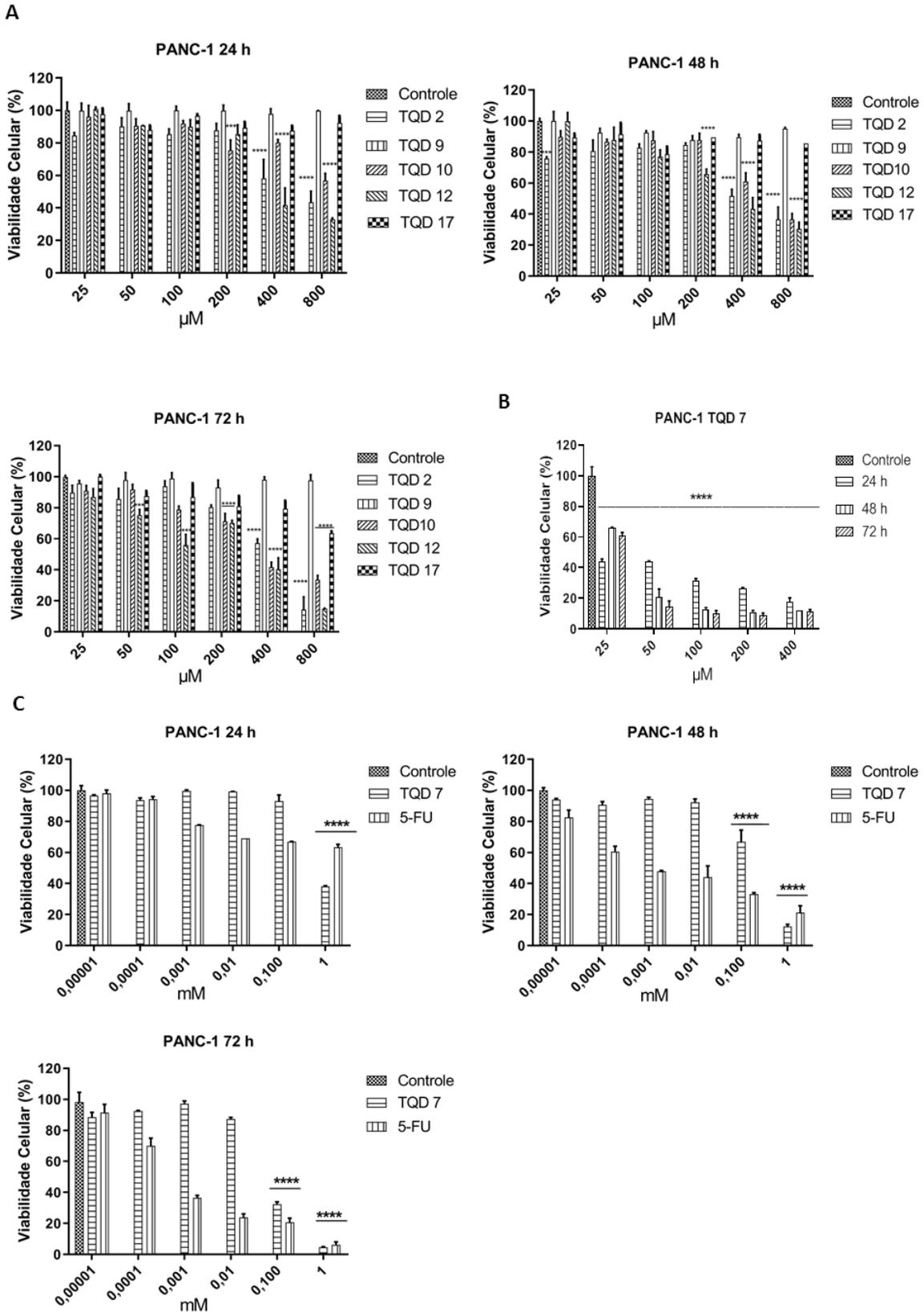


Figura 17. Efeito das TQDs sobre a viabilidade celular em células PANC-1. A- Mostra os efeitos sobre a viabilidade celular das células PANC-1 tratadas com TQDs 2,

9, 10, 12 e 17 nos tempos 24, 48, 72 h. **B-** Efeitos sobre a viabilidade celular das células PANC-1 tratadas com TQD 7 nos tempos 24, 48, 72 h. **C-** Efeitos sobre a viabilidade celular das células PANC-1 tratadas com TQD 7 e 5-FU nos tempos 24, 48, 72 h. Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata. **** $p < 0,0001$ altamente significativo comparados ao controle não tratado.

Baseado nos resultados de MTT o IC₅₀ foi calculado com o auxílio do programa GraphPad Prism.

Tabela 2. IC₅₀ dos compostos TQDs para células PANC-1. O IC₅₀ foi calculado para 24h, 48h e 72h em células PANC-1.

PANC-1 IC ₅₀ (μM)							
TEMPO (h)	TQD 2	TQD 7	TQD 9	TQD 10	TQD 12	TQD 17	5-FU
24	611,8	693,4	SEM EFEITO	>800	376,6	>800	>800
48	502,3	180,7	SEM EFEITO	571,6	342,7	>800	2,46
72	387,3	55,79	SEM EFEITO	344,8	204,7	>800	0,705

As células CAPAN-2 mostraram-se mais resistentes em relação às células PANC-1 ao tratamento com TQDs. Na figura 18 A são mostrados os resultados dos tratamentos com TQDs 2, 9, 10, 12 e 17. Somente os TQDs 2, 10 e 12 apresentaram resultados significativos nos tempos de 48 h (800 μM) e 72 h (a partir 400 μM). Já o tratamento com TQD 7 e 5-FU (Figura 18 B) foram significativos nos tempos de 24 h e 48 h apenas na concentração de 1 mM. Finalmente para o tempo de 72 h os resultados foram significativos para a TQD 7 e 5-FU em concentrações a partir de 0,01 mM. No entanto, embora a redução na viabilidade tenha elevada significância estatística, o percentual de células viáveis nas amostras submetidas aos tratamentos com 10 e 100 μM foi de 80,15% e 75,05%, respectivamente.

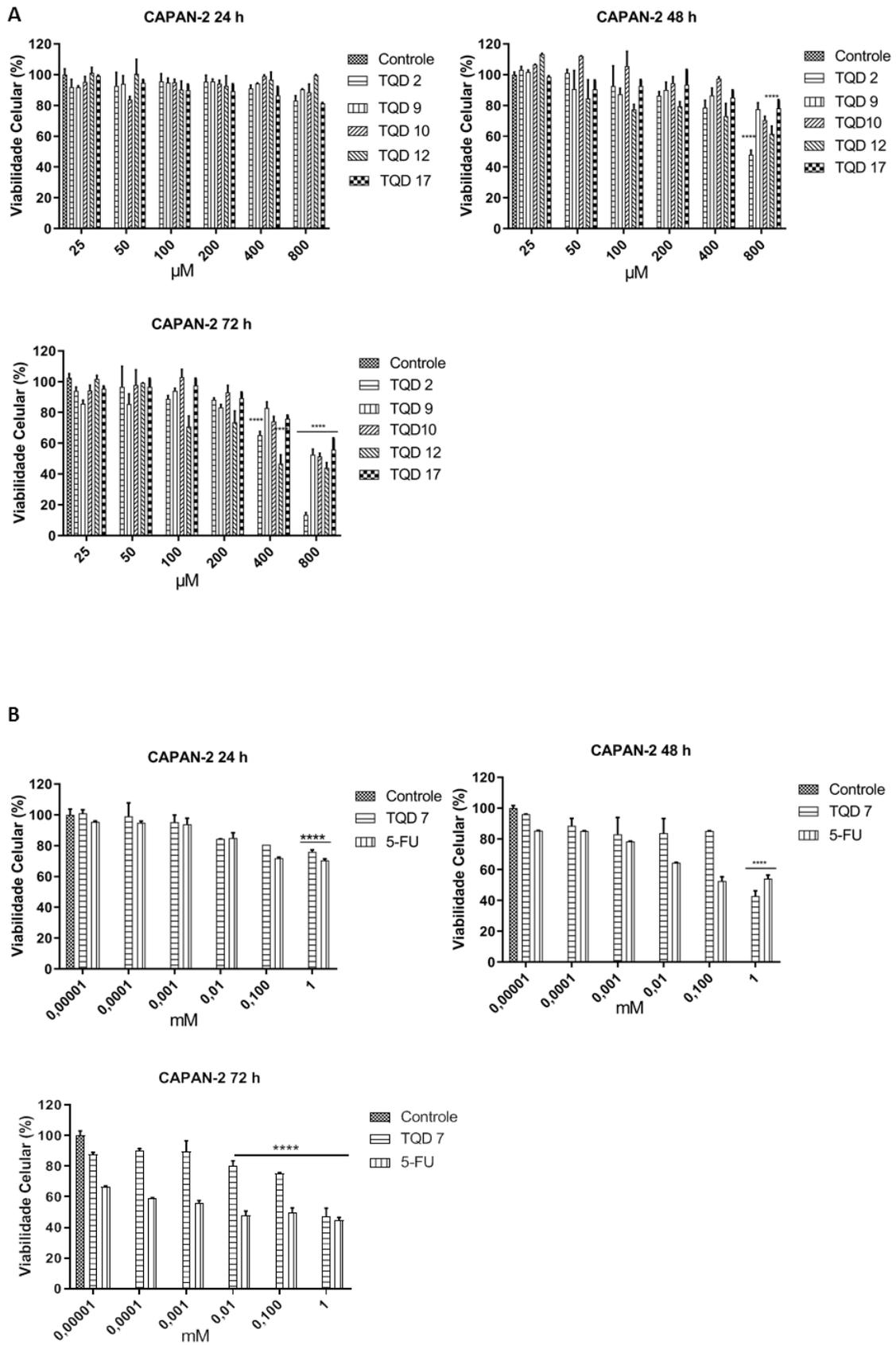


Figura 18. Efeito das TQDs sobre a viabilidade celular em células CAPAN-2. A- Mostra os efeitos sobre a viabilidade celular das células CAPAN-2 tratadas com TQDs 2,

9, 10, 12 e 17 nos tempos 24, 48, 72 h. **B-** Efeitos sobre a viabilidade celular das células CAPAN-2 tratadas com TQD 7 e 5-FU nos tempos 24, 48, 72 h. Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata. **** $p < 0,0001$ altamente significativo comparados ao controle não tratado.

Tabela 3. IC₅₀ dos compostos TQDs para as células CAPAN-2. O IC₅₀ foi calculado para 24h, 48h e 72 h em células CAPAN-2.

CAPAN-2 IC ₅₀ (μM)							
TEMPO (h)	TQD 2	TQD 7	TQD 9	TQD 10	TQD 12	TQD 17	5-FU
24	>800	>800	SEM EFEITO	SEM EFEITO	SEM EFEITO	>800	>800
48	791,7	>800	>800	>800	>800	>800	675,9
72	453,7	>800	>800	787,4	538,4	>800	27,77

Para observar os efeitos citotóxicos em células normais, foi realizado também o ensaio de MTT nas células HUVEC. Na figura 19 A é mostrado o resultado da viabilidade celular para as amostras tratadas com TQDs 2, 9, 10, 12 e 17. OS derivadas TQDs 10 e 12 induziram citotoxicidade em células normais de forma significativa no tempo de 24 h apenas nas amostras tratadas com 800 μM do composto. Para os tempos de 48 h e 72 h as TQDs 2, 10 e 12 também induziram a perda da viabilidade celular de forma significativa somente nas amostras tratadas nas concentrações de 800 μM. Já o tratamento com TQD 7 e 5-FU (Figura 19 B) induziram considerável citotoxicidade significativa nas células normais quando empregados na concentração de 0,1 mM nos tempos de 24 h e 48 h. Finalmente, para o tempo de 72 h de tratamento, a citotoxicidade induzida foi significativa em concentrações a partir de 0,001 mM.

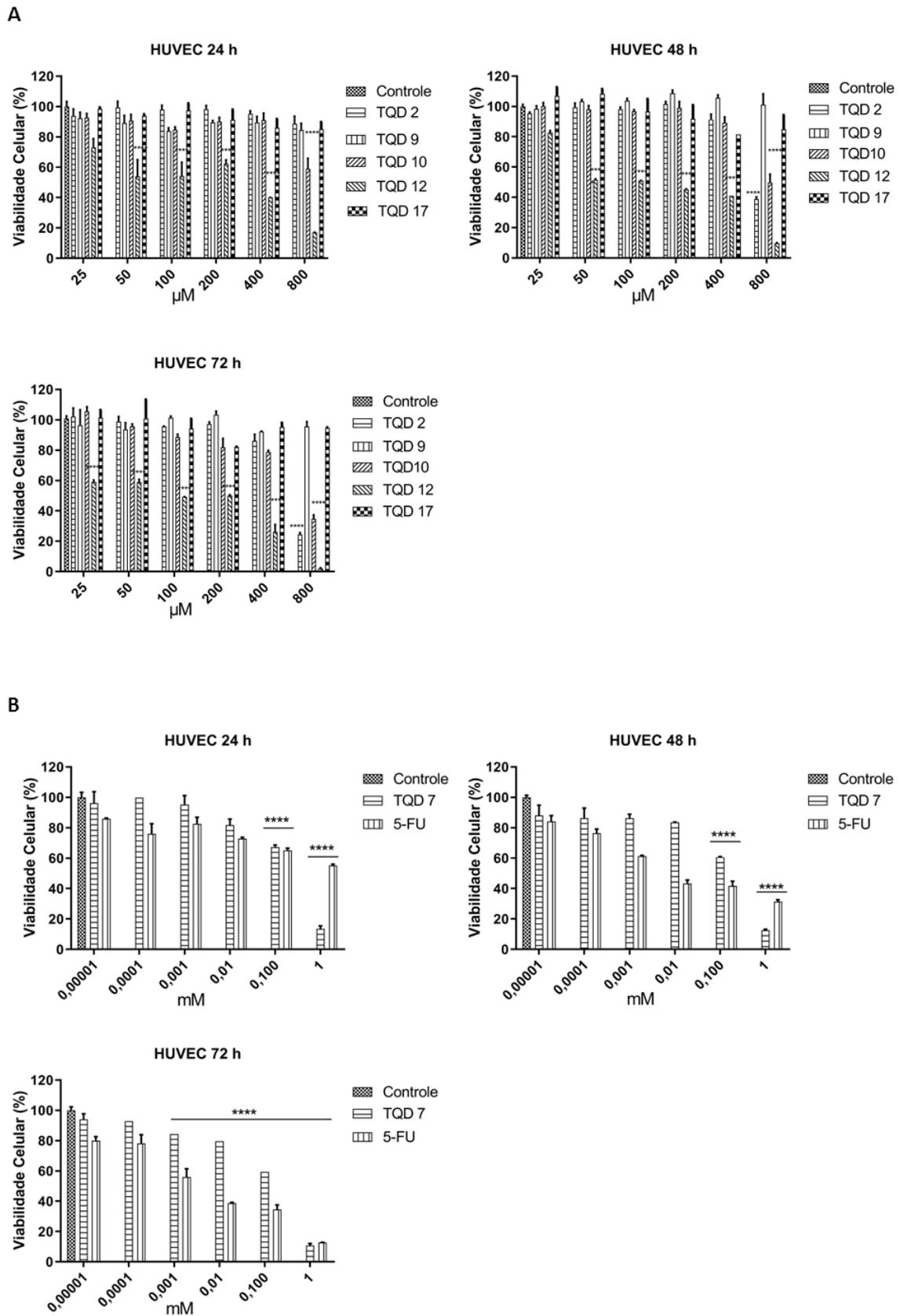


Figura 19. Efeito das TQDs sobre a viabilidade celular de HUVEC. A- Mostra os efeitos sobre a viabilidade celular das células HUVEC tratadas com os derivadas TQDs 2,

9, 10, 12 e 17 nos tempos 24, 48, 72 h. **B-** Efeitos sobre a viabilidade celular das células HUVEC tratadas com TQD 7 e 5-FU nos tempos 24, 48, 72 h. Os dados representam a média SEM de três experimentos independentes em triplicata. ****p< 0,0001 altamente significativo comparados ao controle não tratado.

Tabela 4. IC₅₀ dos compostos TQDs para as células HUVEC. O IC₅₀ foi calculado para 24h, 48h e 72h em células HUVEC.

HUVEC IC ₅₀ (µM)							
TEMPO (h)	TQD 2	TQD 7	TQD 9	TQD 10	TQD 12	TQD 17	5-FU
24	>800	468,1	SEM EFEITO	>800	147,8	SEM EFEITO	>800
48	716,3	425,5	SEM EFEITO	799,6	155,5	SEM EFEITO	197,0
72	608,80	402,6	SEM EFEITO	625,8	83,03	SEM EFEITO	152,5

A concentração inibitória de 50% das células (IC₅₀) CAPAN-2 E PANC-1 foi calculada com base no tratamento das células tumorais por 72 h e foi escolhido para a realização dos experimentos a partir do tópico 5.4 e estão apresentados abaixo:

Tabela 5. IC₅₀ estabelecido para os compostos selecionados para linhagem celular CAPAN-2.

CAPAN-2 IC ₅₀ (µM)			
TEMPO (h)	TQD 2	TQD 10	TQD 12
72	453,7	787,4	538,4

Tabela 6. IC₅₀ estabelecido para os compostos selecionados para linhagem celular PANC-1.

PANC-1 IC ₅₀ (µM)				
TEMPO (h)	TQD 2	TQD 7	TQD 10	TQD 12
72	387,3	55,79	344,8	204,7

Os compostos selecionados para seguir para as próximas fases experimentais foram TQD 2, TQD 10 e TQD 12 para CAPAN-2 e PANC-1 e TQD 7 para PANC-1. O derivado TQD 12 apesar de ter sido mais citotóxico para HUVEC do que para as linhagens de adenocarcinoma, foi incluído nos testes subsequentes devido à possibilidade de aprimoramento da sua estrutura e redução da citotoxicidade para células normais. Apesar de ter calculado o IC₅₀ da 5-FU para as células do trabalho, foram utilizados os valores da literatura. Assim, para CAPAN-2 foram utilizados 125 µg/mL (BELLONE et al., 2006) e para PANC-1 29,38 µM (HUANWEN et al., 2009). O controle experimental utilizado foram células incubadas apenas com o diluente dos compostos (DMSO) em quantidade equivalente à maior dose encontrada de IC₅₀, para ambas as linhagens.

5.3 Análise da morfologia celular após tratamento TQDs

O tratamento com TQDs 2, 7, 10 e 12 (Figuras 20 A e B) por 72 h nas concentrações máximas testadas causaram alterações que puderam ser detectadas na morfologia das células CAPAN-2 e PANC-1. O tratamento de 72h com TQDs 2, 10 e 12 induziu alta taxa de morte celular, por esta razão foi observado um número menor de células nas linhagens CAPAN-2 e PANC-1 por campo. As células remanescentes apresentaram-se com aspecto arredondado, sem os característicos pontos de adesão focal observados em células aderentes (cabeça de seta). Pôde-se observar que somente o composto TQD 12 induziu a perda de adesão focal (cabeça seta preta) nas células HUVEC. O tratamento com TQD 10 nas células CAPAN-2 e PANC-1 levou à vacuolização celular (asteriscos). Os compostos TQD 9 e 17 (Figura 20 A) não foram capazes de induzir modificações morfológicas perceptíveis, com as técnicas de análise empregadas nas 3 linhagens de células testadas, as quais permaneceram semelhantes às

células controle, com elevada confluência celular, e evidentes pontos de adesão focal que são típicos de células aderentes (seta preta). O composto TQD 7 (Figura 20 B) promoveu perda de adesão focal nas células CAPAN-2 e PANC-1 (cabeça de seta).

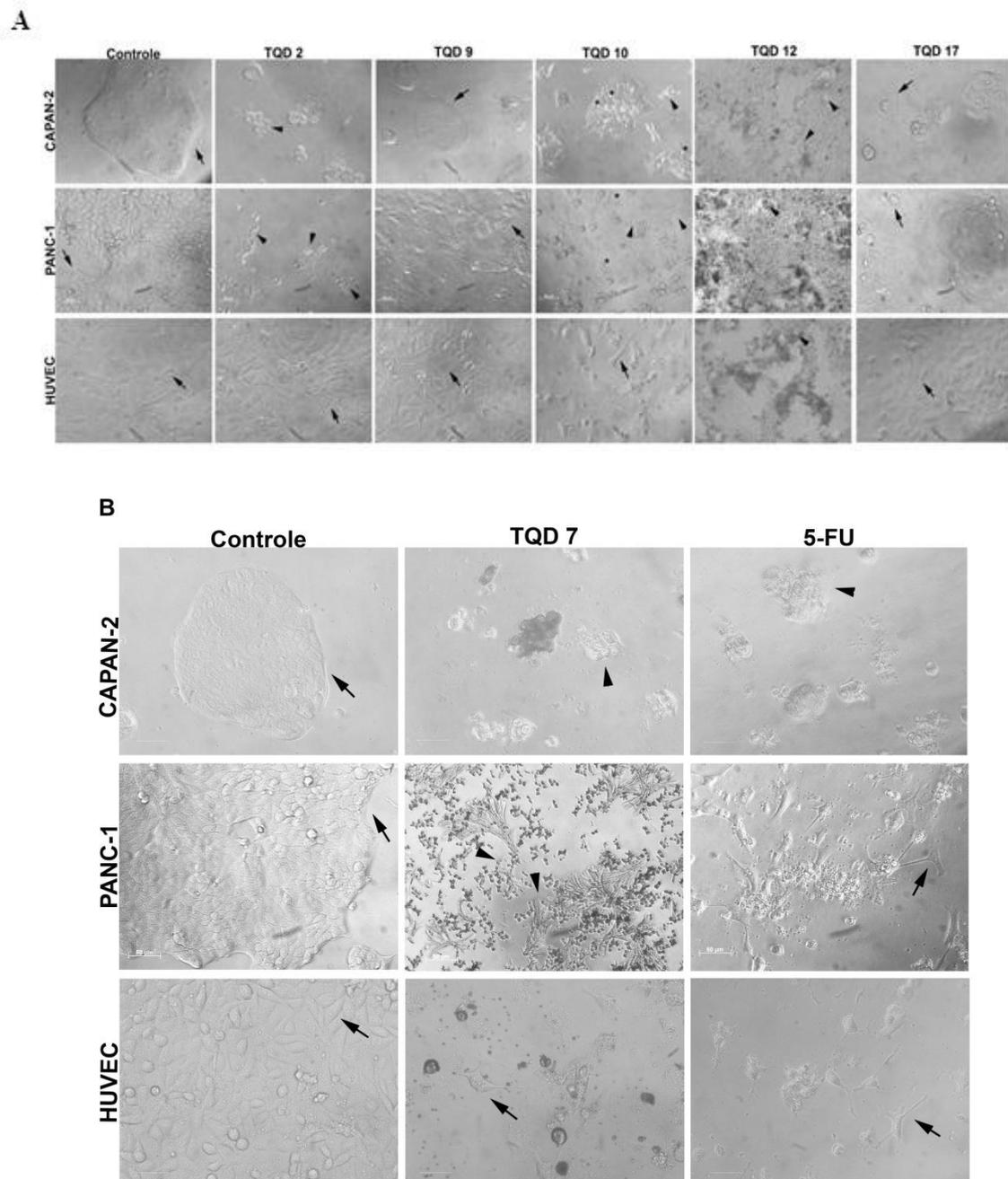


Figura 20. Alterações morfológicas em células CAPAN-2, PANC-1 e HUVEC após 72h de tratamento com TQDs. A- Células CAPAN-2, PANC-1 e HUVEC foram tratados com TQDs 2, 9, 10, 12 e 17 na concentração 800 μ M por 72h e as alterações morfológicas foram analisadas com auxílio do microscópio invertido de luz. **B-** Células

CAPAN-2, PANC-1 e HUVEC foram tratada com TQD 7 e 5-FU na concentração 1 mM por 72h. Barras de referência de 50 μ m.

5.4 Interferência do tratamento com TQDs no ciclo celular

O tratamento com os TQDs induziram alterações na distribuição celular nas diferentes fases do ciclo celular (Figura 21 A e B). Nas células CAPAN-2 o TQD 2 e 10 causaram a retenção das células na fase G1 do ciclo celular, elevando a porcentagem de células nesta fase de 49,6% para 68,83% e 76,3 %, respectivamente. Já nas células PANC-1 o composto TQD 2 promoveu um aumento de células retidas na fase G2/M de 23,73% para 48,43%. As TQDs 7, 10 e 12 promoveram retenção das células na fase G1 do ciclo celular aumentando a quantidade de células de 43,7 % para 92,73 %, 67 % e 66,56%, respectivamente. A 5-FU promoveu parada do ciclo celular na fase S como esperado, aumentando a quantidade de células de 31,76 % para 70,46%.

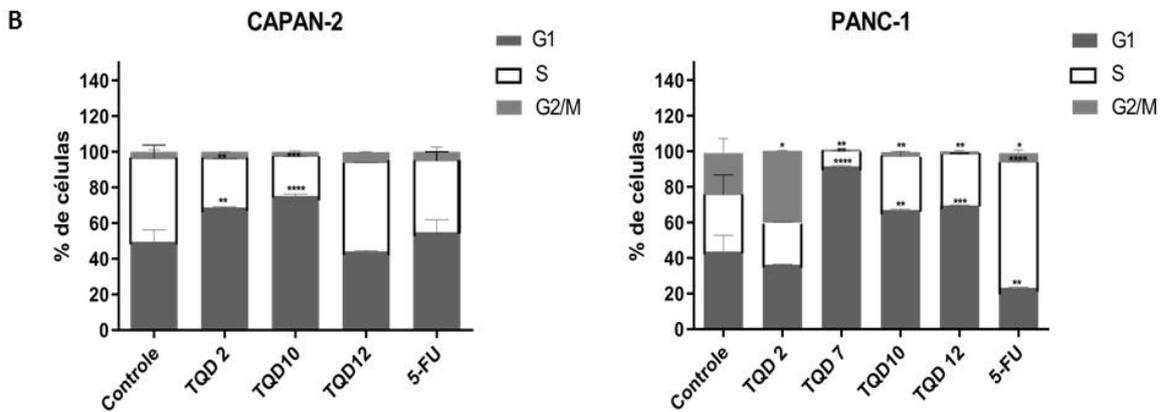
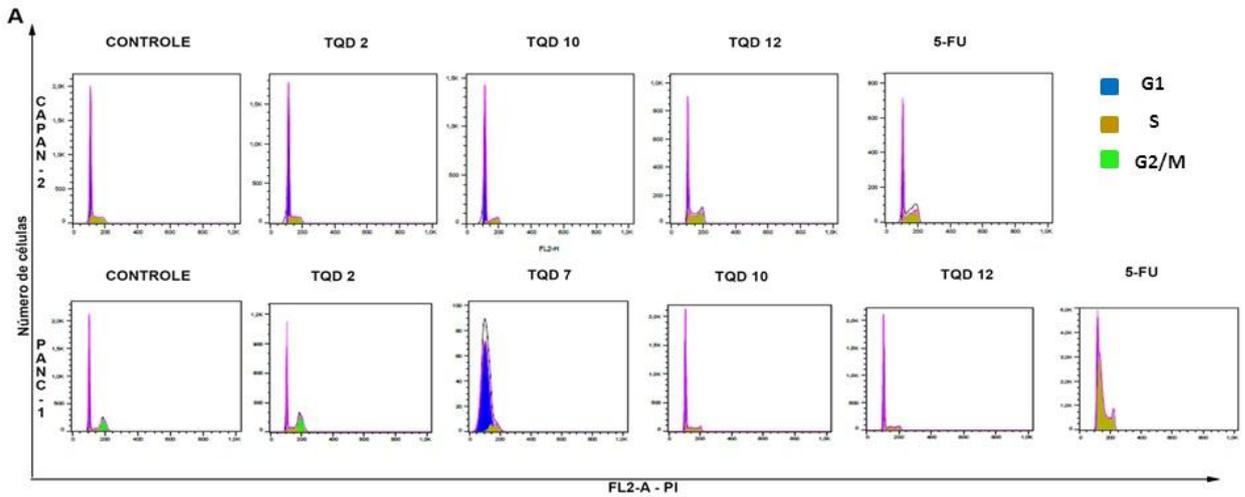


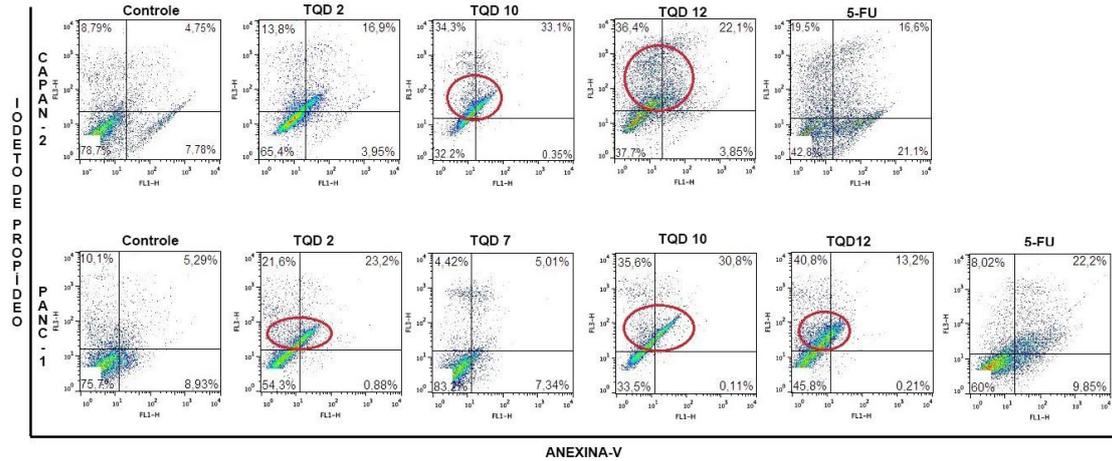
Figura 21. Interferência das TQDs no ciclo celular. Células CAPAN-2 e PANC-1 foram tratadas com os TQDs por 72h. Após este período as células foram incubadas com PI para análise do conteúdo de DNA em citômetro de fluxo. **A-** Os histogramas correspondem a um experimento representativo de três experimentos independentes que mostram a distribuição das células controle e tratadas nas diferentes fases do ciclo celular: G1(azul), S(bege) e G2/M(verde). **B-** Quantificação do porcentagem de células encontradas em cada fase do ciclo celular. Os dados representam três experimentos independentes expressos como a porcentagem média de células em cada fase do ciclo celular \pm SEM de três experimentos independentes *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001 e ****P<0,0001 comparados ao controle não tratado.

5.5 Análise do perfil de morte celular provocado por TQDs

Para verificar qual o tipo de morte seria induzida pelas TQDs as células CAPAN-2 e PANC-1 foram tratadas com IC_{50} de cada composto por 72 horas e em seguida foram marcadas com anexina -V e iodeto de propídio.

Na figura 22 (A e B) pode-se observar nos controles a presença de uma quantidade basal de células mortas por necrose em ambas as linhagens celulares, a qual foi aumentada com os tratamentos pelos compostos TQD 10 e 12. A morte celular por apoptose induzida pelo TQD 10 foi de 28,15% e pelo TQD 12 de 19,46% nas células CAPAN-2. Já o tratamento com 5-FU promoveu morte celular por necrose, apoptose inicial e tardia. Nas células PANC-1 também foi observada morte celular por apoptose tardia induzida pelo TQD 2 (20,05%), 10 (27%) e 12 (17,63%). O perfil de morte celular causado pelo tratamento com TQD 7 nesta linhagem se assemelhou ao do controle. O tratamento com 5-FU em células PANC-1 culminou na morte da células por apoptose tardia.

A



B

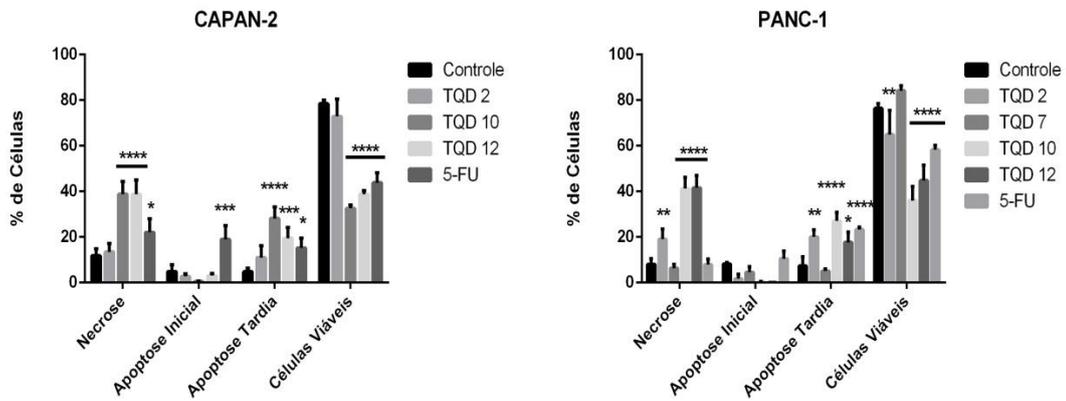


Figura 22 - Tratamento com as TQDs induz morte celular por necrose e apoptose.

A- Figura representa um experimento independente. O quadrante inferior esquerdo corresponde às células viáveis, quadrante superior esquerdo às células em necrose, o quadrante superior direito às células em apoptose tardia, e quadrante inferior direito às células em apoptose inicial. **B-** Porcentagem de células em necrose, apoptose inicial, apoptose tardia induzidas por 72h de tratamento. Os dados representam a média ± SEM de três experimentos independentes $****P < 0,0001$ comparados ao controle não tratado.

5.6 Efeitos das TQDs na proliferação de células de adenocarcinoma pancreático

A colchicina é um agente que para a divisão celular na metáfase e quando utilizado em ensaios com CFSE, permite observar a intensidade de fluorescência máxima acumulada nas células que não se dividem, como o pico de fluorescência inicial. Nas células CAPAN-2 (Figura 23) o tratamento com as três TQDs promoveram inibição da proliferação de forma estatisticamente significativa quando comparados ao controle não tratado. Já nas células PANC-1 (Figura 23) apenas os compostos TQD 2 e 10 foram capazes de inibir a proliferação celular de forma semelhante ao tratamento com a colchicina.

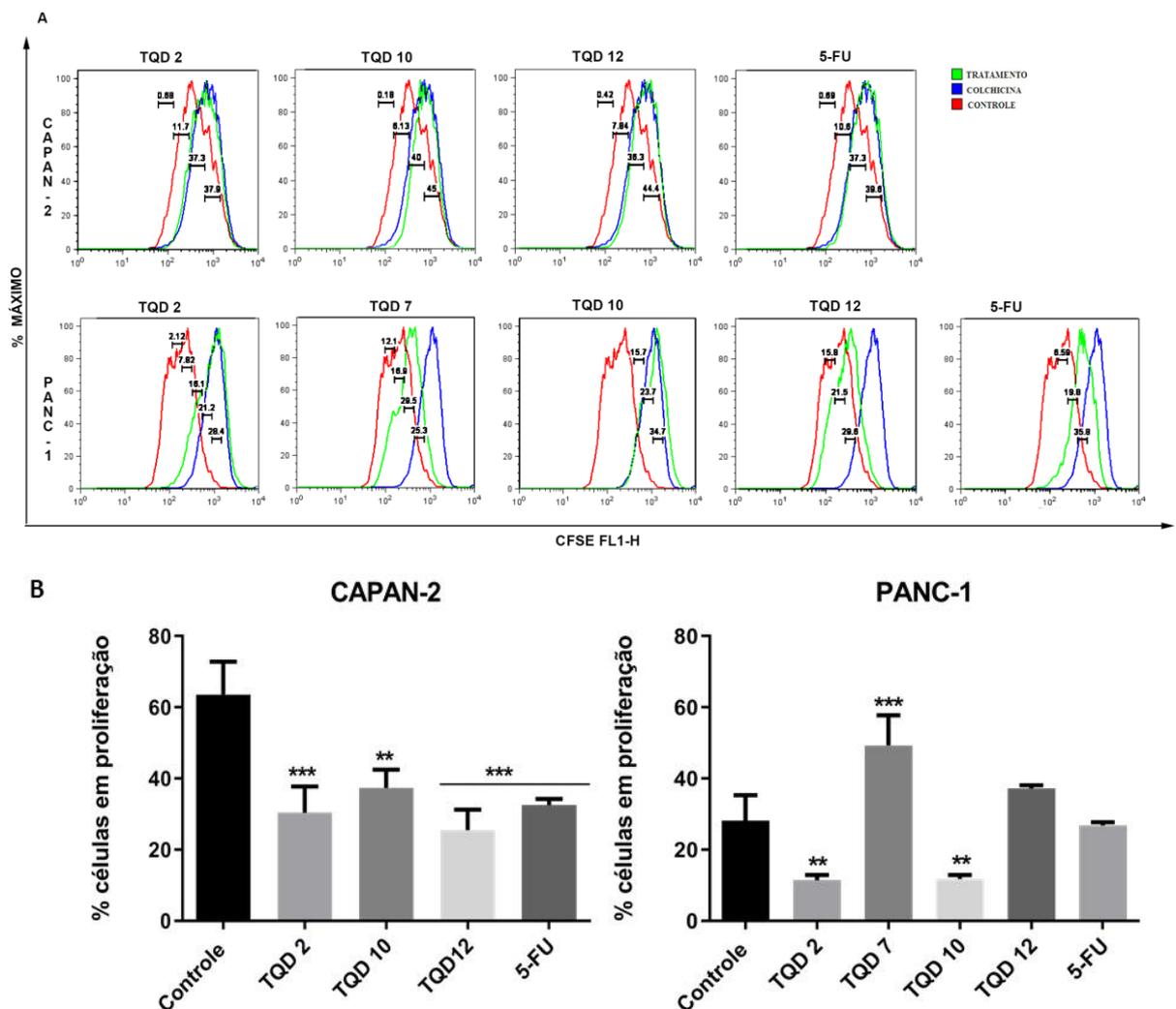


Figura 23. TQDs inibem a proliferação de células de adenocarcinoma pancreático. A- Intensidade de fluorescência do CFSE dos controles positivo (tratamento com 10 μ M de colchicina por 1 h), negativo e de células tratadas com os TQDs. Os histogramas correspondem a um experimento representativo de três experimentos independentes. **B-**

Representação da porcentagem média de células que proliferaram. Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes **P<0,01 e ***P<0,001 significativo comparados ao controle não tratado.

5.7 Análise de células tronco tumorais após o tratamento com TQDs

Os principais marcadores para a identificação de células-tronco do câncer de pâncreas incluem CD133 (proeminina-1), ALDH1A3, CD44, CD24 e ESA (FITZGERALD; MCCUBREY, 2014). O perfil CD44⁺/CD24⁺ para células-tronco tumorais não foi modificado após o tratamento com os TQDs 2, 10 e 12, traduzido pela ausência de mudança significativa na porcentagem destas populações nas linhagens CAPAN-2 e PANC-1 como mostrados na figura abaixo. Já o tratamento das células PANC-1, principalmente com os derivados TQD 7 e 10, ocasionou um aumento do fenótipo CD44⁺/CD24⁺.

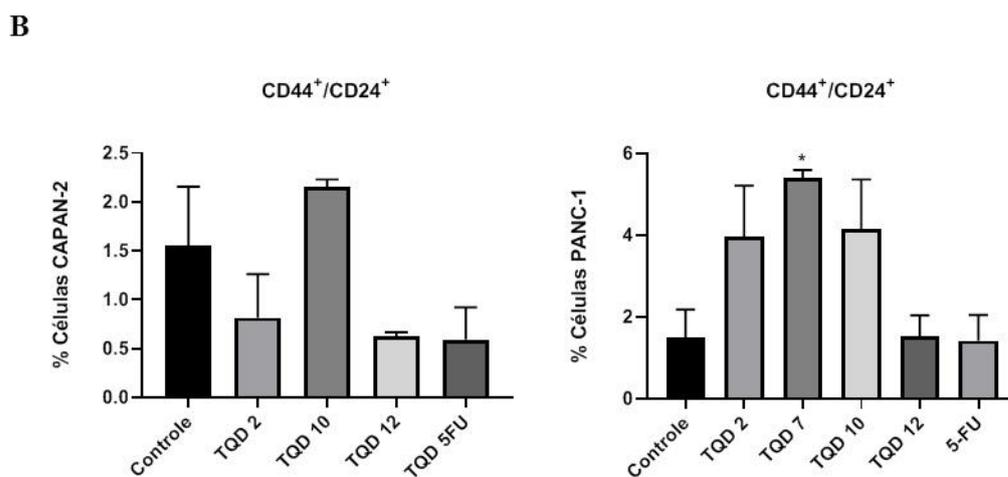
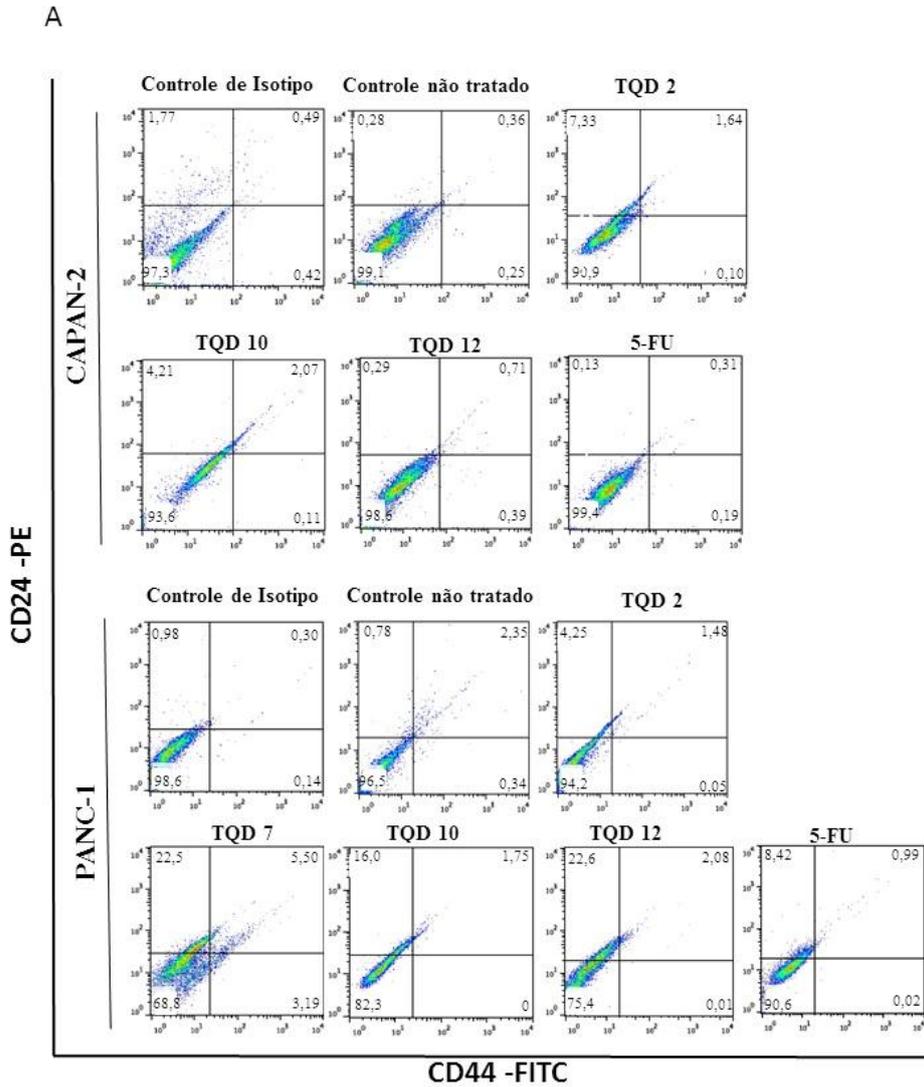


Figura 24: Determinação dos fenótipos CD44⁺/CD24⁺ para células CAPAN-2 e PANC-1. A- A figura representa um experimento independente. **B-** Porcentagem de células CAPAN-2 e PANC-1 com fenótipos CD44⁺/CD24⁺ antes e após o tratamento

com TQDs. Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes .
 *P<0,05 comparados ao controle.

Tabela 7. Porcentagem das subpopulações definidas pela combinação dos marcadores de células tronco-tumorais, CD44 e CD24, em células CAPAN-2 controle ou tratadas. Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes.

CAPAN-2	Fenótipos (Média \pm SEM)			
	CD44 ⁻ /CD24 ⁻	CD44 ⁻ /CD24 ⁺	CD44 ⁺ /CD24 ⁻	CD44 ⁺ /CD24 ⁺
CONTROLE	97,48 \pm 0,69	0,68 \pm 0,27	0,30 \pm 0,06	1,55 \pm 0,60
TQD 2	94,50 \pm 1,99	4,66 \pm 1,55	0,06 \pm 0,032	0,82 \pm 0,45
TQD 10	91,84 \pm 3,09	5,89 \pm 3,21	0,11 \pm 0,04	2,15 \pm 0,08
TQD 12	98,11 \pm 0,64	0,69 \pm 0,40	0,58 \pm 0,26	0,62 \pm 0,04
5-FU	98,9 \pm 0,55	0,34 \pm 0,24	0,18 \pm 0,01	0,59 \pm 0,33

Tabela 8. Porcentagem das subpopulações definidas pela combinação dos marcadores de células tronco-tumorais, CD44 e CD24, em células PANC-1 controle ou tratadas. Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes.

PANC-1	Fenótipos (Média \pm SEM)			
	CD44 ⁻ /CD24 ⁻	CD44 ⁻ /CD24 ⁺	CD44 ⁺ /CD24 ⁻	CD44 ⁺ /CD24 ⁺
CONTROLE	93,18 \pm 2,98	5,17 \pm 2,92	0,15 \pm 0,10	1,50 \pm 0,68
TQD 2	77,6 \pm 8,44	18,38 \pm 7,18	0,03 \pm 0,01	3,95 \pm 1,26
TQD 7	72,18 \pm 4,18	15,53 \pm 6,77	6,93 \pm 2,59 ^{**}	5,39 \pm 0,20 [*]
TQD 10	75,93 \pm 10	19,81 \pm 9,99	0,13 \pm 0,13	4,15 \pm 1,22
TQD 12	86,73 \pm 2,02	11,66 \pm 5,71	0,12 \pm 0,11	1,53 \pm 0,51
5-FU	94,83 \pm 2,14	3,65 \pm 2,41	0,14 \pm 0,09	1,42 \pm 0,63

5.8 Efeitos das TQDs na capacidade de sobrevivência e formação de colônias

O ensaio de formação de colônias é um teste *in vitro* de sobrevivência celular baseado na avaliação da habilidade das células em proliferar e formar colônias. O tratamento com o composto 10 inibiu a formação de colônias pelas células CAPAN-2 como mostrado na figura 25, já os demais compostos não alteraram a capacidade das células em formarem colônias.

CAPAN-2

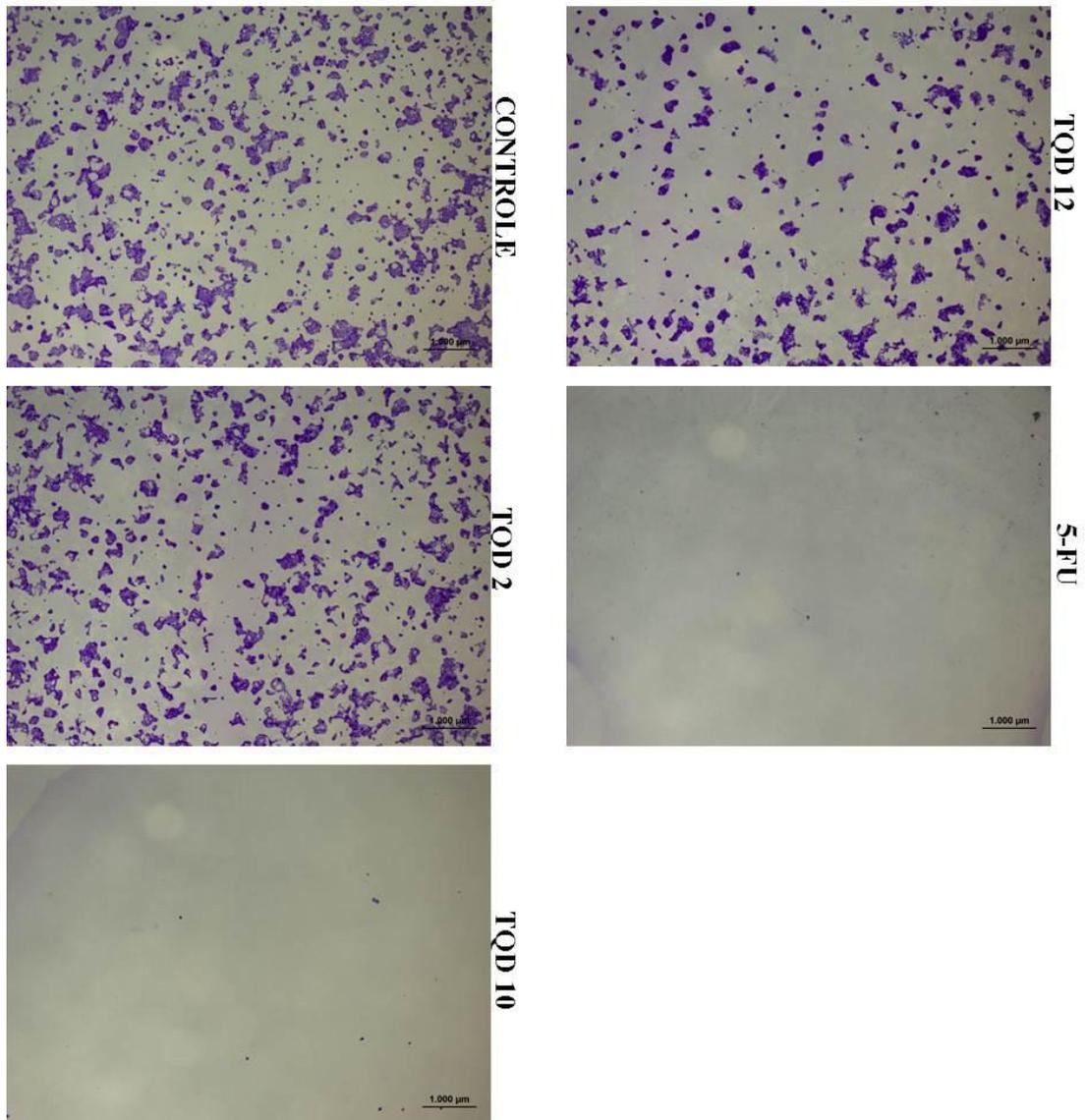


Figura 25: Efeito das TQDs selecionados na formação de colônia de células CAPAN-2. A figura mostra a capacidade de formação de colônias das células após o tratamento por 24 h com as TQDs. As células ficaram em cultura por 10 dias. Barras de referência 1.000 µm.

Nas células PANC-1 os compostos 7 e 10 (figura 26) induziram a maior inibição da formação de colônia. Sendo que em ambas as linhagens o tratamento com 5-FU inibiu fortemente a capacidade de crescimento de células cancerígenas pancreáticas.

PANC-1

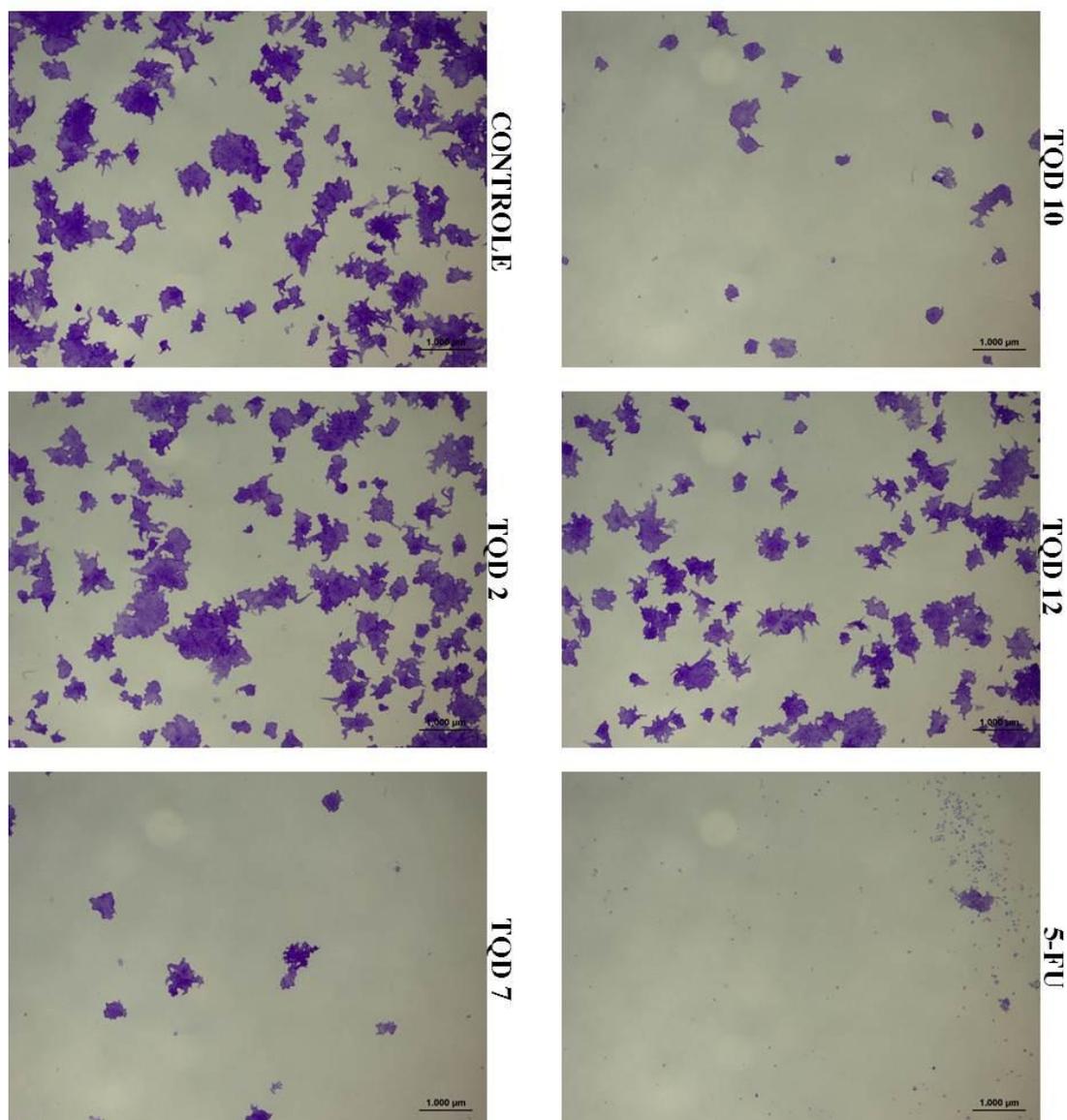


Figura 26: Efeito das TQDs selecionados na formação de colônia de células PANC-1. A figura mostra a capacidade de formação de colônias das células após o tratamento por 48 h com as TQDs. As células ficaram em cultura por 7 dias. Barras de referência 1.000 µm

5.9 Análise da expressão de PI3K e AKT

Foi realizado teste de Western blot para avaliar os níveis de expressão de PI3K e AKT, proteínas importantes em uma das vias dependentes de RAS. Nas células CAPAN-2 o tratamento com o composto 10 levou a uma redução considerável da expressão de PI3K e reduziu ligeiramente o nível de expressão de AKT total embora não alterando os níveis de ativação desta proteína. Já os demais compostos não alteram de forma considerável a expressão das proteínas analisadas.

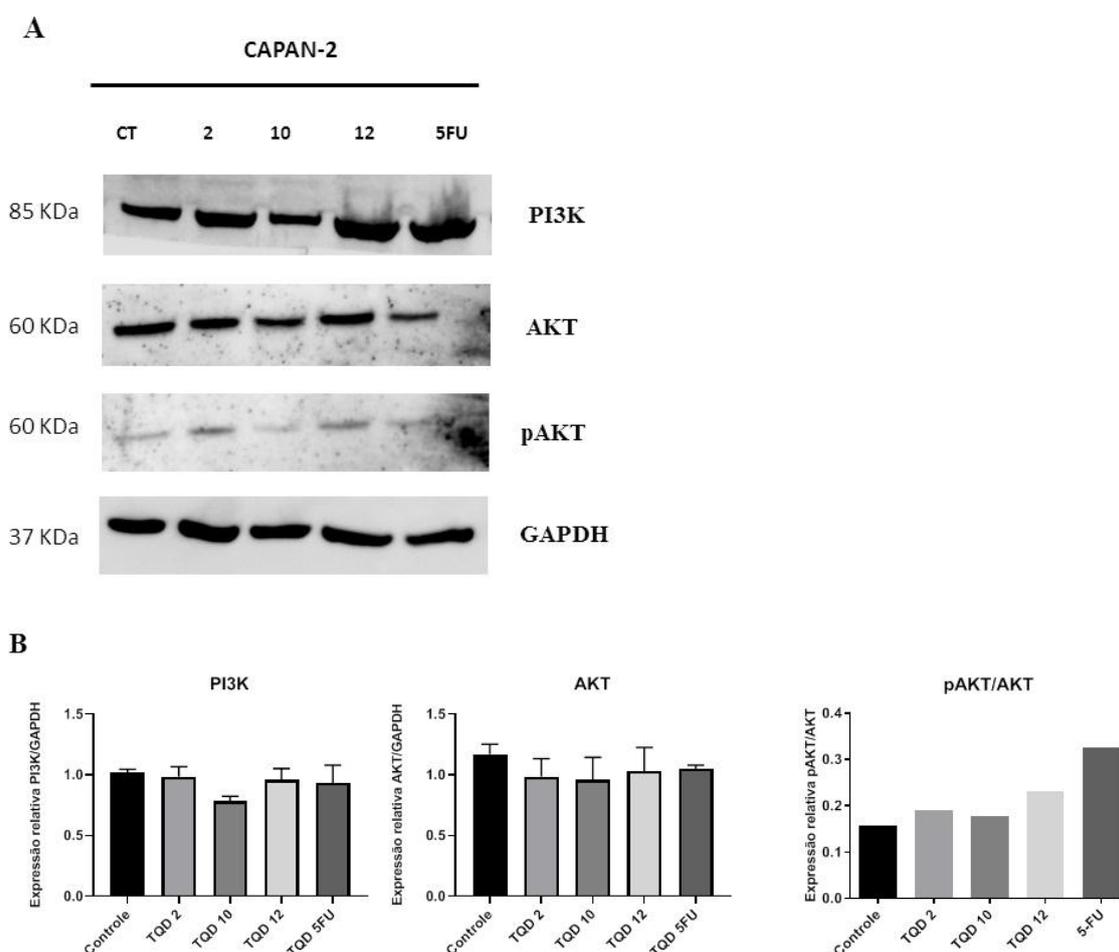


Figura 27: Níveis de expressão PI3K, AKT na linhagem CAPAN-2. As bandas referentes aos grupos controle (sem tratamento) e tratados (24 h) nas células CAPAN-2. A quantificação dos níveis de expressão das proteínas dos tratamentos em relação às células não tratadas após normalização da intensidade das bandas para a intensidade de GAPDH correspondente. Cada coluna representa a média e desvio padrão de três repetições experimentais. * $p < 0,05$.

Com relação aos níveis de expressão destas proteínas na linhagem PANC-1, o tratamento com TQD 10 reduziu significativamente a expressão de PI3K e AKT como mostrado na figura abaixo. Os compostos 2 e 7 também ocasionaram uma redução da expressão de PI3K e AKT total, entretanto de forma menos expressiva.

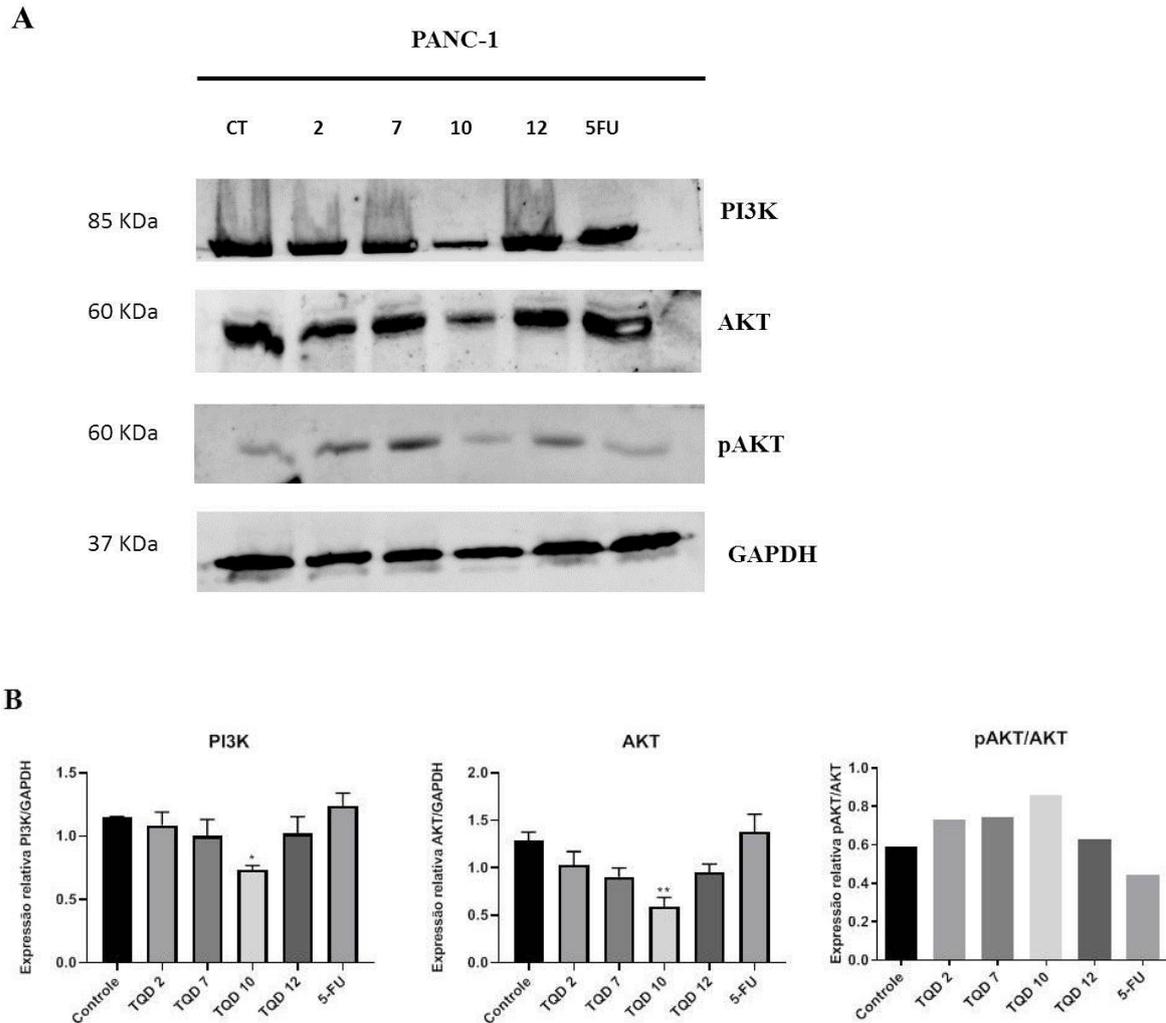


Figura 28: Níveis de expressão PI3K, AKT em linhagem de PANC-1. As bandas são referentes aos grupos controle (sem tratamento) e tratados (24 h) nas células PANC-1. A quantificação dos níveis de expressão das proteínas dos tratamentos em relação às células não tratadas após normalização da intensidade das bandas para a intensidade de GAPDH correspondente. Cada coluna representa a média e desvio padrão de três repetições experimentais. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

5.10 Compilação dos resultados

Os resultados se encontram compilados para melhor visualização:

Tabela 9. Compilação dos resultados. Efeitos de cada tratamento em cada um dos parâmetros analisados.

	TQD 2	TQD 7	TQD 10	TQD 12
Interferência no processo de autofagia	NÃO	SIM	NÃO	SIM
Alteração da morfologia celular	SIM	SIM	SIM	SIM
Alteração no ciclo celular	SIM	SIM	SIM	SIM
Alteração no perfil de morte celular	SIM	NAO	SIM	SIM
Inibição da proliferação	SIM	NÃO	SIM	SIM
Aumento significativo de células tronco tumorais	NÃO	SIM	NÃO	NÃO
Alteração na capacidade de formação de colônia	NÃO	SIM	SIM	NÃO
Atividade inibitória da via PI3K/AKT	NÃO	NÃO	SIM	NÃO

6. DISCUSSÃO

A via autofágica se encontra ativa na maioria das células, e desempenha um papel importante no desenvolvimento, diferenciação e homeostase celular (YANG; KLIONSKY, 2009). A desregulação no processo autofágico pode levar à patogênese e inflamação crônica, resultando no desenvolvimento tumoral. No câncer, o processo autofágico possui um papel de duplicidade, funcionando tanto como supressor de tumores, reduzindo a probabilidade de estresse celular e eventos de inflamação crônica; quanto como um fator de sobrevivência do mesmo, promovendo a reciclagem de nutrientes e de ATP durante déficit metabólico induzido pela quimioterapia (NAVARRO-YEPES et al., 2014; RAO et al., 2014). Algumas células cancerígenas, particularmente conduzidas pelo oncogene K-Ras, como no caso de células de ADP, dependem de elevados níveis de autofagia, para fugir do estresse metabólico e morte celular (MANCIAS; KIMMELMAN, 2011). Assim, o nosso trabalho mostrou que as TQDs 7, 12 e 17 inteferem no processo autofágico uma vez que as células de ADP possuem autofagia basal elevada, e sua redução promove diminuição do processo de oxidação e fosforilação que resulta em supressão do crescimento de células cancerígenas (MANCIAS; KIMMELMAN, 2011; YANG et al., 2011; YANG; KLIONSKY, 2009).

A viabilidade celular das células PANC-1 foi mais afetada do que as células CAPAN-2 em decorrência do tratamento com as TQDs. A TQD 2 foi a que apresentou maior seletividade para células tumorais uma vez que para este composto foi determinado um valor de IC_{50} maior para células normais. As demais TQDs utilizadas podem passar por aprimoramento da molécula, com adição de novas substituições em sua cadeia, visando diminuição do IC_{50} e citotoxicidade para células normais.

Uma das atividades comuns apresentadas por fármacos antitumorais é a sua capacidade de interferir na progressão do ciclo celular, podendo causar a retenção das células em diferentes fases, dependendo do seu alvo. Totiger et al.(2019) demonstraram que Uro A inibe a proliferação ADP pela parada do ciclo celular na fase G1, através do direcionamento terapêutico da via PI3K com seus alvos AKT e mTOR. O mTOR é fosforilado diretamente pelo Akt ativado, resultando na transição do ciclo celular da fase G1 para S (HUANG et al., 2012). Uma vez que ocorre a inibição da via PI3K/AKT, acontece a retenção das células em G1, como foi observado nas amostras tratadas com TQD 10. GYSIN et al (2005) testaram os efeitos da inibição farmacológica de MEK em 8 linhagens de células de câncer de pâncreas humano, sendo que, em todas as linhagens

testadas a inibição de MEK ocasionou a interrupção da proliferação celular acompanhada da retenção destas células na fase G1 do ciclo celular com inibição da expressão da proteína cinase 2 dependente de ciclina (cdk2), importante para transição da fase G1 para fase S do ciclo celular. Assim, a via de sinalização RAF/MEK/ERK com a inibição de MEK resulta em um efeito citostático (GYSIN et al., 2005). Nós avaliamos o perfil do ciclo celular das células tratadas com TQDs em duas linhagens de adenocarcinoma pancreático. De maneira geral as TQDs em ambas as linhagens promoveram retenção do ciclo celular em G1, sendo que somente a TQD 2 promoveu a inibição do ciclo em G2. Como esperado, todas as TQDs interferiram com o ciclo celular de forma diferente da inibição causada pelo fármaco 5-FU que na PANC-1 promoveu parada do ciclo na fase S. O dano celular induzido por 5-FU envolve uma perda ou acumulação de células na fase S e parada G1 / S, o que está de acordo com a sua atividade que é a inibição da timidilato sintase bloqueando a síntese da pirimidina timidina, que é um nucleosídeo essencial para síntese do DNA (ASARA et al., 2013).

A morte celular geralmente pode ser classificada em diferentes categorias, no entanto a morte celular induzida por ação de agentes quimioterápicos se enquadram majoritariamente dentro de duas destas categorias principais: (1) a apoptose que representa um evento programado de morte celular e intrinsecamente antiinflamatório e (2) a necrose que representa, no caso da quimioterapia a perda da capacidade de manutenção do metabolismo celular, o que inviabiliza a estabilidade estrutural da célula provocando a desestruturação dos componentes membranares, seus rompimento com extravasamento do conteúdo citoplasmático, sendo portanto um tipo de morte celular indutora de inflamação (KITANAKA; KUCHINO, 1999).

O processo de apoptose e necrose podem ocorrer simultaneamente dependendo de fatores como a intensidade e duração do estímulo, grau de depleção de ATP e disponibilidade de caspases (ELMORE, 2007a; ZEISS, 2003). A necrose é considerada uma morte celular acidental não regulada causada por indutores de estresse inespecíficos ou não fisiológicos. No entanto, a identificação de necrose programada apoiou a existência de múltiplos mecanismos de morte celular regulados não apoptóticos. Vários tipos de necrose programada foram relatados, como a necroptose, um tipo de morte celular necrótica regulada que compartilha várias vias principais de sinalização com a apoptose (CHEN; KANG; FU, 2018; NIKOLETOPOULOU et al., 2013; SHI et al., 2019). Algumas das principais alterações morfológicas que ocorrem na necrose são o aumento do volume celular, presença de vacúolos citoplasmáticos em abundância,

distinção do retículo endoplasmático, formação de bolhas citoplasmática, mitocôndrias inchadas, rompidas ou condensadas, desagregação e desprendimento de ribossomos da superfície do retículo endoplasmático, lisossomas inchados ou rompidos, e finalmente a perda da estabilidade com a ruptura da membrana celular o que provoca o extravazamento do conteúdo citoplasmático e desencadeia a ativação dos processos inflamatórios (CAGNOL; CHAMBARD, 2010; ELMORE, 2007b; KREEGER et al., 2009; ROCK; KONO, 2008).

A indução de apoptose em células tumorais é um processo celular importante para eliminar células malignas e impedir o surgimento de tumores. O desenvolvimento do tumor e sua manutenção dependem da expressão contínua de RAS ativada que atua inibindo a apoptose (CHANDRASEKAR et al., 2003; CHIN et al., 1999; FISHER et al., 2001). Porém, Ras oncogênica pode ter funções pró e antiapoptóticas mediada por diferentes vias efetoras. A sinalização PI3-K / AKT e NF-κB é importante para anular a apoptose, uma vez que NF-κB demonstrou induzir a transcrição de proteínas antiapoptóticas, favorecendo a sobrevivência de células com RAS ativadas, exercendo um papel importante na manutenção das células neoplásicas (CHANG et al., 2003; COX; DER, 2003). O fator de transcrição NF-κB é inativado quando complexado com IκB no citosol. O AKT ativada induz a fosforilação de IκB, resultando na translocação de NF-κB livre para o núcleo e na ativação transcricional de genes anti-apoptóticos. Já o Akt inativado promove a apoptose (HUANG et al., 2012). Os nossos resultados demonstraram que a TQD 2 nas células PANC-1 promoveu apoptose tardia e os TQDs 10 e 12 nas duas linhagens tumorais promoveram também o processo de apoptose tardia, fornecendo mais um indício de que os TQDs podem interferir nas atividades das vias que são nestas células tumorais controladas pela proteína RAS. Os nossos resultados são semelhantes aos obtidos com o tratamento das amostras com 5-FU, o qual por outras vias promove a morte celular por apoptose, tendo como evento iniciador da apoptose induzida por esse fármaco, a ativação da caspase-9 (MHAIDAT; BOUKLIHACENE; THORNE, 2014; NITA et al., 1998).

A proliferação celular é considerada um processo importantíssimo relacionado com a iniciação, manutenção e progressão do tumor (BARRETT, 1993). A via de sinalização PI3K / AKT é uma importante via de sinalização que leva ao recrutamento e ativação da AKT, a qual regula o crescimento, a proliferação e a sobrevivência celular, fosforilando uma variedade de proteínas anti-apoptóticas e relacionadas ao ciclo celular,

bem como diversos fatores de transcrição (YUAN; CANTLEY, 2008; ZHOU et al., 2019).

A família PI3K / AKT está entre as vias mais frequentemente mutadas no câncer humano, sendo PI3K um efetor a jusante do KRAS oncogênico, que é quase onipresente no ADP (TOTIGER et al., 2019). A via de sinalização PI3K / AKT é importante no desenvolvimento e progressão do câncer de pâncreas. A via de sinalização PI3K / AKT está envolvida em vários processos celulares, incluindo proliferação, diferenciação, sobrevivência e motilidade celular (YUAN; CANTLEY, 2008). A expressão e a atividade do PI3K e AKT estão desreguladas em células cancerígenas do pâncreas, fato este associado a um mau prognóstico. É sabido que a via de sinalização PI3K / AKT é uma via regulatória fundamental implicada não apenas na tumorigênese pancreática, mas também no tratamento de outros tipos de câncer (ZHANG et al., 2019).

Como observado em nossos resultados de análise de proliferação celular e expressão de proteínas da via PI3K/AKT, a TQD 10 foi a que apresentou melhor atividade antiproliferativa de forma dependente desta via, visto que regulou negativamente a via de sinalização PI3K/AKT em ambas as linhagens tumorais avaliadas neste trabalho, resultando na inibição da proliferação. Estes resultados são ainda corroborados pelo ensaio de formação de colônia onde foi possível observar que a TQD 10 inibiu expressivamente a capacidade das células tumorais pré-tratadas formarem colônias. Já as demais TQDs também exerceram pronunciada atividade antiproliferativa, entretando não parece estar sendo regulada pela via de PI3K/AKT. Estudos adicionais devem ser realizados para conclusões mais assertivas acerca das vias que levaram a atividade antiproliferativa nas demais TQDs. Por exemplo, as proteínas ERK estão envolvidas em respostas celulares a fatores de crescimento e outros mitógenos e exercem ações regulatórias sobre mecanismos de proliferação e diferenciação celular. A via Ras/Raf/Mek/Erk também medeia a proliferação celular (KIM; CHOI, 2010; MARSHALL, 1995).

O ADP é caracterizado pela sua alta malignidade, em parte isso é atribuído à presença de uma subpopulação de células quimiorresistentes, auto-renováveis e multipotentes na maior parte do tumor denominada células-tronco tumorais (CTTs). Acredita-se que estas células sejam responsáveis pelo início do tumor, rápida progressão da doença, insensibilidade celular à radiação e quimioterapia, metástases precoces e recorrência (CONG; YI; WANG, 2018; XIAO et al., 2014). Portanto, a eliminação do CTTs no ADP poderia melhorar os resultados do tratamento e levar a um prognóstico

mais favorável para os pacientes afetados por esta doença (DURKO et al., 2017). As CTTs são geradas como um dos produtos da transição epitelial-mesenquimal (TEM), indicando que estas células possuem um fenótipo mais mesenquimal que é associado com a presença de traços muito agressivos. As células cancerígenas do pâncreas com fenótipo TEM exibem características de células-tronco caracterizadas pela expressão de marcadores de superfície celular CD24, CD44 e antígeno epitelial específico (ESA) (LEE; DOSCH; SIMEONE, 2008; LU et al., 2014). A ativação do eixo PI3K / AKT é um dos principais mecanismos no processo de TEM, porém outras vias participam desse processo (XU; YANG; LU, 2015). A TQD 7 foi a única que promoveu o aumento significativo da quantidade de células tronco tumorais, sendo necessário mais estudos para investigar as vias de sinalização participativas.

Desde a introdução dos ensaios clonogênicos ou ensaio de formação de colônias em 1956 por Puck e Marcus, estes se tornaram o método de escolha para determinar a sobrevivência e o crescimento das células, principalmente das linhagens celulares de câncer, após tratamento com radiação ionizante ou para determinar a eficácia citotóxica de compostos. Um ensaio clonogênico avalia o potencial de uma única célula resistir ao tratamento e se transformar em uma colônia, sendo que uma colônia é definida por um conjunto de no mínimo 50 células (GUZMÁN et al., 2014). O ensaio testa essencialmente todas as células da população quanto à sua capacidade de sofrer divisão "ilimitada" (FRANKEN et al., 2006). Sendo assim, o resultado obtido com o tratamento das células com o composto TQD 10 no que diz respeito à inibição da formação de colônia evidencia esta positiva característica inibitória o que também corrobora com o resultado de inibição da proliferação celular, como já citado anteriormente. As células que receberam o tratamento com TQDs 2 e 12 em ambas as linhagens conseguiram aderir e proliferar formando colônias. A TQD 7 embora não tenha produzido resultados satisfatórios com relação à inibição da proliferação celular da linhagem PANC-1, apresentou uma atividade inibitória pronunciada da formação de colônias por essas células. Esta diferença nesses dois resultados pode se dever aos tempos de análise, visto que no ensaio de formação de colônia, células pré-tratadas são plaqueadas em baixa densidade e são deixadas em cultura por um período significativamente maior.

7. CONCLUSÕES

Em suma, as análises realizadas neste trabalho nos permitem concluir que:

- Dos seis compostos testados, quatro foram identificados com potencial atividade citotóxica para células de adenocarcinoma pancreático.
- Os compostos 7 e 12 diminuem a autofagia.
- Os quatro compostos (TQDs 2, 7, 10 e 12) provocam alterações morfológicas e alterações no ciclo celular das células tumorais de pâncreas aqui empregadas.
- As TQDs 2, 10 e 12 causam a morte celular por apoptose em ambas as linhagens tumorais analisadas e também induzem atividade antiproliferativa.
- A TQD 7 levou a um aumento expressivo na porcentagem de células com o fenótipo CD44⁺/CD24⁺.
- A TQD 7 e 10 promoveram redução na capacidade de formação de colônia, pelas células tumorais.
- A TQD 10 foi capaz de regular negativamente a ativação da via de sinalização PI3K / AKT em células de câncer de pâncreas. Esse achado fornece evidências para sugerir que a estrutura atômica da molécula de TQD 10 pode ser aperfeiçoada e tem potencial para ser um interessante agente terapêutico para o tratamento do câncer de pâncreas.
- Nossos resultados indicam que a atividade dos derivados das TQDs contra o adenocarcinoma pancreático parece estar relacionada com a inibição da via regulada pelas proteínas RAS. Porém, mais estudos são necessários para melhor compreensão do mecanismo de ação destes compostos e para a validação de uma estrutura molecular que poderá ser utilizada para o desenvolvimento de novos fármacos.
- Como os compostos interferiram em pontos chaves que dificultam a progressão tumoral, os nossos resultados se mostram encorajadores na área de desenvolvimento de fármacos para a aplicação específica no câncer de pâncreas. Assim este estudo poderá subsidiar o desenho e síntese da segunda geração de TQDs.

8. PERSPECTIVAS

As perspectivas propostas para a continuidade deste trabalho são:

- Avaliação da relação das TQDs com a proteína Ras através da investigação de outras vias por ela controladas.
- Verificar o efeito da combinação das TQDs com fármacos de referência.
- Testar as TQDs em outras linhagens celulares.
- Realizar testes relacionados à via da glicose.
- Avaliar *in vivo* os efeitos da terapia mediada pelas TQDs que apresentaram os melhores resultados em testes *in vitro*: verificar a capacidade dos derivados selecionados em promover a redução ou a estagnação do crescimento tumoral através de análises clínicas, histopatológicas, bioquímicas, hematológicas bem como a regressão do tumor e sobrevida de camundongos *nude*.
- Analisar, por dinâmica molecular, a interação de cada um dos compostos selecionados para caracterizar o seu mecanismo de ação. Estes dados serão utilizados para o aprimoramento da molécula visando aumentar a sua afinidade com a proteína alvo, o que favorecerá a diminuição dos valores de IC_{50} e provavelmente reduzirá a citotoxicidade para células normais.

09. REFERÊNCIAS

AHEARN, I. M. et al. Regulating the regulator: post-translational modification of RAS. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 1, p. 39–51, 22 dez. 2011.

ALVIM, H. G. O. et al. Facts, presumptions, and myths on the solvent-free and catalyst-free Biginelli reaction. What is catalysis for? **The Journal of Organic Chemistry**, v. 79, n. 8, p. 3383–3397, 18 abr. 2014.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/pancreatic-cancer.html>>. Acesso em: 2 mar. 2017.

AMMOSOVA, T. et al. 1E7-03, a low MW compound targeting host protein phosphatase-1, inhibits HIV-1 transcription. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 22, p. 5059–5075, nov. 2014.

AMRUTKAR, M.; GLADHAUG, I. P. Pancreatic Cancer Chemoresistance to Gemcitabine. **Cancers**, v. 9, n. 11, p. 157, nov. 2017.

ANDERSSON, G. et al. Pancreatic cancer risk in relation to sex, lifestyle factors, and pre-diagnostic anthropometry in the Malmö Diet and Cancer Study. **Biology of Sex Differences**, v. 7, 9 dez. 2016.

ANDO, Y. et al. Phase I study of alpelisib (BYL719), an α -specific PI3K inhibitor, in Japanese patients with advanced solid tumors. **Cancer Science**, v. 110, n. 3, p. 1021–1031, mar. 2019.

ANDREOTTI, G.; SILVERMAN, D. T. Occupational risk factors and pancreatic cancer: a review of recent findings. **Molecular Carcinogenesis**, v. 51, n. 1, p. 98–108, jan. 2012.

ARDENGH, J. C.; COELHO, N.; OSVALDT, A. B. Early pancreatic cancer: the methods currently available can identify this disease? **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 45, n. 2, p. 169–177, jun. 2008.

ASARA, Y. et al. Cadmium modifies the cell cycle and apoptotic profiles of human breast cancer cells treated with 5-fluorouracil. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 8, p. 16600–16616, 12 ago. 2013.

BAER, R. et al. Implication of PI3K/Akt pathway in pancreatic cancer: When PI3K isoforms matter? **Advances in Biological Regulation**, The PI3-kinase/Akt pathway: from signaling to diseases. v. 59, p. 19–35, 1 set. 2015.

BARON, M. et al. A Single-Cell Transcriptomic Map of the Human and Mouse Pancreas Reveals Inter- and Intra-cell Population Structure. **Cell Systems**, v. 3, n. 4, p. 346–360.e4, 26 out. 2016.

BARONE, E. et al. Environmental risk factors for pancreatic cancer: an update. **Archives of Toxicology**, v. 90, n. 11, p. 2617–2642, nov. 2016.

BARRETT, J. C. Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. **Environmental Health Perspectives**, v. 100, p. 9–20, abr. 1993.

BELLONE, G. et al. Antagonistic interactions between gemcitabine and 5-fluorouracil in the human pancreatic carcinoma cell line Capan-2. **Cancer Biology & Therapy**, v. 5, n. 10, p. 1294–1303, out. 2006.

BENDALE, P. et al. Second generation tetrahydroquinoline-based protein farnesyltransferase inhibitors as antimalarials. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 19, p. 4585–4605, 20 set. 2007.

BIGGS-HOUCK, J. E.; YOUNAI, A.; SHAW, J. T. Recent advances in multicomponent reactions for diversity-oriented synthesis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 14, n. 3, p. 371–382, jun. 2010.

BORDEN, P. et al. Sympathetic Innervation during Development Is Necessary for Pancreatic Islet Architecture and Functional Maturation. **Cell Reports**, v. 4, n. 2, p. 287–301, jul. 2013.

BOSETTI, C. et al. Pancreatic cancer: overview of descriptive epidemiology. **Molecular Carcinogenesis**, v. 51, n. 1, p. 3–13, jan. 2012.

BOURNE, H. R.; SANDERS, D. A.; MCCORMICK, F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. **Nature**, v. 348, n. 6297, p. 125–132, 8 nov. 1990.

BRAND, R. E. et al. Advances in counselling and surveillance of patients at risk for pancreatic cancer. **Gut**, v. 56, n. 10, p. 1460–1469, out. 2007.

BRAUCH, S.; VAN BERKEL, S. S.; WESTERMANN, B. Higher-order multicomponent reactions: beyond four reactants. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 12, p. 4948–4962, 21 jun. 2013.

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, 2018.

BRYANT, K. L. et al. KRAS: feeding pancreatic cancer proliferation. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 39, n. 2, p. 91–100, fev. 2014.

BÜNGER, S. et al. Serum biomarkers for improved diagnostic of pancreatic cancer: a current overview. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 137, n. 3, p. 375–389, 1 mar. 2011.

CAGNOL, S.; CHAMBARD, J.-C. ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence. **The FEBS journal**, v. 277, n. 1, p. 2–21, jan. 2010.

CAMARA, S. N. et al. High risk factors of pancreatic carcinoma. **Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]**, v. 36, n. 3, p. 295–304, jun. 2016.

Câncer de pâncreas. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pancreas>>. Acesso em: 25 nov. 2019.

- CANTLEY, L. C. Obesity, Insulin Resistance and Cancer: The PI3K connection. **The FASEB Journal**, v. 32, n. 1_supplement, p. 250.4-250.4, 1 abr. 2018.
- CAO, Z. et al. AKT and ERK dual inhibitors: The way forward? **Cancer Letters**, v. 459, p. 30–40, 10 set. 2019.
- CASARI, I. et al. Dual PDK1/Aurora Kinase A Inhibitors Reduce Pancreatic Cancer Cell Proliferation and Colony Formation. **Cancers**, v. 11, n. 11, 31 out. 2019.
- CASCETTA, P. et al. Pancreatic Cancer and Obesity: Molecular Mechanisms of Cell Transformation and Chemoresistance. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, 25 out. 2018.
- CHAN, A.; DIAMANDIS, E. P.; BLASUTIG, I. M. Strategies for discovering novel pancreatic cancer biomarkers. **Journal of Proteomics**, v. 81, p. 126–134, 9 abr. 2013.
- CHANDRA, R.; LIDDLE, R. A. Neural and hormonal regulation of pancreatic secretion: **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 25, n. 5, p. 441–446, set. 2009.
- CHANDRASEKAR, N. et al. Downregulation of uPA inhibits migration and PI3k/Akt signaling in glioblastoma cells. **Oncogene**, v. 22, n. 3, p. 392–400, jan. 2003.
- CHANDRASHEKAR, R.; ADAMS, P. D. Prospective Development of Small Molecule Targets to Oncogenic Ras Proteins. **Open Journal of Biophysics**, v. 3, n. 4, p. 207–211, 1 out. 2013.
- CHANG, F. et al. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. **Leukemia**, v. 17, n. 3, p. 590–603, mar. 2003.
- CHANG, H.-H.; EIBL, G. Obesity-Induced Adipose Tissue Inflammation as a Strong Promotional Factor for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. **Cells**, v. 8, n. 7, 03 2019.
- CHEN, Q.; KANG, J.; FU, C. The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 3, n. 1, p. 18, dez. 2018.
- CHENG, J. Q. et al. The Akt/PKB pathway: molecular target for cancer drug discovery. **Oncogene**, v. 24, n. 50, p. 7482–7492, nov. 2005.
- CHIN, L. et al. Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance. **Nature**, v. 400, n. 6743, p. 468–472, 29 jul. 1999.
- CHITTIBOYINA, S. et al. The role of the folate pathway in pancreatic cancer risk. **PLOS ONE**, v. 13, n. 2, p. e0193298, 23 fev. 2018.
- CONG, P.; YI, C.; WANG, X.-Y. Expression of Smo in pancreatic cancer CD44+CD24+cells and construction of a lentiviral expression vector to silence Smo. **Oncology Letters**, v. 16, n. 4, p. 4855–4862, 1 out. 2018.
- CONROY, T. et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 19, p. 1817–1825, 12 maio 2011.

- CONWAY, J. R. et al. Combating pancreatic cancer with PI3K pathway inhibitors in the era of personalised medicine. **Gut**, v. 68, n. 4, p. 742–758, 1 abr. 2019.
- COX, A. D. et al. Drugging the undruggable RAS: Mission possible? **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 13, n. 11, p. 828–851, nov. 2014.
- COX, A. D.; DER, C. J. Ras Family Signaling: Therapeutic Targeting. **Cancer Biology & Therapy**, v. 1, n. 6, p. 599–606, 1 nov. 2002.
- COX, A. D.; DER, C. J. The dark side of Ras: regulation of apoptosis. **Oncogene**, v. 22, n. 56, p. 8999–9006, 8 dez. 2003.
- CREIXELL, P. et al. Pathway and network analysis of cancer genomes. **Nature Methods**, v. 12, n. 7, p. 615–621, jul. 2015.
- CUNNINGHAM, D. et al. Randomised trial of irinotecan plus supportive care versus supportive care alone after fluorouracil failure for patients with metastatic colorectal cancer. **The Lancet**, v. 352, n. 9138, p. 1413–1418, 31 out. 1998.
- DE ALMEIDA, S. M. V. et al. Compostos coordenados híbridos de platina no tratamento do câncer. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 3, p. 337–345, 2014.
- DE GONZALEZ, A. B.; SWEETLAND, S.; SPENCER, E. A meta-analysis of obesity and the risk of pancreatic cancer. **British Journal of Cancer**, v. 89, n. 3, p. 519–523, 4 ago. 2003.
- DOLENŠEK, J. et al. Pancreas Physiology. **Challenges in Pancreatic Pathology**, 26 abr. 2017.
- DÖMLING, A.; WANG, W.; WANG, K. Chemistry and biology of multicomponent reactions. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 6, p. 3083–3135, 13 jun. 2012.
- DOUILLARD, J. Y. et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. **The Lancet**, v. 355, n. 9209, p. 1041–1047, 25 mar. 2000.
- DOWNWARD, J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. **Nature Reviews. Cancer**, v. 3, n. 1, p. 11–22, jan. 2003.
- DUNNE, R. F.; HEZEL, A. F. Genetics and Biology of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 29, n. 4, p. 595–608, ago. 2015.
- DURKO, L. et al. Expression and Clinical Significance of Cancer Stem Cell Markers CD24, CD44, and CD133 in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Chronic Pancreatitis. **Disease Markers**, v. 2017, 2017.
- EDLUND, H. Pancreatic organogenesis--developmental mechanisms and implications for therapy. **Nature Reviews. Genetics**, v. 3, n. 7, p. 524–532, jul. 2002.

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

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007b.

ELTANTAWY, A. et al. Copanlisib: An Intravenous Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) Inhibitor for the Treatment of Relapsed Follicular Lymphoma. **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 53, n. 9, p. 954–958, set. 2019.

ENDERS, D. et al. Asymmetric Michael addition/lactamization via samp-/ramp-hydrazonesenantioselective synthesis of substituted tetrahydro-2,5(1H,3H)-quinolinediones. **Tetrahedron Letters**, v. 28, n. 33, p. 3795–3798, 1987.

ESER, S. et al. Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer. **British Journal of Cancer**, v. 111, n. 5, p. 817–822, ago. 2014.

FERNÁNDEZ-MEDARDE, A.; SANTOS, E. Ras in Cancer and Developmental Diseases. **Genes & Cancer**, v. 2, n. 3, p. 344–358, mar. 2011.

FISHER, G. H. et al. Induction and apoptotic regression of lung adenocarcinomas by regulation of a K-Ras transgene in the presence and absence of tumor suppressor genes. **Genes & Development**, v. 15, n. 24, p. 3249–3262, 15 dez. 2001.

FITZGERALD, T. L.; MCCUBREY, J. A. Pancreatic cancer stem cells: Association with cell surface markers, prognosis, resistance, metastasis and treatment. **Advances in Biological Regulation**, Targeting Signaling Pathways in Stem Cells. v. 56, p. 45–50, 1 set. 2014.

FITZPATRICK, F. A.; WHEELER, R. The immunopharmacology of paclitaxel (Taxol®), docetaxel (Taxotere®), and related agents. **International Immunopharmacology**, v. 3, n. 13, p. 1699–1714, 1 dez. 2003.

FOUAD, Y. A.; AANEI, C. Revisiting the hallmarks of cancer. **American Journal of Cancer Research**, v. 7, n. 5, p. 1016–1036, 1 maio 2017.

FRANKEN, N. A. P. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315–2319, 2006.

FU, H. W. et al. Identification of a cysteine residue essential for activity of protein farnesyltransferase. Cys299 is exposed only upon removal of zinc from the enzyme. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 45, p. 28541–28548, 8 nov. 1996.

FUJITA, K. et al. Irinotecan, a key chemotherapeutic drug for metastatic colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 43, p. 12234–12248, 21 nov. 2015.

FURLOW, B. Computed Tomography of Pancreatitis and Pancreatic Cancer. **Radiologic Technology**, v. 86, n. 6, p. 645CT-664CT; quiz 665CT-668CT, ago. 2015.

GALLELLI, L. et al. Retrospective analysis of adverse drug reactions induced by gemcitabine treatment in patients with non-small cell lung cancer. **Pharmacological Research**, v. 49, n. 3, p. 259–263, mar. 2004.

GÄRTNER, S. et al. Nutrition in Pancreatic Cancer: A Review. **Gastrointestinal Tumors**, v. 2, n. 4, p. 195–202, maio 2016.

GHOSN, M. et al. Optimum chemotherapy in the management of metastatic pancreatic cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 9, p. 2352–2357, 7 mar. 2014.

GOODSELL, D. S. The molecular perspective: the ras oncogene. **The Oncologist**, v. 4, n. 3, p. 263–264, 1999.

GOONETILLEKE, K. S.; SIRIWARDENA, A. K. Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer. **European Journal of Surgical Oncology: The Journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology**, v. 33, n. 3, p. 266–270, abr. 2007.

GUIN, S.; THEODORESCU, D. The RAS-RAL axis in cancer: evidence for mutation-specific selectivity in non-small cell lung cancer. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 36, n. 3, p. 291–297, mar. 2015.

GULLO, L. et al. Do early symptoms of pancreatic cancer exist that can allow an earlier diagnosis? **Pancreas**, v. 22, n. 2, p. 210–213, mar. 2001.

GUZMÁN, C. et al. ColonyArea: An ImageJ Plugin to Automatically Quantify Colony Formation in Clonogenic Assays. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 19 mar. 2014.

GYSIN, S. et al. Pharmacologic inhibition of RAF-->MEK-->ERK signaling elicits pancreatic cancer cell cycle arrest through induced expression of p27Kip1. **Cancer Research**, v. 65, n. 11, p. 4870–4880, 1 jun. 2005.

GYSIN, S. et al. Therapeutic Strategies for Targeting Ras Proteins. **Genes & Cancer**, v. 2, n. 3, p. 359–372, mar. 2011.

HACKERT, T.; SCHÜTTE, K.; MALFERTHEINER, P. The Pancreas: Causes for Malabsorption. **Viszeralmedizin**, v. 30, n. 3, p. 190–197, jun. 2014.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 4 mar. 2011.

HENNENFENT, K. L.; GOVINDAN, R. Novel formulations of taxanes: a review. Old wine in a new bottle? **Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 17, n. 5, p. 735–749, maio 2006.

HERREROS-VILLANUEVA, M. et al. Molecular markers in pancreatic cancer diagnosis. **Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry**, v. 418, p. 22–29, 15 mar. 2013.

HERRMANN, R. et al. Gemcitabine plus capecitabine compared with gemcitabine alone in advanced pancreatic cancer: a randomized, multicenter, phase III trial of the Swiss

Group for Clinical Cancer Research and the Central European Cooperative Oncology Group. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 25, n. 16, p. 2212–2217, 1 jun. 2007.

HEZEL, A. F. et al. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. **Genes & Development**, v. 20, n. 10, p. 1218–1249, 15 maio 2006.

HIDALGO, M. et al. Addressing the challenges of pancreatic cancer: future directions for improving outcomes. **Pancreatology: official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.]**, v. 15, n. 1, p. 8–18, fev. 2015.

HO, M. Y.; MACKEY, J. R. Presentation and management of docetaxel-related adverse effects in patients with breast cancer. **Cancer Management and Research**, v. 6, p. 253–259, 27 maio 2014.

HOSHI, N. et al. [Treating Side Effects of FOLFIRINOX--A Study of the Effect of Hange-Shashin-To on Preventing Diarrhea]. **Gan to Kagaku Ryoho. Cancer & Chemotherapy**, v. 42, n. 12, p. 2364–2366, nov. 2015.

HOSSEINI, M. et al. Therapeutic Potential of Curcumin in Treatment of Pancreatic Cancer: Current Status and Future Perspectives. **Journal of Cellular Biochemistry**, 20 jan. 2017.

HRUBAN, R. H.; FUKUSHIMA, N. Pancreatic adenocarcinoma: update on the surgical pathology of carcinomas of ductal origin and PanINs. **Modern Pathology**, v. 20, n. S1, p. S61–S70, fev. 2007.

HUANG, X. et al. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. **International Journal of Biological Sciences**, v. 14, n. 11, p. 1483–1496, 6 ago. 2018.

HUANG, Y. et al. Down-regulation of the PI3K/Akt signaling pathway and induction of apoptosis in CA46 Burkitt lymphoma cells by baicalin. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR**, v. 31, n. 1, p. 48, 20 maio 2012.

HUANWEN, W. et al. Intrinsic chemoresistance to gemcitabine is associated with constitutive and laminin-induced phosphorylation of FAK in pancreatic cancer cell lines. **Molecular Cancer**, v. 8, p. 125, 21 dez. 2009.

ILIC, M.; ILIC, I. Epidemiology of pancreatic cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 44, p. 9694–9705, 28 nov. 2016.

INCA 2018. Instituto nacional do Câncer. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pancreas>> Acesso em: 11 dez. 2018.

JACOBS, C. et al. 1-imidazolyl(alkyl)-substituted di- and tetrahydroquinolines and analogues: syntheses and evaluation of dual inhibitors of thromboxane A(2) synthase and aromatase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 9, p. 1841–1851, 4 maio 2000.

KARJALAINEN, A. et al. Synthesis of Phenol-derivatives and Biological Screening for Anticancer Activity. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 12, p. 1710–1720, 2017.

KAUR, K. et al. Quinolines and structurally related heterocycles as antimalarials. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 8, p. 3245–3264, ago. 2010.

Key Statistics for Pancreatic Cancer. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/pancreatic-cancer/about/key-statistics.html>>. Acesso em: 4 maio. 2019.

KIM, E. K.; CHOI, E.-J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1802, n. 4, p. 396–405, abr. 2010.

KIM, V. M.; AHUJA, N. Early detection of pancreatic cancer. **Chinese Journal of Cancer Research**, v. 27, n. 4, p. 321–331, ago. 2015.

KIMURA, T.; IMANISHI, S.; ARITA, M. Electrophysiologic effects of nicainoprol, a putative class I antiarrhythmic agent, on the guinea pig ventricular papillary muscle. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 13, n. 5, p. 767–773, maio 1989.

KITANAKA, C.; KUCHINO, Y. Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology. **Cell Death and Differentiation**, v. 6, n. 6, p. 508–515, jun. 1999.

KNOOP, M.; WEINHOLD, M.; BECKER, A. Missing pancreatic isthmus during pancreaticoduodenectomy. **Journal of Surgical Case Reports**, v. 2015, n. 3, 1 mar. 2015.

KOROLKOVAS, A.; DE FRANÇA, F. F. A. C. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. 17. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

KOUZNETSOV, V. V. et al. Synthesis and antifungal activity of diverse C-2 pyridinyl and pyridinylvinyl substituted quinolines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 21, p. 6506–6512, 1 nov. 2012.

KREEGER, P. K. et al. RAS Mutations Impact TNF-Induced Apoptosis in Colon Carcinoma Cells via ERK-Modulatory Negative and Positive Feedback Circuits along with non-ERK Pathway Effects. **Cancer research**, v. 69, n. 20, p. 8191–8199, 15 out. 2009.

LAM, S. W.; GUCHELAAR, H. J.; BOVEN, E. The role of pharmacogenetics in capecitabine efficacy and toxicity. **Cancer Treatment Reviews**, v. 50, p. 9–22, nov. 2016.

LARSSON, S. C. et al. Overall obesity, abdominal adiposity, diabetes and cigarette smoking in relation to the risk of pancreatic cancer in two Swedish population-based cohorts. **British Journal of Cancer**, v. 93, n. 11, p. 1310–1315, 28 nov. 2005.

LEE, C. J.; DOSCH, J.; SIMEONE, D. M. Pancreatic Cancer Stem Cells. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 17, p. 2806–2812, 10 jun. 2008.

LEE, K. J. et al. Serum CA 19-9 and CEA Levels as a Prognostic Factor in Pancreatic Adenocarcinoma. **Yonsei Medical Journal**, v. 54, n. 3, p. 643–649, 1 maio 2013.

LEICHER, L. W. et al. Tolerability of Capecitabine Monotherapy in Metastatic Colorectal Cancer: A Real-World Study. **Drugs in R&D**, v. 17, n. 1, p. 117–124, mar. 2017.

LI, A. et al. BEZ235 increases sorafenib inhibition of hepatocellular carcinoma cells by suppressing the PI3K/AKT/mTOR pathway. **American Journal of Translational Research**, v. 11, n. 9, p. 5573–5585, 15 set. 2019a.

LI, T.-D. et al. Coffee consumption and risk of pancreatic cancer: a systematic review and dose-response meta-analysis. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, p. 1–11, 11 jan. 2019b.

LI, W. et al. Curcumin inhibits superoxide dismutase-induced epithelial-to-mesenchymal transition via the PI3K/Akt/NF- κ B pathway in pancreatic cancer cells. **International Journal of Oncology**, v. 52, n. 5, p. 1593–1602, 1 maio 2018.

LIN, J. et al. Discovery and Optimization of Quinolinone Derivatives as Potent, Selective, and Orally Bioavailable Mutant Isocitrate Dehydrogenase 1 (mIDH1) Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, n. 14, p. 6575–6596, 25 jul. 2019.

LIU, J. et al. Irisin Enhances Doxorubicin-Induced Cell Apoptosis in Pancreatic Cancer by Inhibiting the PI3K/AKT/NF- κ B Pathway. **Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**, v. 25, p. 6085–6096, 14 ago. 2019.

LOCKER, G. Y. et al. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 24, n. 33, p. 5313–5327, 20 nov. 2006.

LOWENFELS, A. B. et al. Cigarette smoking as a risk factor for pancreatic cancer in patients with hereditary pancreatitis. **JAMA**, v. 286, n. 2, p. 169–170, 11 jul. 2001.

LOWENFELS, A. B.; MAISONNEUVE, P. Environmental factors and risk of pancreatic cancer. **Pancreatology: official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) [et al.]**, v. 3, n. 1, p. 1–7, 2003.

LU, Y. et al. MiR-200a inhibits epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer stem cell. **BMC cancer**, v. 14, p. 85, 12 fev. 2014.

MA, T. et al. USP9X inhibition improves gemcitabine sensitivity in pancreatic cancer by inhibiting autophagy. **Cancer Letters**, v. 436, p. 129–138, 01 2018.

MAGNANI, M. et al. Possible binding site for paclitaxel at microtubule pores. **The FEBS journal**, v. 276, n. 10, p. 2701–2712, maio 2009.

MAISONNEUVE, P.; LOWENFELS, A. B. Epidemiology of pancreatic cancer: an update. **Digestive Diseases (Basel, Switzerland)**, v. 28, n. 4–5, p. 645–656, 2010.

MANCIAS, J. D.; KIMMELMAN, A. C. Targeting Autophagy Addiction in Cancer. **Oncotarget**, v. 2, n. 12, p. 1302–1306, 19 dez. 2011.

- MARING, J. G. et al. Genetic factors influencing pyrimidine-antagonist chemotherapy. **The Pharmacogenomics Journal**, v. 5, n. 4, p. 226–243, 2005.
- MARSHALL, C. J. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. **Cell**, v. 80, n. 2, p. 179–185, 27 jan. 1995.
- MARTINEZ-BALIBREA, E. et al. Tumor-Related Molecular Mechanisms of Oxaliplatin Resistance. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 14, n. 8, p. 1767–1776, 1 ago. 2015.
- MEIER, F. et al. The RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways present molecular targets for the effective treatment of advanced melanoma. **Front Biosci**, v. 10, n. 2986–3001, p. 2986–3001, 2005.
- MENSAH, F. A.; BLAIZE, J.-P.; BRYAN, L. J. Spotlight on copanlisib and its potential in the treatment of relapsed/refractory follicular lymphoma: evidence to date. **OncoTargets and therapy**, v. 11, p. 4817–4827, 13 ago. 2018.
- MHAIDAT, N. M.; BOUKLIHACENE, M.; THORNE, R. F. 5-Fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells is caspase-9-dependent and mediated by activation of protein kinase C- δ . **Oncology Letters**, v. 8, n. 2, p. 699–704, ago. 2014.
- MILLER, C. et al. RCAD/BiP Pathway is Necessary for the Proper Synthesis of Digestive Enzymes and the Secretory Function of the Exocrine Pancreas. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, p. ajpgi.00176.2016, 19 jan. 2017.
- MINI, E. et al. Cellular pharmacology of gemcitabine. **Annals of Oncology**, v. 17, n. suppl_5, p. v7–v12, 1 maio 2006.
- MITIN, N.; ROSSMAN, K. L.; DER, C. J. Signaling interplay in Ras superfamily function. **Current biology: CB**, v. 15, n. 14, p. R563-574, 26 jul. 2005.
- MIYAKE, T. et al. Combined treatment with tamoxifen and a fusicoccin derivative (ISIR-042) to overcome resistance to therapy and to enhance the antitumor activity of 5-fluorouracil and gemcitabine in pancreatic cancer cells. **International Journal of Oncology**, v. 47, n. 1, p. 315–324, 1 jul. 2015.
- MODOLELL, I.; GUARNER, L.; MALAGELADA, J. R. Vagaries of clinical presentation of pancreatic and biliary tract cancer. **Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 10 Suppl 4, p. 82–84, 1999.
- MONTENEGRO JR, R.; CHAVES, M.; FERNANDES, V. Fisiologia Pacreática: Pâncreas Endócrino. In: [s.l: s.n.]. p. 523–574.
- MOUSTAFA, A. M. Y.; BAKARE, S. B. Synthesis of Some Hybrid 7-Hydroxy Quinolinone Derivatives As Anti Breast Cancer Drugs. **Research on Chemical Intermediates**, v. 45, n. 7, p. 3895–3912, 1 jul. 2019.
- MURAHASHI, S.-I. et al. Ruthenium-catalyzed hydration of nitriles and transformation of δ -ketonitriles to ene-lactams: total synthesis of (–)-pumiliotoxin C. **Tetrahedron**, v. 49, n. 39, p. 8805–8826, 1993.

MURTHY, D.; ATTRI, K. S.; SINGH, P. K. Phosphoinositide 3-Kinase Signaling Pathway in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Progression, Pathogenesis, and Therapeutics. **Frontiers in Physiology**, v. 9, 4 abr. 2018.

NAMMALWAR, B.; BUNCE, R. A. Recent syntheses of 1,2,3,4-tetrahydroquinolines, 2,3-dihydro-4(1H)-quinolinones and 4(1H)-quinolinones using domino reactions. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 19, n. 1, p. 204–232, 24 dez. 2013.

NAVARRO-YEPES, J. et al. Oxidative stress, redox signaling, and autophagy: cell death versus survival. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 21, n. 1, p. 66–85, 1 jul. 2014.

NGUYEN, U. T. T.; GOODY, R. S.; ALEXANDROV, K. Understanding and exploiting protein prenyltransferases. **Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology**, v. 11, n. 9, p. 1194–1201, 14 jun. 2010.

NIKOLETOPOULOU, V. et al. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 12, p. 3448–3459, 1 dez. 2013.

NITA, M. E. et al. 5-Fluorouracil induces apoptosis in human colon cancer cell lines with modulation of Bcl-2 family proteins. **British Journal of Cancer**, v. 78, n. 8, p. 986–992, out. 1998.

NÖTHLINGS, U. et al. Meat and fat intake as risk factors for pancreatic cancer: the multiethnic cohort study. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 97, n. 19, p. 1458–1465, 5 out. 2005.

O'DONNELL, J. S. et al. PI3K-AKT-mTOR inhibition in cancer immunotherapy, redux. **Seminars in Cancer Biology**, AGC kinases in cancer metastasis, immuncheckpoint regulation and drug resistance. v. 48, p. 91–103, 1 fev. 2018.

OKADA, K.-I. et al. Phase I Study of Nab-Paclitaxel plus Gemcitabine as Neoadjuvant Therapy for Borderline Resectable Pancreatic Cancer. **Anticancer Research**, v. 37, n. 2, p. 853–858, 2017.

ORTH, M. et al. Pancreatic ductal adenocarcinoma: biological hallmarks, current status, and future perspectives of combined modality treatment approaches. **Radiation Oncology**, v. 14, n. 1, p. 141, 8 ago. 2019.

PALUSZKIEWICZ, P. et al. Main dietary compounds and pancreatic cancer risk. The quantitative analysis of case-control and cohort studies. **Cancer Epidemiology**, v. 36, n. 1, p. 60–67, fev. 2012.

PANDOL, S. J. et al. Investigating the Pathobiology of Alcoholic Pancreatitis. **Alcoholism, clinical and experimental research**, v. 35, n. 5, p. 830–837, maio 2011.

PANG, Y. et al. A review of lifestyle, metabolic risk factors, and blood-based biomarkers for early diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 34, n. 2, p. 330–345, fev. 2019.

PERERA, R. M.; BARDEESY, N. Ready, set, go: the EGF receptor at the pancreatic cancer starting line. **Cancer Cell**, v. 22, n. 3, p. 281–282, 11 set. 2012.

POLISH, A.; JOSEPH, N. E.; MARSH, R. DE W. Pathologic Response to Primary Systemic Therapy With FOLFIRINOX in Patients With Resectable Pancreatic Cancer. **American Journal of Clinical Oncology**, v. 42, n. 10, p. 761–766, out. 2019.

PORTA, M. et al. Association between coffee drinking and K-ras mutations in exocrine pancreatic cancer. PANKRAS II Study Group. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v. 53, n. 11, p. 702–709, nov. 1999.

PORTA, M. et al. Exocrine pancreatic cancer: symptoms at presentation and their relation to tumour site and stage. **Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico**, v. 7, n. 5, p. 189–197, jun. 2005.

PORTA, M. et al. In pancreatic ductal adenocarcinoma blood concentrations of some organochlorine compounds and coffee intake are independently associated with KRAS mutations. **Mutagenesis**, v. 24, n. 6, p. 513–521, nov. 2009.

PORUK, K. E.; FIRPO, M. A.; MULVIHILL, S. J. Screening for pancreatic cancer. **Advances in Surgery**, v. 48, p. 115–136, 2014.

PYLAYEVA-GUPTA, Y.; GRABOCKA, E.; BAR-SAGI, D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. **Nature Reviews. Cancer**, v. 11, n. 11, p. 761–774, 13 out. 2011.

RAEDLER, L. A. Zydelig (Idelalisib): First-in-Class PI3 Kinase Inhibitor Approved for the Treatment of 3 Hematologic Malignancies. **American Health & Drug Benefits**, v. 8, n. Spec Feature, p. 157–162, mar. 2015.

RAJASEKHARAN, S. K.; RAMAN, T. Ras and Ras mutations in cancer. **Central European Journal of Biology**, v. 8, n. 7, p. 609–624, 1 jul. 2013.

RAMACHARY, D. B.; SHRUTHI, K. S. Asymmetric synthesis of tetrahydroquinolines through supramolecular organocatalysis. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 12, n. 25, p. 4300–4304, 7 jul. 2014.

RAN, H.-Q.; WANG, J.-Z.; SUN, C.-Q. Coffee Consumption and Pancreatic Cancer Risk: An Update Meta-analysis of Cohort Studies. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, v. 32, n. 1, p. 253–259, fev. 2016.

RANCOULE, C. et al. [50th anniversary of cisplatin]. **Bulletin Du Cancer**, v. 104, n. 2, p. 167–176, fev. 2017.

RANG, H. P., ET AL. **Rang & Dale: farmacologia**. 7 ed. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

RAO, S. et al. A dual role for autophagy in a murine model of lung cancer. **Nature Communications**, v. 5, p. 3056, 2014.

RAWLA, P.; SUNKARA, T.; GADUPUTI, V. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. **World Journal of Oncology**, v. 10, n. 1, p. 10–27, fev. 2019.

REDDY, S.; SUDHAKAR BABU, K.; KUMAR, N. Método RP- HPLC validado para la determinación de residuos de Irinotecan Hidrocloruro para la validación de la limpieza en el área de producción. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 47, n. 1, p. 45–53, mar. 2013.

ROCK, K. L.; KONO, H. The inflammatory response to cell death. **Annual Review of Pathology**, v. 3, p. 99–126, 2008.

RODRIGUEZ NÚÑEZ, Y. A. et al. Efficient synthesis and antioxidant activity of novel N-propargyl tetrahydroquinoline derivatives through the cationic Povarov reaction. **Heliyon**, v. 5, n. 8, p. e02174, ago. 2019.

RODRÍGUEZ, Y. A. et al. Novel N-allyl/propargyl tetrahydroquinolines: Synthesis via Three-component Cationic Imino Diels-Alder Reaction, Binding Prediction, and Evaluation as Cholinesterase Inhibitors. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 88, n. 4, p. 498–510, out. 2016.

ROHLICEK, J. et al. Capecitabine from X-ray powder synchrotron data. **Acta Crystallographica. Section E, Structure Reports Online**, v. 65, n. Pt 6, p. o1325-1326, 20 maio 2009.

ROSSI, J. et al. Parasympathetic Innervation and Function of Endocrine Pancreas Requires the Glial Cell Line-Derived Factor Family Receptor 2 (GFR 2). **Diabetes**, v. 54, n. 5, p. 1324–1330, 1 maio 2005.

ROTHENBERG, M. L. Irinotecan (CPT-11): recent developments and future directions--colorectal cancer and beyond. **The Oncologist**, v. 6, n. 1, p. 66–80, 2001.

ROWINSKY, E. K.; CALVO, E. Novel agents that target tublin and related elements. **Seminars in Oncology**, v. 33, n. 4, p. 421–435, ago. 2006.

SAMUEL, N.; HUDSON, T. J. The molecular and cellular heterogeneity of pancreatic ductal adenocarcinoma. **Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology**, v. 9, n. 2, p. 77–87, 20 dez. 2011.

SCARTON, L. et al. Pancreatic Cancer Related Health Disparities: A Commentary. **Cancers**, v. 10, n. 7, 18 jul. 2018.

SCHEIDIG, A. J.; BURMESTER, C.; GOODY, R. S. The pre-hydrolysis state of p21(ras) in complex with GTP: new insights into the role of water molecules in the GTP hydrolysis reaction of ras-like proteins. **Structure (London, England: 1993)**, v. 7, n. 11, p. 1311–1324, 15 nov. 1999.

SCHOBBER, M. et al. New Advances in the Treatment of Metastatic Pancreatic Cancer. **Digestion**, v. 92, n. 3, p. 175–184, 2015.

SEABRA, M. C. et al. Protein farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase share a common alpha subunit. **Cell**, v. 65, n. 3, p. 429–434, 3 maio 1991.

SHEN, M. et al. Farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I: structures, mechanism, inhibitors and molecular modeling. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 2, p. 267–276, Fevereiro 2015.

SHI, G. et al. Necroptosis occurs in osteoblasts during tumor necrosis factor- α stimulation and caspase-8 inhibition. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 52, n. 1, 2019.

SHIELDS, J. M. et al. Understanding Ras: 'it ain't over "til it's over". **Trends in Cell Biology**, v. 10, n. 4, p. 147–154, abr. 2000.

SINGH, D. et al. Recent advances in pancreatic cancer: biology, treatment, and prevention. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1856, n. 1, p. 13–27, ago. 2015.

SLACK, J. M. Developmental biology of the pancreas. **Development**, v. 121, n. 6, p. 1569–1580, 1 jun. 1995.

SOUZA, M. V. N. DE. New natural products able to act on the stabilization of microtubules, an important target against cancer. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 308–312, abr. 2004.

SRIDHARAN, V.; SURYAVANSHI, P. A.; MENÉNDEZ, J. C. Advances in the chemistry of tetrahydroquinolines. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 11, p. 7157–7259, 9 nov. 2011.

STERN, E. et al. Pharmacomodulations around the 4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxamides, a class of potent CB2-selective cannabinoid receptor ligands: consequences in receptor affinity and functionality. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 22, p. 5471–5484, 1 nov. 2007.

SU, D.-S. et al. Substituted tetrahydroquinolines as potent allosteric inhibitors of reverse transcriptase and its key mutants. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 17, p. 5119–5123, 1 set. 2009.

SWORDS, D. S. et al. Biomarkers in pancreatic adenocarcinoma: current perspectives. **OncoTargets and therapy**, v. 9, p. 7459–7467, 9 dez. 2016.

TAKAI, Y.; SASAKI, T.; MATOZAKI, T. Small GTP-binding proteins. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 1, p. 153–208, jan. 2001.

TAKAYA, H. et al. Transition-metal-based Lewis acid and base ambiphilic catalysts of iridium hydride complexes: multicomponent synthesis of glutarimides. **Angewandte Chemie (International Ed. in English)**, v. 42, n. 28, p. 3302–3304, 21 jul. 2003.

THOMAS, G. M.; HUGANIR, R. L. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 5, n. 3, p. 173–183, mar. 2004.

TONG, H. et al. The benefits of modified FOLFIRINOX for advanced pancreatic cancer and its induced adverse events: a systematic review and meta-analysis. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 6 jun. 2018.

TOTIGER, T. M. et al. Urolithin A, a Novel Natural Compound to Target PI3K/AKT/mTOR Pathway in Pancreatic Cancer. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 18, n. 2, p. 301–311, 2019.

TU, S. et al. New potential biologically active compounds: design and an efficient synthesis of N-substituted 4-aryl-4,6,7,8-tetrahydroquinoline-2,5(1H,3H)-diones under microwave irradiation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 11, p. 2925–2928, 1 jun. 2006.

TUMMALA, P.; JUNAI, O.; AGARWAL, B. Imaging of pancreatic cancer: An overview. **Journal of Gastrointestinal Oncology**, v. 2, n. 3, p. 168–174, set. 2011.

TZENG, C.-W. D. et al. Serum carbohydrate antigen 19-9 represents a marker of response to neoadjuvant therapy in patients with borderline resectable pancreatic cancer. **HPB: The Official Journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association**, v. 16, n. 5, p. 430–438, maio 2014.

UCHIDA, M. et al. Synthesis and antiulcer activity of 4-substituted 8-[(2-benzimidazolyl)sulfinylmethyl]-1,2,3,4-tetrahydroquinolines and related compounds. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, n. 6, p. 1575–1586, jun. 1990.

VAN DORT, M. E. et al. Dual inhibition of allosteric mitogen-activated protein kinase (MEK) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) oncogenic targets with a bifunctional inhibitor. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 7, p. 1386–1394, abr. 2015.

VANHAESEBROECK, B. et al. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 5, p. 329–341, maio 2010.

VAREEDAYAH, A. A.; ALKAADE, S.; TAYLOR, J. R. Pancreatic Adenocarcinoma. **Missouri Medicine**, v. 115, n. 3, p. 230–235, 2018.

VASAN, N.; BOYER, J. L.; HERBST, R. S. A RAS renaissance: emerging targeted therapies for KRAS-mutated non-small cell lung cancer. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 20, n. 15, p. 3921–3930, 1 ago. 2014.

VYCHYTILOVA-FALTEJSKOVA, P. et al. MiR-21, miR-34a, miR-198 and miR-217 as diagnostic and prognostic biomarkers for chronic pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. **Diagnostic Pathology**, v. 10, p. 38, 24 abr. 2015.

WALKER, K.; OLSON, M. F. Targeting Ras and Rho GTPases as opportunities for cancer therapeutics. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 15, n. 1, p. 62–68, fev. 2005.

WALKO, C. M.; LINDLEY, C. Capecitabine: a review. **Clinical Therapeutics**, v. 27, n. 1, p. 23–44, jan. 2005.

WALL, M. E.; WANI, M. C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 51, n. 1–3, p. 239–253; discussion 253–254, abr. 1996.

WENNERBERG, K.; ROSSMAN, K. L.; DER, C. J. The Ras superfamily at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. Pt 5, p. 843–846, 1 mar. 2005.

XIAO, Z. et al. Rasfonin, a novel 2-pyrone derivative, induces ras-mutated Panc-1 pancreatic tumor cell death in nude mice. **Cell Death & Disease**, v. 5, n. 5, p. e1241, maio 2014.

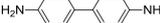
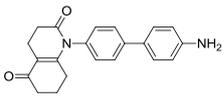
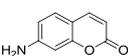
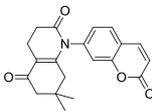
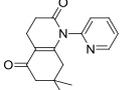
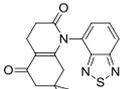
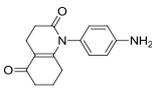
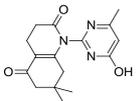
- XU, W.; YANG, Z.; LU, N. A new role for the PI3K/Akt signaling pathway in the epithelial-mesenchymal transition. **Cell Adhesion & Migration**, v. 9, n. 4, p. 317–324, 4 ago. 2015.
- XU, Y.; VILLALONA-CALERO, M. A. Irinotecan: mechanisms of tumor resistance and novel strategies for modulating its activity. **Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 13, n. 12, p. 1841–1851, dez. 2002.
- YADAV, D.; LOWENFELS, A. B. The Epidemiology of Pancreatitis and Pancreatic Cancer. **Gastroenterology**, v. 144, n. 6, p. 1252–1261, jun. 2013.
- YADAV, D.; MUDDANA, V.; O'CONNELL, M. Hospitalizations for Chronic Pancreatitis in Allegheny County, Pennsylvania, USA. **Pancreatology**, v. 11, n. 6, p. 546–552, fev. 2012.
- YAN, C.; THEODORESCU, D. RAL GTPases: Biology and Potential as Therapeutic Targets in Cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 70, n. 1, p. 1–11, 1 jan. 2018.
- YANG, S. et al. Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. **Genes & Development**, v. 25, n. 7, p. 717–729, 1 abr. 2011.
- YANG, Z.; KLIONSKY, D. J. An overview of the molecular mechanism of autophagy. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 335, p. 1–32, 2009.
- YAO, C. et al. N-Heterocyclic Carbene Catalyzed Reactions of α -Bromo- α,β -unsaturated Aldehydes/ α,β -Dibromoaldehydes with 1,3-Dinucleophilic Reagents. **Chemistry – A European Journal**, v. 18, n. 7, p. 1914–1917, 2012.
- YAO, C. et al. NHC-catalyzed cascade synthesis of 1-substituted 4-aryl-tetrahydroquinoline-2,5-diones. **Tetrahedron**, v. 69, n. 3, p. 1133–1137, 21 jan. 2013.
- YEO, T. P. Demographics, epidemiology, and inheritance of pancreatic ductal adenocarcinoma. **Seminars in Oncology**, v. 42, n. 1, p. 8–18, fev. 2015.
- YEO, T. P.; LOWENFELS, A. B. Demographics and epidemiology of pancreatic cancer. **Cancer Journal (Sudbury, Mass.)**, v. 18, n. 6, p. 477–484, dez. 2012.
- YU, D.-Y. et al. Clinical significance of pancreatic intraepithelial neoplasia in resectable pancreatic cancer on survivals. **Annals of Surgical Treatment and Research**, v. 94, n. 5, p. 247, 2018.
- YUAN, T.; CANTLEY, L. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. **Oncogene**, v. 27, n. 41, p. 5497–5510, 18 set. 2008.
- ZEISS, C. J. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. **Veterinary Pathology**, v. 40, n. 5, p. 481–495, set. 2003.
- ZHANG, D. et al. Irisin functions to inhibit malignant growth of human pancreatic cancer cells via downregulation of the PI3K/AKT signaling pathway. **OncoTargets and therapy**, v. 12, p. 7243–7249, 4 set. 2019.

ZHANG, S. et al. Effects of alcohol drinking and smoking on pancreatic ductal adenocarcinoma mortality: A retrospective cohort study consisting of 1783 patients. **Scientific Reports**, v. 7, 29 ago. 2017.

ZHOU, G. et al. Resibufogenin inhibits ovarian clear cell carcinoma (OCCC) growth in vivo, and migration of OCCC cells in vitro, by down-regulating the PI3K/AKT and actin cytoskeleton signaling pathways. **American Journal of Translational Research**, v. 11, n. 10, p. 6290–6303, 2019.

ZHOU, Q.; MELTON, D. A. Pancreas regeneration. **Nature**, v. 557, n. 7705, p. 351–358, maio 2018.

10. ANEXO I

1,3-dicarbonil	Amina	Composto insaturado	Estrutura do produto	TQD	Massa molar
				TQD-2	$C_{21}H_{20}N_2O_2$ 332g.mol ⁻¹
				TQD-7	$C_{20}H_{19}NO_4$ 337.38 g.mol ⁻¹
				TQD-9	$C_{16}H_{18}N_2O_2$ 270.33 g.mol ⁻¹
				TQD-10	$C_{17}H_{17}N_3O_2$ S 327.40 g.mol ⁻¹
				TQD-12	$C_{15}H_{16}N_2O_2$ 256.30 g.mol ⁻¹
				TQD-17	$C_{16}H_{19}N_3O_3$ 301.35 g.mol ⁻¹