

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

BÁRBARA GONÇALVES RODRIGUES FERNANDES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DOS COMPLEXOS DE
INCLUSÃO DE OFLOXACINO COM CICLODEXTRINAS EM CÉLULAS DE
CÂNCER DE MAMA MDA-MB-231**

GOVERNADOR VALADARES - MG

2022

Bárbara Gonçalves Rodrigues Fernandes

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DOS COMPLEXOS DE
INCLUSÃO DE OFLOXACINO COM CICLODEXTRINAS EM CÉLULAS DE
CÂNCER DE MAMA MDA-MB-231**

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

Orientadora: Prof. Me. Bolivar Ralisson Amaro

GOVERNADOR VALADARES- MG

2022

Bárbara Gonçalves Rodrigues Fernandes

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DOS COMPLEXOS DE
INCLUSÃO DE OFLOXACINO COM CICLODEXTRINAS EM CÉLULAS DE
CÂNCER DE MAMA MDA-MB-231**

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

Aprovada em 15 de dezembro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **BOLIVAR RALISSON AMARO**
Data: 16/12/2022 10:39:57-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

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

Documento assinado digitalmente
 **ANA CAROLINA MENEZES MENDONCA VALE**
Data: 16/12/2022 11:59:38-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Profª Ma. Ana Carolina Menezes Mendonça Valente
Universidade Federal de Juiz de Fora-UFJF-Governador Valadares

Documento assinado digitalmente
 **MARIANY LOPES DA COSTA FOLLY**
Data: 19/12/2022 11:32:38-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Ma. Mariany Lopes da Costa Folly
Universidade Federal de Juiz de Fora-UFJF-Governador Valadares

Dedico este trabalho a minha família, sem eles nada seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me concedido saúde e determinação, para finalizar essa etapa e alcançar meus objetivos.

Gostaria de expressar minha sincera gratidão a professora Sandra Bertelli, pelo apoio contínuo ao meu estudo, pela oportunidade, por sua paciência, motivação e ao imenso conhecimento adquirido sendo sua aluna de iniciação científica. A oportunidade de realizar iniciação científica junto a pessoas capacitadas e acolhedoras, contribuiu para o meu crescimento e mudou a minha visão como futura farmacêutica.

Ao meu orientador Bolívar, que me acolheu com um grande suporte durante esse trabalho e que com paciência e compreensão fez esse trabalho se tornar possível. Muito obrigada!

Ao professor Caio César pela disponibilidade e colaboração durante esse trabalho e toda iniciação científica.

Agradeço à minha família, principalmente minha mãe que é mãe e pai, e que nunca mediu esforços para me proporcionar uma boa formação. Aos meus avós pelo suporte e amor desde sempre e durante a graduação. Ao meu tio (Fábio) e tia (Jessica), que sempre foram base e referência na minha vida. Minha bisavó, tios, tias e primos. Obrigada a todos, pelos momentos de união que nos fortalece e faz caminhar para frente.

Agradeço aos meus amigos (Arthur, Tiago e Jorge) pelos momentos de descontração, em especial à Caroline minha companheira na UFJF e na vida, que me apoiou e incentivou nessa missão. Quem tem amigos, tem tudo e sem vocês a vida seria sem graça.

Agradeço a Paloma, obrigada pela paciência, convivência e conhecimentos compartilhados de maneira leve.

Agradeço especialmente à Cleo, minha companheira de laboratório e amiga, que me ajudou e incentivou desde o princípio da iniciação. Cleo muito obrigada, dividir a caminhada com você ao longo desses anos não poderia ter sido melhor.

RESUMO

O tratamento do câncer de mama é complexo e muitas vezes limitado pelos seus efeitos adversos e, principalmente, quando se trata do subtipo que não expressa receptores hormonais e de fator de crescimento epidérmico 2. O desenvolvimento de um novo medicamento é dispendioso e demorado, desta forma, é necessário a utilização de outras estratégias com melhor custo-benefício para o tratamento, como o reposicionamento de fármacos. As fluoroquinolonas são antimicrobianos, que possuem atividade citotóxica em várias linhagens de câncer relatada em estudos. O ofloxacino é uma fluoroquinolona de segunda geração, esse fármaco tem amplo espectro de ação bactericida contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas pela inibição da DNA girase e topoisomerase IV. Contudo, o ofloxacino apresenta baixa solubilidade em água, o que pode dificultar sua dissolução e biodisponibilidade, com isso, uma alternativa para melhoria de tais aspectos é fundamental. Uma possibilidade, é complexação com ciclodextrinas, estruturas capazes de modificar características físico-químicas de fármacos, inclusive de solubilidade. Assim, o presente trabalho buscou avaliar a imunomodulação *in vitro* de complexos de inclusão de ofloxacino com betaciclodextrina (OFLOX/ β CD) e 2-hidroxipropil- β -CD (OFLOX/HP β CD), frente a linhagem de câncer de mama MDA-MB-231. Foi possível observar que a citotoxicidade dos complexos OFLOX/ β CD e OFLOX/HP β CD é dependente de tempo e dose. Nas maiores concentrações (300 μ M), os complexos induziram apoptose e necrose. O complexo OFLOX/HP β CD apresentou melhores resultados em relação ao complexo OFLOX/ β CD.

Palavras-chaves: Câncer de mama; ofloxacino; complexo de inclusão; ciclodextrinas.

ABSTRACT

The treatment of breast cancer is complex and often limited by its adverse effects, especially when it comes to the subtype that does not express hormone receptors and epidermal growth factor 2. The development of a new drug is expensive and time-consuming, therefore, it is necessary to search for other strategies for the treatment with better cost-effectiveness, such as the repositioning of drugs. Fluoroquinolones are antimicrobials, which have cytotoxic activity in several cancer cell lines reported in studies. Ofloxacin is a second-generation fluoroquinolone, this drug has a broad spectrum of bactericidal action against Gram-negative bacteria and Gram-positive by inhibition of DNA gyrase and topoisomerase IV. However, ofloxacin has low solubility in water, which can hinder its dissolution and bioavailability, therefore, an alternative to improve these aspects is fundamental. One possibility is complexation with cyclodextrins, structures capable of modifying physicochemical characteristics of drugs, including solubility. Thus, the present work sought to evaluate the in vitro immunomodulation of inclusion complexes of ofloxacin with betacyclodextrin (OFLOX/ β CD) and 2-hydroxypropyl- β -CD (OFLOX/HP β CD), against the breast MDA-MB-231. It was possible to observe that the cytotoxicity of the OFLOX/ β CD and OFLOX/HP β CD complexes is time and dose dependent. At the highest concentrations (300 μ M), the complexes induced apoptosis and necrosis. The OFLOX/HP β CD complex showed better results than the OFLOX/ β CD complex.

Keywords: Breast cancer; ofloxacin; inclusion complex; cyclodextrin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura química do OFLOX.....	19
Figura 2: Estrutura e propriedades das ciclodextrinas.....	23
Figura 3: Esquema do mecanismo de inclusão da molécula hóspede com ciclodextrinas.....	23
Figura 4: Classes do Sistema de Classificação Biofarmacêutica.	24
Figura 5: Cultura de células MDA-MB-231.	27
Figura 6: Redução do MTT nas células viáveis	28
Figura 7: Ciclo celular	31
Figura 8: Avaliação da citotoxicidade da OFLOX, OFLOX/ β CD e OFLOX/ HP β CD nas concentrações de 50 μ M, 100 μ M e 300 μ M em células MDA-MB-231 após 48 horas de tratamento.	37
Figura 9: Avaliação da citotoxicidade de β CD e HP β CD nas concentrações de 50 μ M, 100 μ M e 300 μ M em células MDA-MB-231 após 48 horas.	39
Figura 10: Avaliação da citotoxicidade da OFLOX, OFLOX/ β CD e OFLOX/HP β CD nas concentrações de 50 μ M, 300 μ M e 300 μ M em células MDA-MB-231 após 72 horas.....	40
Figura 11: Avaliação da citotoxicidade de β CD e HP β CD nas concentrações de 300 μ M, 100 μ M e 50 μ M em células MDA-MB-231 após 72 horas	43
Figura 12: Porcentagem de apoptose em células MDA-MB-231 tratadas com OFLOX, OFLOX/ β CD, OFLOX/HP β CD a 300 μ M em 36 horas.....	44
Figura 13: Porcentagem de necrose em células MCF-7 tratadas com OFLOX, OFLOX/ β CD, OFLOX/HP β CD a 300 μ M em 36 horas.	46

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACS	American Cancer Society
BRCA1	Gene do câncer de mama 1
BRCA2	Gene do câncer de mama 2
CDK	Quinase dependente de ciclina
CDS	Ciclodextrinas
CI	Complexo de inclusão
C _{max}	Concentração Plasmática Máxima
DMSO	Dimetilsulfóxido
ER	Receptor de Estrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FBS	Soro Bovino Fetal
FDA	Food and Drug Administration
FQs	Fluoroquinonas
HER2	Receptor de Fator de crescimento epidérmico
MTT	4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil-2H-tetrazólio
OD	Densidade Óptica
P&D	Produção e Desenvolvimento
PAR1	Receptor 1 Ativo por Protease
PI	Iodeto de propídeo
PR	Receptor de Progesterona
PS	Fosfatidilserina
TNBC	Câncer de Mama Triplo Negativo

TNM	Classificação de Tumor Maligno
OMS	Organização Mundial da Saúde
α CD	Alfa-ciclodextrina
β CD	Beta-ciclodextrina
γ CD	Gama-ciclodextrina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1. CÂNCER DE MAMA	12
2.2. REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS	17
2.3. QUINOLONAS	18
2.4. CICLODEXTRINAS	22
2.5. AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTITUMORAL	26
2.5.1. MDA-MB-231	26
2.5.2. O ensaio de MTT nos estudos da viabilidade celular	28
2.5.3. Avaliação do ciclo celular e apoptose	30
3. OBJETIVO	34
3.1. OBJETIVO GERAL	34
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1. OBTENÇÃO DOS COMPLEXOS DE OFLOXACINO COM HP β CD E β CD	35
4.2. CULTURA CELULAR DE MDA-MB-231	35
4.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO DE CÉLULAS MDA-MB-231	35
4.4. AVALIAÇÃO DA APOPTOSE EM CÉLULAS MDA-MB-231 TRATADAS COM OS COMPLEXOS DE INCLUSÃO	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO DE CÉLULAS MDA-MB-231 EM 48 E 72 HORAS	37
5.2. AVALIAÇÃO DA APOPTOSE DAS CÉLULAS MDA-MB-231 APÓS 36 HORAS DO TRATAMENTO COM OS COMPLEXOS DE OFLOXACINO COM CICLODEXTRINAS	43
5.3. AVALIAÇÃO DA NECROSE DAS CÉLULAS MDA-MB-231 APÓS 36 HORAS DO TRATAMENTO COM OS COMPLEXOS DE OFLOXACINO COM CICLODEXTRINAS	45
6. CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS	49

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um grupo de doenças heterogêneas e complexas que podem atingir qualquer célula humana. O câncer de mama inicia com a proliferação de células dos ductos ou lóbulos que sofreram mutação em seu material genético. Atualmente esse tipo de câncer acomete milhares de mulheres (e também homens em menor porcentagem) ao redor do mundo, sendo segundo tipo de câncer mais prevalente no Brasil (AKRAM *et al.*, 2017; INCA, 2019).

Esse problema de saúde mundial, se tornou mais evidente com a mudança do estilo de vida ativo para um estilo sedentário por parte da população e, junto a isso, os tratamentos atuais disponíveis para o câncer de mama são agressivos e geram efeitos adversos, prejudicando a qualidade de vida dos pacientes acometidos pela doença (POLYAK, 2007; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022). Desta forma, as pesquisas ao redor do mundo para contribuir de forma eficaz e rápida em doenças alarmantes e que podem se tornar resistentes ao tratamento, como o câncer, se tornaram mais intensas e fundamentais. Pela necessidade de novas terapias, surgiu a proposta do reposicionamento de fármacos já registrados, esse que é um processo mais rápido e com menor custo, visto que, os estudos de segurança e clínicos já foram realizados e com isso, não necessita de investimentos muito altos como na pesquisa e desenvolvimento de um novo medicamento (YADAV; TALWAR, 2019; KHAN *et al.*, 2020).

As fluoroquinolonas são fármacos antimicrobianos derivados do ácido nalidíxico bem difundidos em pesquisas de reposicionamento, e foi sugerido que podem exibir além da atividade antimicrobiana a atividade antitumoral (YADAV *et al.*, 2015). O ofloxacino (OFLOX) é uma fluoroquinolona de segunda geração pouco estudada em relação ao câncer. Apresenta atividade frente a diversas bactérias gram-positivas e gram-negativas e possui como mecanismo de ação a inibição da topoisomerase II (DNA girase) e topoisomerase IV bacteriana. Estudos mostram que fármacos que possuem mecanismo de envenenamento das topoisomerasas podem ser possíveis agentes antitumorais, devido a relação dessas com a replicação celular e sobrevivência (SCHOLAR, 2007; AHADI; EMAMI, 2020).

A otimização das propriedades de fármacos insolúveis pode ser realizada através da utilização das ciclodextrinas (CDs). Essas estruturas se caracterizam como oligossacarídeos macrocíclicos que possuem moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas α -1,4. São estruturas capazes de formar complexos de inclusão com a finalidade de modificar algumas características físico-química de determinadas moléculas, devido à sua cavidade possuir caráter hidrofóbico enquanto sua parte externa hidrofílica. Além das CDs naturais (α CD, β CD e γ CD),

existem ainda seus derivados sintéticos 2-hidroxiopropil- β -CD (HP β CD), 2,6-di-O-etil- β -CD e sulfobutiléter- β -CD (SBE β CD) (JANSOOK *et al.*,2018; DEL VALLE, 2004).

Visto a problemática de saúde mundial que o câncer de mama representa atualmente, o OFLOX foi objeto de estudo do presente trabalho junto às CDs β CD e HP β CD, para avaliação do potencial efeito antitumoral dos complexos de inclusão de OFLOX e as ciclodextrinas frente à linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-231.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. CÂNCER DE MAMA

O câncer é caracterizado pela proliferação exacerbada, crescimento desordenado e alterações na diferenciação e coesão celular, tais aspectos são resultantes de mutações e danos ao DNA das células. Essas mutações podem ser hereditárias ou decorrentes de carcinógenos, como fatores ambientais, químicos, hormonais, virais e estilo de vida, por exemplo, alimentação inadequada, consumo de bebida alcoólica e cigarro (AKRAM *et al.*, 2017; COELHO *et al.*, 2018; POLYAK, 2007; SARTORI; BASSO, 2019).

As mutações genéticas podem acontecer de duas formas: pela ativação de proto-oncogenes em oncogenes e pela inibição dos genes supressores de tumor e dos genes que controlam a apoptose (LEE; MULLER, 2010; SARTORI; BASSO, 2019). Os proto-oncogenes em células normais podem ter função de fatores de crescimento, transdutores de sinais celulares e fatores de transcrição nuclear que controlam o ciclo celular. Assim, a mutação desses proto-oncogenes para oncogenes induzem o crescimento, divisão e progressão do câncer. Os genes supressores tumorais e controladores da apoptose auxiliam na morte de células em grande proliferação, no reparo do DNA e ativação do ponto de verificação no ciclo celular, a inibição desses genes causa a perda de suas funções. Esses dois tipos de mutação geram um desequilíbrio no ciclo celular e favorecem o desenvolvimento do câncer (LEE; MULLER, 2010).

A promoção do câncer de mama se inicia a partir de fatores genéticos e epigenéticos, culminando nas mutações celulares que modificam o ciclo celular e seu controle. Com isso, ocorre uma desordenada e descontrolada proliferação ductal ou lobular que, posteriormente, progride para tumores benignos ou metástase por estimulação contínua de agentes carcinógenos (SUN *et al.*, 2017). A herança genética de alterações nos genes como P53, BRCA1 e BRCA2, representam um importante fator para o desenvolvimento do tumor mamário, pois são responsáveis por cerca de 5 a 10% dos casos (SARTORI; BASSO, 2019). Esses genes, participam diretamente nas atividades de metabolismo celular como, reparo de dano do material genético, regulação da expressão gênica e controle do ciclo celular. Os estrogênios endógenos e exógenos também estão relacionados com o desenvolvimento de câncer de mama (SUN *et al.*, 2017).

Segundo Esparza-lópez *et al.* (2017), o câncer de mama é caracterizado como uma doença heterogênea e complexa. Essa heterogeneidade foi caracterizada no início do século 21,

quando foram identificados cinco subtipos moleculares de um grande grupo de tumores de mama, baseado na expressão de receptores hormonais, que são: luminal A, caracterizado por ser receptor de estrogênio (ER) e receptor de progesterona (PR) positivo; luminal B, ER positivo, PR positivo e receptor de fator de crescimento epidérmico 2 (HER2) positivo; HER2 positivo; tipo basal, ER, PR e HER2 negativo ou triplo negativo e tipo normal (DAI *et al.*, 2015). Cada subtipo apresenta aspectos histológicos, patológicos e moleculares particulares, além de tratamento, prognóstico e metástase diferentes. Desta forma, tumores classificados como luminais A possuem baixos níveis de genes associados à multiplicação e um bom parecer. Já os luminais B, os níveis de proliferação são mais altos e um prognóstico ruim. Os tumores HER2 e tipo basal são agressivos, os basais ainda possuem alta taxa mitótica (ESPARZA-LÓPEZ *et al.*, 2017; WEIGELT; GEYER; REIS-FILHO, 2010). Os tumores luminais são positivos para receptores ER ou PR, assim, respondem ao tratamento hormonal, já os tumores HER2 positivos, têm amplificação e superexpressão do receptor de fator de crescimento epidérmico 2 e são utilizadas abordagens anti-HER2. Os tumores basais não dispõem desses receptores sendo caracterizados como triplo negativos, com isso, não existe um tratamento além da quimioterapia para esse subtipo. Importante destacar que apenas 20% dos tumores triplo negativos tratados com quimioterapia respondem bem ao tratamento (POLYAK, 2011).

Além da caracterização do câncer de mama pelos subtipos moleculares, ele ainda pode ser dividido em tipo não invasivo e invasivo. O câncer de mama não invasivo pode se desenvolver no lóbulo ou ducto da mama e a princípio não se espalham para os tecidos adjacentes. Assim, são denominados como carcinoma lobular *in situ* e carcinoma ductal *in situ* (AKRAM *et al.*, 2017). O câncer de mama invasivo, também presente nos lóbulos ou ductos mamários, tem a capacidade de acometer os tecidos próximos e se multiplicar. A neoplasia de mama é metastática, ou seja, migra através da corrente sanguínea ou sistema linfático e se estende a outros órgãos, como ossos, fígado, pulmão e cérebro, tal aspecto reflete na impossibilidade de cura da doença. O diagnóstico no início da doença pode conduzir a um bom prognóstico e um alto índice de sobrevida (SUN *et al.*, 2017).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) (2019), o câncer de mama, em estimativa mundial de 2018, foi identificado como o segundo maior tipo incidente no mundo, depois do câncer de pulmão. No Brasil, estima-se que ocorram 66.280 novos casos por ano entre 2020 e 2022, um risco de 61,61 novos casos a cada 100 mil mulheres. (INCA,2019). Nas mulheres, o câncer de mama é o mais prevalente em todo Brasil, sendo o mais recorrente o carcinoma que pode ser *in situ* ou invasivo. Ainda em 2018, houveram 2,1

milhões de novos diagnósticos de câncer de mama no mundo, correspondendo a 11,6% de todos os cânceres estimados (BRAY *et al.*, 2018; FERLAY *et al.*, 2018). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), no ano de 2020 ocorreram 685.000 mortes no mundo decorrente do câncer de mama e 2,3 milhões de mulheres foram diagnosticadas com câncer de mama. Entre os anos de 2015 a 2020 foram diagnosticadas com câncer 7,8 milhões de mulheres, sendo este tipo de câncer o mais prevalente do mundo (OMS, 2021).

De acordo com a OMS (2021), não existe um fator especificamente determinante para se desenvolver o câncer de mama, porém o gênero feminino é um fator considerável, já que apenas 0,5 a 1 % de homens desenvolvem o câncer de mama (OMS, 2021; INCA, 2019). Além disso, a idade pode aumentar o risco de mutações que resultam no aparecimento de um possível câncer, principalmente em mulheres de 50 anos de idade em que as taxas de incidência aumentam (INCA, 2019; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Alguns agravantes podem ser relacionados como os fatores genéticos, mutações dos genes BRCA1 e BRCA2, e fatores hereditários, câncer de ovário na família (BRAY *et al.*, 2018; FERLAY *et al.*, 2018). Ademais se associam os fatores intrínsecos, tais como ocorrências relacionadas às fases da vida reprodutiva da mulher (menarca precoce, nuliparidade, idade da primeira gravidez após 30 anos, uso de contraceptivos orais, menopausa tardia e tratamento de reposição hormonal), obesidade, estilo de vida, entre outros. (INCA, 2019; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Contudo, mesmo se esses fatores de riscos fossem controlados, diminuiria apenas em 30% as chances de desenvolver o câncer de mama (OMS, 2021).

Nos países desenvolvidos, a taxa de sobrevida após o (a) paciente ser diagnosticado (a) com câncer de mama situa em torno de 85%, já no Brasil, essa taxa é próxima de 80% (INCA, 2019). O diagnóstico pode ser realizado por exame físico ou autoexame e pela mamografia. Desta forma, quanto mais prévio o diagnóstico maior será a sobrevida do paciente. O exame de mamografia auxilia nesses diagnósticos precoces, no rastreamento e na evolução dos tratamentos adjuvantes. Para confirmar a suspeita de câncer de mama pela mamografia ou na identificação de nódulo mamário pelo autoexame, é realizada a biópsia. Além de confirmar a doença, o material da biópsia é ferramenta para classificar o tipo molecular do carcinoma por análise imuno-histoquímica. Contudo, para a escolha do procedimento terapêutico, a expressão dos ER, PR e HER-2 são parâmetros de maior relevância. Ademais, a categorização do câncer por meio da Classificação de Tumores Malignos (TNM), que descreve a localização e distância, tamanho, acometimento linfonodal e metástase, também se associa ao prognóstico e tipo de tratamento (BARROS *et al.*, 2001; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

O tratamento do câncer de mama depende das características do tumor, prognóstico e individualidade do paciente, como idade, comorbidades e *status* menopausal. A intervenção pode ser local, por meio de cirurgias e radioterapia, ou baseada na terapia sistêmica administrada por via oral ou intravenosa (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022; INCA, 2019; OMS, 2021). A tabela 1 um apresenta um resumo dos estágios do câncer de mama e os possíveis tratamentos.

Quadro 1: Estágios e seus tratamentos relacionadas a neoplasia maligna mamária.

ESTÁGIOS	TRATAMENTOS
Estágio I e II	<p>Cirurgia conservadora com retirada apenas do tumor ou mastectomia com retirada da mama e reconstrução mamária. Radioterapia pode ser adotada como em situações de cirurgia como terapia complementar. O tratamento sistêmico é determinado de acordo com o risco de recorrência do paciente.</p>
Estágio III	<p>Tumores maiores quando comparados aos estágios I e II, porém, que ainda sejam localizados. Inicialmente é feito o tratamento sistêmico, geralmente adotando a quimioterapia e após resposta adequada, prossegue-se para tratamento local (radioterapia ou cirurgia).</p>
Estágio IV	<p>Principal modalidade adotada é o tratamento sistêmico, podendo ter tratamento localizado em indicações restritas. Nesse estágio é fundamental equilíbrio entre a resposta tumoral e o possível prolongamento da sobrevida, devido aos potenciais efeitos colaterais.</p>

Fonte: Adaptado de Brasil, 2022.

Inicialmente, a cirurgia é o tratamento primário no câncer de mama, envolvendo o procedimento na mama e axila (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Segundo a ACS (American Cancer Society) (2022), existem duas categorias principais de cirurgia da mama, a cirurgia conservadora da mama que tem como alvo a retirada do câncer e algum tecido normal periférico e a mastectomia, em que toda a mama é retirada incluindo tecidos adjacentes em alguns casos.

A radioterapia é um tratamento adjuvante, ou seja, utilizada após o procedimento cirúrgico. Nesse recurso terapêutico são utilizados raios ou partículas de alta energia para eliminar células tumorais (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). A radioterapia pode ser abordada em situações como, quatro ou mais linfonodos positivos, após cirurgia de mama com margem positiva e sem a possibilidade de outra cirurgia, tumores maiores ou iguais a 5cm e em caso de metástase. Pode ser utilizada também como neoadjuvante, administrada antes da cirurgia, em caso de ineficácia da quimioterapia (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

A terapia sistêmica inclui a quimioterapia, hormonioterapia, terapia biológica e imunoterapia, recentemente aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), com o objetivo de cura ou prolongamento da vida da paciente. A intervenção sistêmica pode ser empregada como neoadjuvante ou como adjuvante (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022; INCA, 2019; OMS, 2021). Visto a heterogeneidade do câncer de mama e as características do paciente, múltiplos aspectos devem ser analisados para a administração desse tratamento, principalmente a subtipagem biológica do tumor (INCA, 2019; OMS, 2021). Desta forma, os esquemas de tratamento são diversos e englobam medicamentos como o tamoxifeno e inibidores de aromatase em tumores que expressam ER e/ou de PR (OMS, 2021). Contudo, são muitos os efeitos colaterais que a quimioterapia gera, os mais comuns são perda de cabelos, troca de unhas, aftas, perda de apetite, náuseas, vômito e diarreia. O paciente em tratamento quimioterápico ainda pode ter maior susceptibilidade a infecções, devido ao comprometimento de células da medula, risco de desenvolver câncer de ovário, hematomas, sangramentos e fadiga (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022).

Tudo isso reflete na rotina do paciente, uma vez que esse tipo de tratamento também atinge células saudáveis do organismo além das tumorais. Assim, uma alternativa medicamentosa para evitar esses efeitos ou minimizá-los pode aumentar a adesão à terapia e ser mais eficaz. Portanto, o desenvolvimento de novos fármacos para tratamento de câncer de mama é constantemente título de pesquisas no mundo.

2.2. REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS

O processo de desenvolvimento de um novo fármaco é complexo, caro e longo, desse modo, demanda altos investimentos em pesquisa e desenvolvimento (P&D), cerca de 2,6 bilhões de dólares (DILLY; MORRIS, 2017). Além do custo, outro problema é o tempo para uma molécula ser aprovada como um novo medicamento, variando de 10 a 15 anos. (XUE *et al.*, 2018; YADAV; TALWAR, 2019). Ainda em relação às desvantagens dos processos de P&D, é possível observar a baixa possibilidade de êxito dessa nova entidade química nos testes necessários para se tornar um medicamento aprovado pelas Agências Reguladoras, sendo de apenas 10% (XUE *et al.*, 2018). Apesar do aumento de investimentos em P&D pelas indústrias farmacêuticas, um relatório da Food and Drug Administration (FDA) mostrou que o número de medicamentos novos que chegam ao mercado está em decréscimo desde 1995 (YADAV; TALWAR, 2019). Até 2016 a quantidade foi de 22 fármacos registrados, esse total comparado a 20 anos atrás, em que 53 novos medicamentos foram aprovados, é relativamente baixo (PILLAIYAR *et al.*, 2020; XUE *et al.*, 2018). Diante desses fatores, a busca para identificar fármacos para determinados alvos biológicos incluiu outras alternativas, como o reposicionamento de fármacos (YADAV; TALWAR, 2019).

O método de utilização de medicamentos já regulamentados para uso humano para novas indicações é chamado de reposicionamento, redirecionamento, reaproveitamento, *reprofiling* de medicamentos, troca terapêutica ou de indicação. Essa abordagem é uma alternativa eficaz diante dos obstáculos da forma tradicional de desenvolvimento de fármacos, uma vez que, apresenta-se como uma técnica de menor custo, rápida e sem riscos (KHAN *et al.*, 2020).

Muitos fármacos de sucesso foram obtidos a partir do reposicionamento, onde o efeito colateral observado serviu como indicação para o tratamento de outras desordens do organismo. Um exemplo foi o sildenafil inicialmente foi desenvolvido como medicamento anti-hipertensivo, mas com a incidência de um efeito adverso foi reposicionado para tratamento de disfunção erétil (PUSHPAKOM *et al.*, 2018). Outro exemplo é do ácido acetilsalicílico, sua atividade original é a anti-inflamatória e após 60 anos de sua comercialização, foi reposicionado como fármaco de ação antiagregante plaquetário (YUE *et al.*, 2014).

Enquanto o reposicionamento ocorre em quatro etapas (identificação do composto, aquisição do composto, desenvolvimento e monitoramento de segurança pós-mercado das agências reguladoras), as estratégias tradicionais abordam cinco etapas (descoberta e estudos

pré-clínicos, revisão de segurança, pesquisa clínica, revisão das agências reguladoras e monitoramento de segurança pós-mercado das agências reguladoras) (XUE *et al.*, 2018).

Com os avanços nas áreas de bioinformática o tempo para o reposicionamento de um fármaco é consideravelmente menor, pois todos ou a maioria dos ensaios pré-clínicos em animais, ensaios clínicos, segurança e desenvolvimento da fórmula farmacêutica já foram realizados e relatados. Assim, com a existência prévia e disponibilidade desses dados acerca de tais parâmetros, o tempo e o custo serão menores para aprovação do medicamento no tratamento de determinada condição patológica (HUANG *et al.*, 2021; PUSHPAKOM *et al.*, 2018).

Em relação ao tempo, estima-se que o tempo necessário para descobrir novos alvos de medicamentos, seja em média de 1 a 2 anos e de 8 anos para redirecionar uma droga. Em comparação aos novos medicamentos, os reposicionados possuem um custo reduzido de 50 a 60%. Por esse motivo, para aplicar o sistema de reposicionamento, as indústrias farmacêuticas e outras instituições, como acadêmicas e governamentais, necessitam de um aporte financeiro menor do que na estratégia clássica. Assim, o reaproveitamento de medicamentos, surge também como uma alternativa para a pesquisa de fármacos de países em desenvolvimento para contornarem a falta de investimentos em P&D (ARMANDO; MENGUAL; GOMEZ, 2020; DILLY; MORRIS, 2017). Além disso, esse método é vantajoso em relação às informações das propriedades do medicamento, como farmacocinética, farmacodinâmica e toxicidade, uma vez que essas propriedades já foram estabelecidas por testes e análises em humanos e animais, o que colabora para os medicamentos serem submetidos a testes clínicos em menor tempo. Somado a isso, a porcentagem de aprovação de fármacos redirecionados é de 30% em contrapartida a taxa de aprovação das novas drogas é de 10% (JAIN; GRUPTA, 2015).

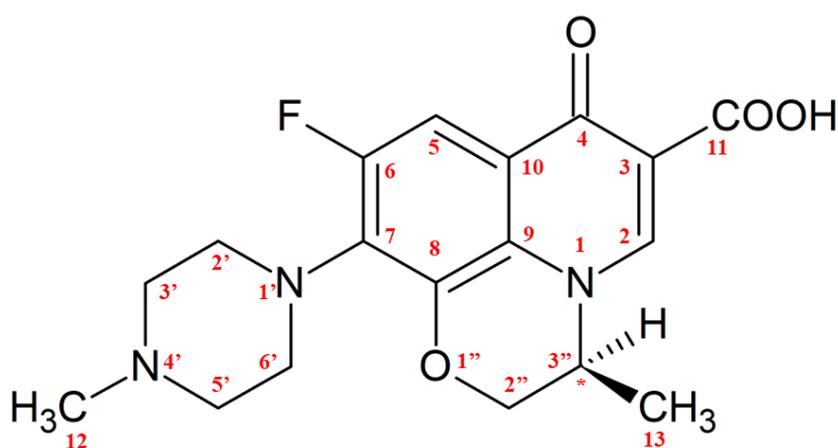
Os medicamentos com potenciais chances de serem reposicionados são divididos três grupos: o primeiro constituído de fármacos aprovados com patentes expiradas, o segundo constituído de fármacos que já foram submetidos a testes clínicos, mas não estão no mercado e o terceiro formado por fármacos patenteados, aprovados ou em fase avançada de desenvolvimento clínico (CHA *et al.*, 2017).

2.3. QUINOLONAS

As quinolonas representam uma classe de antimicrobianos com diversos compostos, o ácido nalidíxico foi o primeiro a ser identificado como antibacteriano em 1962. Desde então, outros derivados de quinolonas foram sintetizados com o objetivo de melhorar suas

propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, surgindo as fluoroquinolonas. As modificações estruturais responsáveis por essa síntese são: a incorporação de um átomo de flúor na posição R6 e um anel piperazina na posição R7 (figura 1). Com essas inclusões, estes compostos apresentaram maior espectro de ação abrangendo algumas bactérias Gram-positivas e maior atividade diante das bactérias Gram-negativas. Além disso, a lipossolubilidade e a distribuição das fluoroquinolonas foram aumentadas ao adicionar grupo alquila no anel piperazina e no nitrogênio na posição R1, aprimorando também as propriedades farmacocinéticas (GOUVEA, 2013; YADAV; TALWAR, 2019).

Figura 1: Estrutura química do OFLOX.



Fonte: Adaptado de DOMAGALA, 1994.

O OFLOX é um fármaco de segunda geração da classe das fluorquinolonas e, apresenta atividade frente a diversas bactérias gram-positivas e gram-negativas. Em 1990 esse medicamento foi aprovado pela FDA, exibindo melhor disponibilidade oral, uma meia-vida mais longa e menor metabolismo, que diminui a possibilidade de interações com outras substâncias (GRAHAM; TRIPP, 2020; YUK *et al*, 1991).

Em relação às propriedades físico-químicas, o OFLOX é um pó cristalino, de cor amarelo claro ou amarelo brilhante, pouco solúvel em água, mas se ocorrer alguma variação de pH a solubilidade desse fármaco também pode variar (GENNARO, 1990; SWEETMAN, 2002). Possui um carbono quiral, devido à presença de um grupo metil no anel oxazina, com isso se apresenta como uma mistura racêmica. Os enantiômeros possuem diferentes potências contra as bactérias, neste caso o isômero S é cerca de 8 a 128 vezes mais potente que o isômero R (PARIS, 2012; EL-ZAHRY; LENDL, 2018).

O OFLOX pode ser administrado por via oral, intravenosa ou tópica (AL-OMAR, 2009; GRAHAM; TRIPP, 2020). Na administração por via oral, a absorção e a biodisponibilidade aproximam-se de 100%. A taxa de absorção pode ser reduzida com a ingestão de alimentos ou complexos formados com minerais como ferro ou cálcio. Após 1 a 2 horas da administração oral de 400 mg do fármaco, as concentrações plasmáticas máximas (C_{max}) de 3 a 4 mg/ mL são atingidas e estão diretamente associadas a dose administrada. Os valores de C_{max} , quando esse medicamento é administrado por via intravenosa, podem ser 50% maiores em comparação a via oral, mas não oferece uma vantagem na eficácia ou atividade do fármaco. Isso ocorre devido a sua rápida redução e as concentrações plasmáticas seguintes se igualarem as da formulação oral, uma vez que, a absorção por essa via é rápida e quase total (AL-OMAR, 2009; ONRUST; LAMB; BALFOUR, 1998).

Assim como outras fluoroquinolonas, o OFLOX apresenta baixa ligação às proteínas plasmáticas (cerca de 20 a 25%), possui uma ampla distribuição nos tecidos e fluidos corpóreos. O tempo de meia-vida plasmática é de cerca de 5 a 8 horas, o que pode variar de acordo a função renal do paciente. Possui um baixo metabolismo de primeira passagem, sendo 90% eliminado na urina no período de 48 horas e 4 a 8% é eliminado nas fezes. Quase 10% é excretado na forma de metabólitos e o restante na forma inalterada (AL-OMAR, 2009; SCHOLAR, 2007).

O OFLOX é um antimicrobiano de ação bactericida que possui como mecanismo de ação a inibição da DNA girase bacteriana e da topoisomerase IV, por meio da ligação a essas enzimas. A enzima DNA girase é importante no processo de regulação dos níveis de superenrolamento do DNA e a topoisomerase IV na separação das duplas-hélices ligadas após a replicação. Desta forma, com a inibição da DNA girase, conseqüentemente a fita-dupla de DNA se quebra devido à alta tensão, assim o OFLOX impede os processos de transcrição, replicação e de reparo do DNA, impossibilitando a divisão celular bacteriana (SCHOLAR, 2007; ABDEL-AAL *et al.*, 2019; AHADI;EMAMI, 2020).

Além do seu efeito antibacteriano, vários representantes da classe das fluoroquinolonas apresentaram efeitos imunomoduladores *in vitro* em diversos tipos de linhagens celulares de câncer (YADAV *et al.*, 2015). O mecanismo de ação das fluoroquinolonas de inibição das enzimas DNA girase e conseqüente morte celular é semelhante à ação de “envenenamento por topoisomerase” de medicamentos antitumorais tradicionais como doxorrubicina e etoposideo (OPPEGARD *et al.*, 2018). Desta forma, essa classe de fármacos pode ser potencialmente eficaz no tratamento de cânceres, uma vez que pode induzir apoptose, interromper alteração bioquímica de células potencialmente cancerígenas, aumentar a absorção de outros

quimioterápicos e imunomodulação em combinação ou puros (YADAV *et al.*, 2015; IDOWU; SCHWEIZER, 2017).

Além de seu efeito antibacteriano contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, várias fluoroquinolonas e seus derivados sintéticos demonstraram alta atividade citotóxica em diferentes linhagens de células tumorais, mostrando-se promissoras como agentes de tratamento do câncer. Muitos estudos demonstram o efeito promissor das fluoroquinolonas na inibição de células tumorais e às vezes esses fármacos exibem baixa citotoxicidade para células normais (ASIF, 2014; YADAV *et al.*, 2015).

Em estudo realizado, o OFLOX inibiu a proliferação de células de carcinoma transicionais (MBT-2 e T24) pelo comprometimento da ação da telomerase em dose acima de 50µg/mL. Os autores mostraram que em níveis acima de 100µg/mL diminuiu a viabilidade celular de MBT-2 e T24. Ainda, relataram que a atividade das duas fluoroquinolonas é dependente de dose e tempo. Não houve diferença entre OFLOX e levofloxacino (YAMAKUCHI *et al.*, 1997).

Kamat, Dehaven e Lamm (1999), apresentaram que OFLOX e ciprofloxacino em três linhagens celulares de carcinoma transicional humano, T24, HTB9 e TccSup, nas concentrações de 0 (controle) a 1000µg/mL em 24, 48 e 96 horas, se mostraram citotóxicas. Em 96 horas, o ciprofloxacino apresentou citotoxicidade significativa a partir de 12,5 µg/mL (HTB9, TccSup) e 50 µg/mL (T24) e para OFLOX a 12,5 µg/mL (HTB9) e 50 µg/mL (TccSup, T24).

Ciprofloxacino (CFX) e o levofloxacino (LVX) apresentaram atividade na parada do ciclo celular na fase S e apoptose em linhagens T24 (câncer de bexiga humano), DU-145 (câncer de próstata humano). CFX foi mais citotóxico do que LVX para todas as linhagens celulares testadas, os dois fármacos exibiram efeitos fracos em células não tumorais. A expressão dos genes da topoisomerase II foi regulada negativamente, sugerindo o efeito inibitório das fluoroquinolonas (KLOSKOWSKI *et al.*, 2021).

O levofloxacino exibiu resultados de inibição de proliferação e indução de apoptose em células de câncer de pulmão (A549, H3255, NCL-69 e H460) e em xenoenxerto de camundongos. Como mecanismo, Song *et al.*, (2016) apresentaram que o levofloxacino inibe a respiração mitocondrial e diminui a quantidade de ATP pelo bloqueio dos complexos I e III da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria. Além de aumentar os níveis de espécies reativas de oxigênio (SONG *et al.*, 2016).

Outro representante é enoxacina, que em linhagem de câncer de mama (MCF-7) inibiu a proliferação celular. Além disso, enoxacina é capaz de aumentar a produção de miRNAs. É importante ressaltar que a baixa expressão dessas moléculas está associada aos desenvolvimentos de câncer. (IDOWU; SCHWEIZER, 2017).

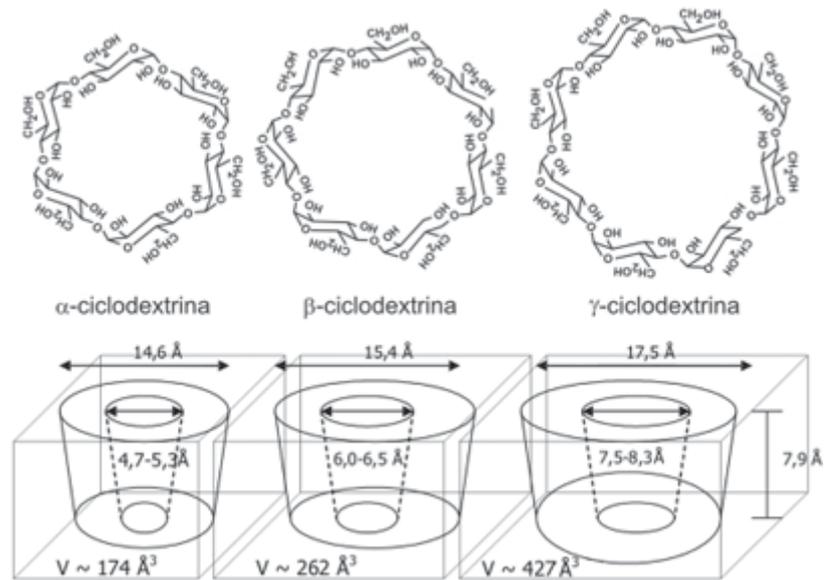
2.4. CICLODEXTRINAS

A descoberta das ciclodextrinas (CDs) ocorreu em 1891, quando Antoine Villiers isolou essas estruturas produzidas pela ação enzimática da ciclodextrina glicosiltransferase, realizada por bactérias da espécie *Bacillus amylobacter*, no amido. Contudo, só a partir de 1980 que as CDs foram introduzidas na indústria farmacêutica e de alimentos (KURKOV; LOFTSSON, 2013).

As CDs naturais se caracterizam como oligossacarídeos macrocíclicos que possuem 6, 7 ou 8 unidades de D-glicopiranosose unidas por ligações glicosídicas α -1,4, conhecidas como alfa-ciclodextrina (α CD), beta-ciclodextrina (β CD) e gama-ciclodextrina (γ CD), respectivamente. O arranjo dos monômeros resulta na estrutura das CDs de cone truncado, com parte externa hidrofílica pela presença de hidroxilas livres, enquanto que sua cavidade possui caráter hidrofóbico, devido à presença de átomos de oxigênio nas ligações glicosídicas e átomos de hidrogênio (DEL VALLE, 2004). A quantidade de unidades de D-glicopiranosose que forma cada uma das CDs citadas anteriormente é que define o tamanho de sua cavidade (CARNEIRO *et al.*, 2019). A estrutura cíclica confere às CDs menor suscetibilidade à degradação pela ação de enzimas, além de serem ótimas agentes complexantes e solubilizantes (JANSOOK *et al.*, 2018). As CDs naturais estão representadas na figura 2.

Esses fatores possibilitam a dissolução de substâncias com baixa solubilidade em meio aquoso, pelo motivo das CDs apresentarem espaço intramolecular que viabiliza o desenvolvimento de complexos de inclusão (CI) com outros compostos (SAOKHAM *et al.*, 2018). A formação dos CI envolve a substituição de moléculas de água presentes nas cavidades das CDs (hospedeira) por outra molécula de interesse (hóspede). Para originar o complexo a molécula hóspede deve possuir uma parte lipofílica de tamanho adequado à cavidade da CD (CALSAVARA; ZANIN; MORAES, 2012; VENTURINI *et al.*, 2008). A figura 3 esquematiza o mecanismo de inclusão de uma molécula hóspede em uma CD.

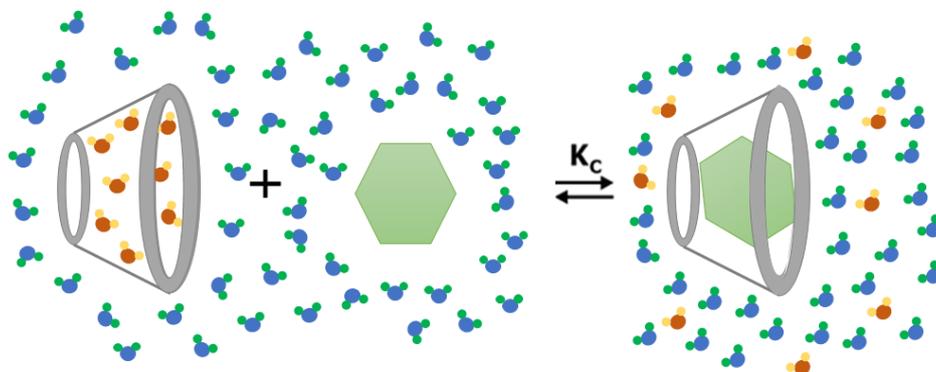
Figura 2: Estrutura e propriedades das ciclodextrinas.



Fonte: VENTURINI *et al.*, 2008.

Dentre as finalidades da síntese de complexos com CDs estão: aumento de solubilidade e taxa de dissolução de fármacos, aumento de biodisponibilidade, promover maior estabilidade, melhorar propriedades sensoriais como odor e sabor, entre outras. A principal aplicação dos complexos de inclusão com CDs é o aumento da solubilidade de moléculas pouco solúveis em água (KURKOV; LOFTSSON, 2013; CARNEIRO *et al.*, 2019).

Figura 3: Esquema do mecanismo de inclusão da molécula hóspede com ciclodextrinas.

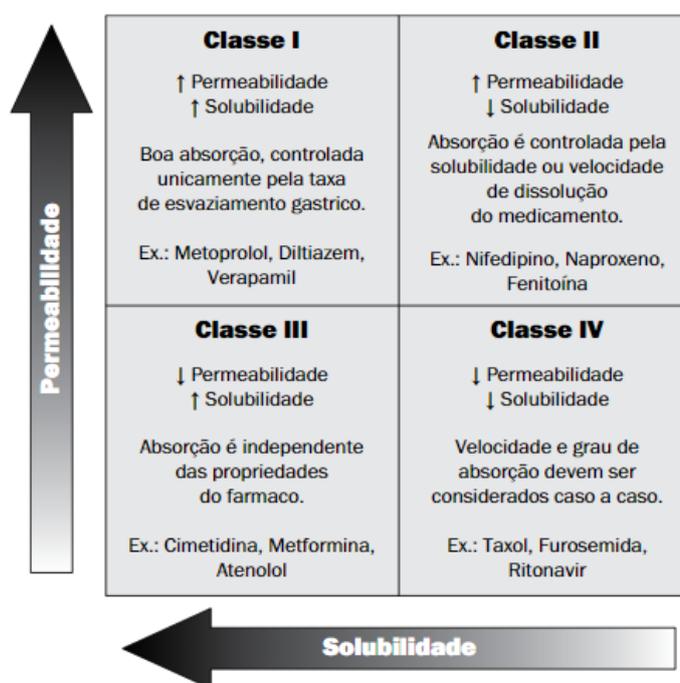


Legenda: K_c : constante de complexação.

Fonte: Adaptado de SZEJTLLI, 1998.

Muankaew e Loftsson (2017) citam que segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (figura 4) as CDs são eficazes no incremento da solubilidade de fármacos de classe II (alta permeabilidade e baixa solubilidade) e em alguns casos também pode aumentar esse parâmetro nos medicamentos de classe IV (baixa permeabilidade e baixa solubilidade). Desta forma, as CDs contribuem para a mudança de fármacos classe II ou IV para classe I (alta permeabilidade e alta solubilidade). Compostos lipofílicos exibem maior citotoxicidade em comparação aos hidrofóbicos, uma vez que são mais permeáveis às membranas celulares. Desta forma, a inclusão desses compostos em CDs incrementa a solubilidade e pode diminuir a permeabilidade, o que contribui para uma menor toxicidade (LOFTSSON, 2002).

Figura 4: Classes do Sistema de Classificação Biofarmacêutica.



Fonte: ESTEVES *et al.*, 2020.

Desde a produção na forma pura das CDs, principalmente a β CD, tem sido amplamente empregada como enzimas sintéticas, formação de complexos de inclusão, separadores quirais e excipientes de medicamentos, uma vez que, são solúveis em água, possuem baixo custo, atóxicos, facilmente funcionalizados e disponíveis no mercado (CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2007). As CDs ainda exercem ação de proteção de moléculas suscetíveis a volatilização e oxidação (BRAGA, 2019). Atualmente, as CDs estão amplamente difundidas em produtos farmacêuticos, cosméticos, indústria química e de alimentos. Vários tipos de

formulações como comprimidos, colírios e pomadas que utilizam dessa molécula estão presentes no mercado (COISNE *et al.*, 2016).

Além das CDs naturais existem ainda seus derivados sintéticos 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD), 2,6-di-O-etil- β -ciclodextrina e sulfobutiléter- β -ciclodextrina (SBE β CD), sendo distribuídos em três classes: hidrofílico, hidrofóbico e ionizável, respectivamente (OLIVEIRA; SANTOS; COELHO, 2009). A necessidade dessas modificações surgiu devido as limitações das propriedades de solubilidade, tamanho e produtividade das CDs naturais, assim, essas variações estruturais têm por objetivo produzir CDs com maior capacidade de solubilidade, estabilidade e complexação (MUANKAEW; LOFTSSON, 2017; ZAFAR, 2021).

A HP β CD é produzida a partir da reação de óxido de propileno com β CD, que inclui um grupo hidroxipropila na estrutura da β CD. Com isso, a capacidade solubilizante desta é cerca de 27 vezes maior que da β -CD, além disso, sua cavidade hidrofóbica é maior pela incorporação dos substituintes (ZAFAR, 2021; KURKOV; LOFTSSON, 2013). Seu uso é bem difundido para melhora de solubilidade de fármacos em água, sendo recomendada como solubilizante pela FDA (ZAFAR, 2021). Além disso, apresenta baixa toxicidade, segura para administração parenteral e muito utilizada com compostos antitumorais e imunomoduladores (CARNEIRO *et al.*, 2019; CARVALHO, 2019).

Ashwaq *et al.* (2017) realizaram um estudo de complexação de HP β CD e clausenidina, com objetivo de avaliar a melhoria nas propriedades físico-químicas e antitumoral em células de câncer de cólon HT29. Além de proporcionar uma melhor citotoxicidade frente a linhagem HT29, o complexo Clu/HP β CD exibiu menor efeito colateral. O complexo ainda, modificou a solubilidade para 56 vezes maior de clausenidina. O complexo de inclusão Clu/HP β CD, também induziu apoptose pela produção de espécies reativas de oxigênio.

Fahmy *et al.* (2022), avaliou a melhora da atividade antioxidante, antiviral e antitumoral de extrato de farelo de arroz complexado com HP β CD. O complexo aumentou a atividade antioxidante pelo maior contato com radicais livre hidrofílicos, apresentou atividade antiviral cinco vezes maior que o extrato sozinho e em linhagens de câncer de mama (MCF-7) e câncer cervical (HeLa) apresentou citotoxicidade significativa após 48 horas.

A solubilidade em água e a taxa de dissolução de norfloxacino em combinação com β CD foram aumentadas, também foi relatado um incremento na potência do fármaco em combinação com a β CD em relação ao fármaco puro (CHIERENTIN *et al.*, 2014).

O levofloxacino complexado com HP- β -CD, exibiu atividade antimicrobiana aumentada em relação ao fármaco puro contra quatro cepas bacterianas incluindo duas bactérias Gram-negativas e duas bactérias Gram-positivas (LI *et al.*, 2022).

Ren *et al.* (2019) realizaram estudo para melhorar a solubilidade aquosa do balofloxacino através da preparação dos CI de balofloxacino com CDs. Neste estudo, CIs em estado sólido foram obtidos usando β CD, HP β CD e 2,6-dimetil- β -ciclodextrina (DM β CD). A solubilidade dos CIs aumentou centenas de vezes e a ordem de solubilidade dos três CIs foi balofloxacino com DM β CD, HP β CD e β CD.

2.5. AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTITUMORAL

2.5.1. MDA-MB-231

A utilização de cultura de celular na investigação do câncer e de outras doenças é importante, uma vez que, estas células em meio de cultura são autorreplicantes fornecendo uma população homogênea de células. Em 1958, foi descoberta a BT-20, a primeira linhagem celular de câncer de mama e após cerca de 20 anos que iniciou a difusão de outras linhagens como a MD Anderson e MCF-7 (HOLLIDAY; SPEIRS, 2011).

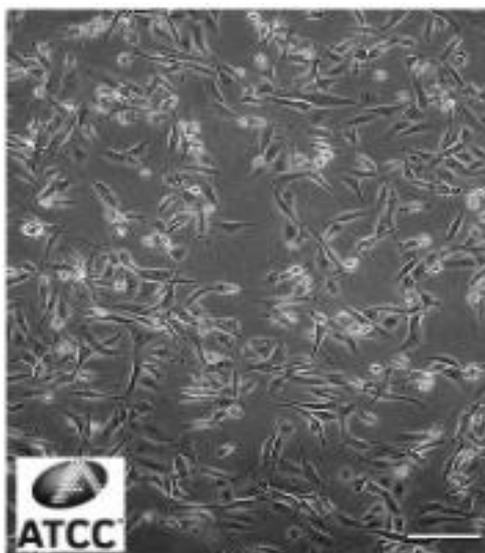
A MDA-MB-231 (Figura 5) é uma linhagem celular de câncer de mama humano de morfologia epitelial, que foi isolada inicialmente de um extravasamento pleural de uma paciente de 51 anos diagnosticada com um adenocarcinoma de mama metastático. Essa linhagem é frequentemente utilizada em pesquisas relacionadas ao câncer de mama em fase avançada (WELSH, 2013).

A célula MDA-MB-231 apresenta como características ser altamente agressiva, invasiva e um bom modelo pela semelhança ao câncer de mama triplo negativo, classificada como um subtipo basal, uma vez que não expressa os receptores ER, PR e também não possuem o HER2, mas possuem receptor do fator de crescimento epidérmico (EGRF), também conhecido como fator de crescimento epidérmico HER1 (SUBIK *et al.*, 2010).

MDA-MB-231 apresenta nível elevado na expressão de Ki-67 (marcador utilizado na avaliação imuno-histoquímica do câncer de mama), como demonstrado no estudo de Subik e colaboradores (2010) essa célula exibiu uma coloração 100% positiva para Ki-67, E-caderina negativo e p53 com mutação. O mecanismo de invasão das células MDA-MB-231 ocorre pela

degradação proteolítica da matriz extracelular. Além disso, essa linhagem expressa o receptor do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1R) que interage com o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) (LEAL-ORTA *et al.*, 2021).

Figura 5: Cultura de células MDA-MB-231.



Fonte: ATCC, 2021.

Akekawatchai *et al.* (2005), sugeriram que o receptor da quimiocina CXCL12, denominado CXCR4 e o receptor IGF-1R são expressos em MDA-MB-231 e formam um complexo. Essa interação permite que o ligante IGF-1 ative sinalizações de migração celular. Essas células também produzem fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF ou CSF 1) para estimular a chegada de macrófagos.

Park e colaboradores (2017) a partir de suas análises, apresentaram que há expressão de IL-18 nas células MDA-MB-231 e também identificaram a presença de IL-18 em sobrenadantes de cultura dessas células. A expressão de IL-18 tem relação com a diminuição de células NK com atividade antitumoral, exercendo uma ação de imunossupressão.

A linhagem de células MDA-MB-231 apresenta uma superexpressão de receptor de quimiocina 1 (XCR1), DO e CHO (2020) confirmam que esta superexpressão estimula a migração dessas células pela atenuação de β -catenina. Essa linhagem possui um perfil de células mesenquimais com grande potencial migratório e invasivo. O receptor 1 ativo por protease (PAR1) é altamente expresso nessas e auxilia no desencadeamento da invasão tumoral e metástase (WANG *et al.*, 2021)

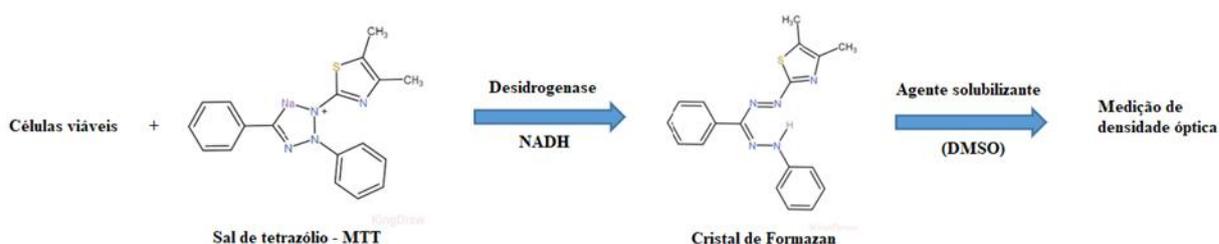
A MDA-MB-231 é uma célula de propriedade de crescimento aderente, sendo assim, necessita uma ancoragem para ser cultivada. Além disso, exige algumas condições de cultura

como temperatura a 37° C, cresce bem em meio L-15 de Leibovitz suplementado com 2nM de glutamina e 15% de soro bovino fetal (FBS). Esse meio sustenta a multiplicação celular em ambientes sem equilíbrio de CO₂ (BCRJ, 2022) Além desse meio de cultura, outros podem ser empregados no cultivo desta linhagem, como RPMI-1640 com L-glutamina suplementado com 1% de penicilina/estreptomicina, 10% de FBS a 37° C e 5% de CO₂, utilizado por Park e colaboradores (2017). As células MDA-MB-231 devem ser cultivadas até alcançar uma densidade entre 1-3 x 10⁴ células/cm² e repicadas quando a confluência atingir 70 a 80% (SARAIVA *et al.*, 2020).

2.5.2. O ensaio de MTT nos estudos da viabilidade celular

O ensaio de MTT foi caracterizado por Mosmann, em 1983. No estudo, foi descrito a avaliação da viabilidade de células de linfoma de camundongo frente a tratamentos citotóxicos através do ensaio colorimétrico que utilizava um substrato, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), que mudaria a coloração quando alterado por células vivas (MOSMANN, 1983). Desta forma, o ensaio de MTT é um método colorimétrico baseado no sal de MTT, um composto que em solução possui coloração amarela, que ao sofrer redução pelas células vivas promove o surgimento de cristais de formazan de coloração púrpura (Figura 6). Glóbulos vermelhos, células mortas, células do baço e linfócitos estimulados por concanavalina A não são capazes de clivar o anel de tetrazol da molécula de MTT. A absorbância resultante é medida em razão da coloração da solução obtida e mensurada por densidade óptica no espectrofotômetro com comprimento de onda entre 500 e 600nm. Portanto, a coloração é proporcional à quantidade de células viáveis (GHASEMI *et al.*, 2021; MOMENI; ABNOSI; ESKANDARI, 2020; PASCUA-MAESTRO, 2018).

Figura 6: Redução do MTT nas células viáveis



Fonte: Adaptado de BURANAAMNUAY, 2021.

Com a evolução do teste de MTT, também houve a elucidação de alguns mecanismos, como os de metabolização desta substância dentro da célula. Desde a introdução do método de MTT acreditava-se que a conversão do tetrazólio em cristais de formazan, era realizada pelo sistema succinato desidrogenase mitocondrial (BURANAAMNUAY, 2021). Contudo, há controvérsias, segundo Stockert (2012) a mitocôndria não possui capacidade redutora e sim oxidante. Porém, as mitocôndrias são importantes para fornecer as coenzimas de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH), que são as responsáveis pela redução do MTT. Entretanto, essas coenzimas também são encontradas no retículo endoplasmático, citosol e membrana plasmática, locais em que o MTT também pode ser metabolizado. (BURANAAMNUAY, 2021; STOCKERT, 2012; VAN DEN BERG, 2015).

O MTT possui carga líquida positiva, o que facilita o seu processo de endocitose pela célula. Já dentro da célula é transportado para o retículo endoplasmático onde ocorrerá a metabolização (BERRIDGE; HERST; TAN, 2005). A acumulação de cristais de formazan não é benéfica para a estrutura da célula, pois pode induzir apoptose, lise celular e aumentar a permeabilidade, então é presumível a excreção desses cristais formados (GRELA; KOZIOWSKA; GRABOWIECKA, 2018). Alterações foram realizadas na etapa de dissolução dos cristais de formazan, que era realizada pela adição de isopropanol acidificado o que demandava tempo maior de execução e agora se adiciona o dimetilsulfóxido (DMSO) (FOTAKIS; TIMBRELL 2006; NGA *et al.*, 2020; VAN TONDER; JOUBERT; CROMARTY, 2015).

Esse método geralmente é realizado em microplaca de 96 poços como no estudo de Ghasemi *et al.* (2021). Alguns tipos celulares podem necessitar de uma incubação prévia a inclusão do composto a ser analisado, que pode variar de 0 a 24 horas. O tempo de tratamento das células com o composto que será testado pode durar de 24 a 96 horas, sendo que, após esse período são incubadas com o MTT por 3 a 4 horas (GANOT *et al.*, 2013). É necessário retirar o meio de cultura para adição de solvente (DMSO), uma vez que os componentes do meio como vermelho de fenol e proteínas precipitantes são fatores que interferem na medição da absorbância. A absorbância das células viáveis será comparada a um grupo controle (DENIZOT; LANG, 1986).

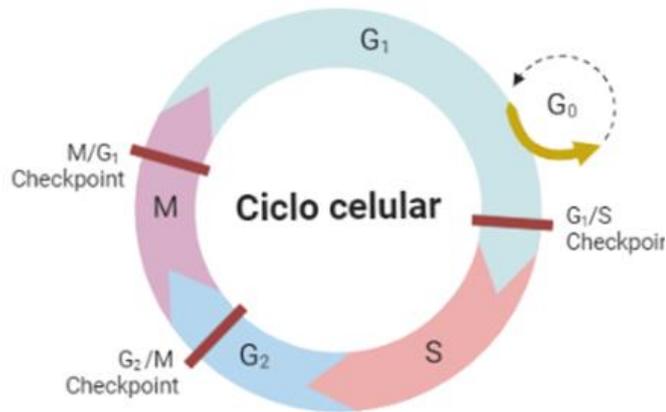
Portanto, o ensaio MTT é bastante utilizado para avaliação da citotoxicidade *in vitro* de diversas substâncias, é um método seguro, versátil, de simples execução, pouco dispendioso e pode ser utilizado para testes em diversas linhagens celulares utilizando um ou mais compostos testes simultaneamente (AHMADIAN *et al.*, 2009; MONSMANN, 1983; NGA *et al.*, 2020).

Apesar de tais características, a partir do ensaio MTT não é possível obter dados acerca do mecanismo molecular, pelo o qual a droga exerce atividade citotóxica (GANOT *et al.*, 2013).

2.5.3. Avaliação do ciclo celular e apoptose

O crescimento celular é fundamental em organismos eucariotos ao longo do seu desenvolvimento, equilíbrio homeostático e da sua regeneração celular. (GAO; LIU, 2019). O ciclo celular (Figura 7) é o processo responsável da divisão celular em duas células filhas, constituído por quatro fases em sequência: Gap 1 (G1), Síntese (S), GAP 2 (G2) e Mitose (M) (MENS; GHANBARI, 2018; DIAZ-MORALLI *et al.*, 2013). A etapa G1 é uma fase mediadora que antecede a fase S, momento que as células passam pelo “ponto de restrição”. A passagem das células por este ponto é definida pela produção de proteínas essenciais para a proliferação celular e por outros sinais extrínsecos (GAO; LIU, 2019; MENS; GHANBARI, 2018). Na fase S, ocorre a replicação do DNA. Para isso a topoisomerase II é fundamental no processo, uma vez que, regula o superenrolamento do DNA e organização do arranjo genômico. A atuação da enzima topoisomerase II é substancial para a viabilidade celular na fase M e, crucial após o início da etapa S, viabilizando a separação dos cromossomos, a estruturação genômica e para impedir a entrada de células anormais na anáfase (HEUVEL, 2005; LEE; BERGER, 2019). Falhas nos processos dependentes de topoisomerase II causam a ativação de um ponto de verificação que interrompe o ciclo celular na mudança de G2 para M e protege contra danos genômicos; a ausência deste ponto de verificação relaciona-se a carcinogênese (LEE; BERGER, 2019). Após a etapa de síntese, a célula passa pela fase G2 que é uma segunda fase mediadora, nesta interfase há um novo ponto de verificação de integridade do material genético. Na fase mitótica, acontece a separação dos conjuntos dos cromossomos sintetizados em duas células-filhas (MENS; GHANBARI, 2018). Para que a célula em divisão siga para a próxima fase sem danos e possíveis erros, os pontos de verificação ou checkpoints (G1 / S, G2 / M e os pontos de verificação do fuso mitótico) são fundamentais. Os *checkpoints* quando ativados por detecção de alguma mutação, induzem a parada do ciclo celular para o reparo ou morte, falhas nesses pontos podem induzir ou potencializar o desenvolvimento de tumor (Diaz-Moralli *et al.*, 2013; THU *et al.*, 2018; GAO; LIU, 2019)

Figura 7: Ciclo celular



Adaptado de GAO; LIU, 2019.

Ademais, a regulação do ciclo celular é relacionada à atividade inibidora ou de ativação de quinases dependentes de ciclinas (CDKs), que são proteínas quinases serina / treonina que se ligam a uma ciclina formando complexos ciclina-CDK para controlar a progressão do ciclo celular, com isso, permitem a síntese de DNA e segregação dos cromossomos ou a interrupção do processo (WANG, 2021).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) também estão associadas ao controle do ciclo celular, elas podem ser produzidas pelo metabolismo mitocondrial ou derivadas de outras organelas. As EROs controlam transduções de vias de sinalização como apoptose, crescimento celular e proliferação. Já foi relatado o papel ambíguo das EROs, em que, altos níveis levam a uma resposta de dano celular e de genoma, desta forma, ocorre a parada do ciclo celular e após prolongamento dessa interrupção, a apoptose. Ao mesmo passo que um aumento dos níveis de EROs de forma moderada, é necessário para dar início a progressão da quiescência para a fase G₁ do ciclo celular (DIAZ-MORALLI *et al.*, 2013).

O equilíbrio entre a proliferação celular e a morte celular programada é imprescindível para manter a homeostasia do organismo. O resultado entre sinais positivos e negativos estabelece a decisão entre a divisão celular ou a apoptose. A perda desse equilíbrio pode acarretar em apoptose ou crescimento celular inadequados (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

A apoptose é um importante mecanismo de morte celular em condições fisiológicas e patológicas. Durante o desenvolvimento, envelhecimento e para manter a homeostasia, ocorrem constantes processos apoptóticos (ELMORE, 2007). A morte celular programada é regulada a

nível gênico, quando ocorre algum tipo de dano celular, essas células danificadas são removidas de forma eficiente por este processo (PISTRITTO *et al.*, 2016).

A iniciação da apoptose ocorre por meio da ativação de proteases endógenas, denominadas caspases, que comprometem toda a estrutura interna da célula, contribuindo para a morte e preparação da remoção da célula por fagocitose (TAYLOR; CULLEN; MARTIN, 2008). Sendo assim, a apoptose é considerada um mecanismo de defesa antitumoral, em que, vários agentes quimioterápicos atuam através da indução desse tipo de morte celular, reduzindo a população de células alteradas (NICHOLSON, 2000).

O mecanismo de apoptose é complexo e compreende várias vias de sinalização, podendo ser iniciado por vias extrínsecas ou intrínsecas mediadas pelas caspases que resultam em uma via comum de apoptose (PISTRITTO *et al.*, 2016). As caspases são fundamentais no mecanismo de apoptose, uma vez que, são iniciadoras e executoras (WONG, 2011). As caspases iniciadoras são sintetizadas na sua forma inativa, pró-caspase, e a partir de interações com moléculas adaptadoras específicas, realizam uma auto-proteólise e se ativam. As caspases iniciadoras ativadas clivam as caspases executoras, desta forma, que as caspases executoras quebram substratos celulares culminando na morte celular por apoptose (PISTRITTO *et al.*, 2016).

As células em processo de apoptose sofrem alterações morfológicas e bioquímicas, que vão desde alterações na membrana celular até a fragmentação do DNA da célula. Essas alterações apresentam um padrão semelhante de ocorrência independente do estímulo ocorrido, seja ele uma situação de estresse ou agente químico utilizado (ZIEGLER; GROSCURTH 2004). As alterações que ocorrem são: condensação da cromatina e quebra nuclear, a célula se torna arredondada, picnótica e ainda ocorre a retração dos pseudópodes. A membrana não é rompida durante o processo. Contudo, as células fagocíticas são ativadas e reconhecem a fosfatidilserina (PS) expressas na parte externa da membrana celular, e com isso, eliminam essas células e impedem a liberação de substâncias pró-inflamatórias (WONG, 2011; PISTRITTO *et al.*, 2016; ELMORE 2007).

A citometria de fluxo pode ser usada para analisar diferentes eventos celulares ao mesmo tempo, como a apoptose, e pode analisar uma ou milhares de células. Para isso, as células precisam estar suspensas em solução tamponada a base de sal para passar por lasers e dispersar a luz visível. A análise também pode ser realizada por fluorescência, utilizando de corantes fluorescentes como iodeto de propídio (PI) ou por anticorpos conjugados a fluorocromos (WLODKOWIC *et al.*, 2011; MCKINNON, 2018). Para detecção do processo de

apoptose nas células, utiliza-se a anexina V, uma proteína de ligação de fosfatidilserina recombinante que possui alta afinidade e especificidade para resíduos de fosfatidilserina (ELMORE, 2007). O uso em conjunto de anexina V e marcador de permeabilidade, permite a separação de células vivas, apoptóticas e necróticas. Células vivas exibem coloração mínima referente a anexina V e PI, no início da apoptose as células apresentam coloração intensa de anexina V. Em apoptose tardia as células possuem coloração intensa dos dois marcadores. (WLODKOWIC *et al.*, 2011).

3. OBJETIVO

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antitumoral do complexo de OFLOX com HP β CD e β CD (OFLOX/ β CD e OFLOX/HP β CD) em células de câncer de mama MDA-MB-231.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Cultivar células MDA-MB-231 e tratá-las com OFLOX puro e OFLOX complexado com HP β CD e β CD.

Avaliar a viabilidade de células MDA-MB-231 tratadas com OFLOX puro e OFLOX complexado com HP β CD e β CD.

Avaliar a indução da apoptose de células MDA-MB-231 tratadas com OFLOX puro e OFLOX complexado com HP β CD e β CD.

Avaliar a indução de necrose de células MDA-MB-231 tratadas com OFLOX puro e OFLOX complexado com HP β CD e β CD.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. OBTENÇÃO DOS COMPLEXOS DE OFLOXACINO COM HP β CD E β CD

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

4.2. CULTURA CELULAR DE MDA-MB-231

A linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-231 foi cultivada em meio RPMI-1640 contendo 10% de soro bovino fetal (SBF), 1% de aminoácidos essenciais e 0,5% penicilina/estreptomicina. As células foram mantidas em ambiente com temperatura controlada de 37° C e equilíbrio de 5% de CO₂, até confluência celular (AMARO *et al.*, 2020).

4.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO EM CÉLULAS MDA-MB-231

Para determinar a viabilidade em células MDA-MB-231, foi utilizado o método colorimétrico de MTT. As células foram adicionadas em placas de 96 poços na quantidade de $7,5 \times 10^5$ e receberam o tratamento com OFLOX, β CD, HP β CD e os complexos de inclusão (OFLOX/ β CD e OFLOX/HP β CD) nas concentrações de 50 μ M, 100 μ M e 300 μ M. Transcorridos os tempos de tratamento de 48 e 72 horas, os sobrenadantes das células foram retirados. Em seguida, 100 μ L de meio de cultura RPMI-1640 e 10 μ L de solução MTT (5mg/mL) foram adicionados em cada poço. As placas foram incubadas por 4 horas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Após esse tempo, o meio de cultura foi retirado e adicionados 100 μ L de DMSO, posteriormente, realizou-se a leitura da densidade óptica com auxílio do leitor de microplaca *Multiskan™ FC* Microplate Photometer em comprimento de onda de 570 nm (AMARO *et al.*, 2020).

4.4. AVALIAÇÃO DA APOPTOSE E NECROSE EM CÉLULAS MDA-MB-231 TRATADAS COM OS COMPLEXOS DE INCLUSÃO

A análise de morte celular por apoptose em células MDA-MB-231 foi realizada por citometria de fluxo, pelo kit de detecção de apoptose Anexina V (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific). As células foram cultivadas em placas de 96 poços, na quantidade de 1×10^6 , tratadas com a concentração $300 \mu\text{M}$ (OFLOX, OFLOX/ βCD e OFLOX/HP βCD) e incubadas por 36 horas. Decorrido o tempo de tratamento, as células foram tripsinizadas e lavadas com tampão fosfato. Em seguida, as células foram marcadas com Anexina V – FITC e iodeto de propídio (AMARO *et al.*, 2020). Após a marcação, as células foram incubadas no escuro em temperatura ambiente por 15 minutos. Os resultados das análises foram obtidos por citômetro de fluxo (FACSVerse, BD Biosciences) e os dados analisados no software FCSexpress 3.0.

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

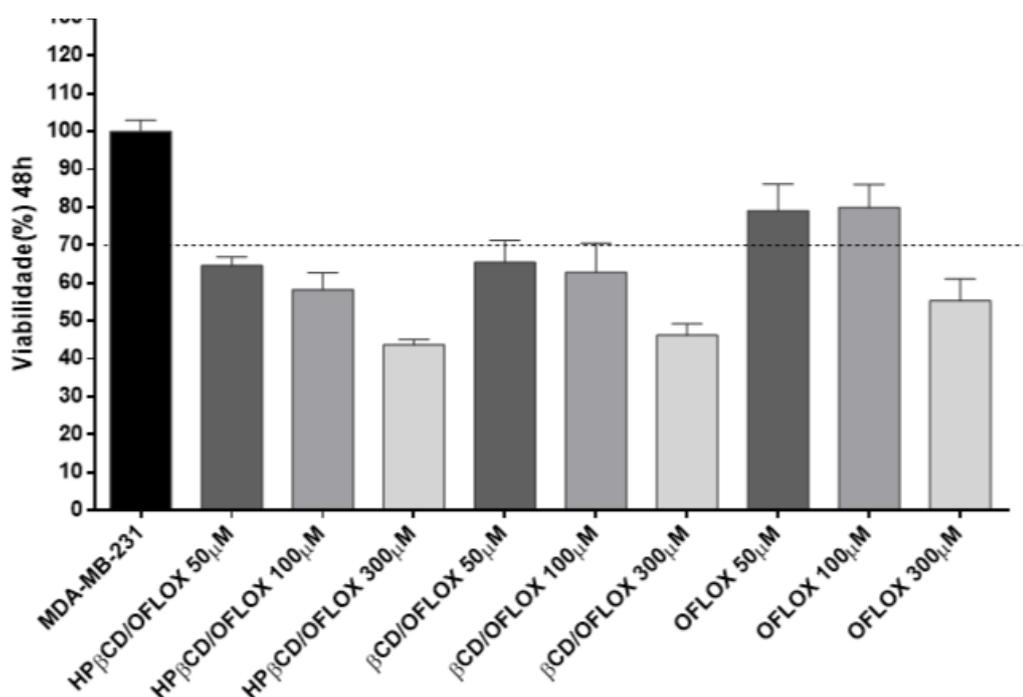
Para os ensaios de apoptose e necrose os resultados apresentados são representativos de pelo menos três experimentos independentes e são mostrados como média \pm desvio padrão. A significância de diferença foi analisada usando o teste t de Student, teste de Mann-Whitney e ANOVA quando apropriado. As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

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO DE CÉLULAS MDA-MB-231 EM 48 E 72 HORAS

A figura 8 representa os resultados de viabilidade celular de MDA-MB-231 em 48 horas após o tratamento com os complexos de inclusão OFLOX/ β CD e OFLOX/HP β CD, nas concentrações de 50 μ M, 100 μ M e 300 μ M. Também, estão representados os resultados da célula com a presença de OFLOX puro, nas concentrações de 50 μ M, 100 μ M e 300 μ M e a célula sem tratamento.

Figura 8: Avaliação da citotoxicidade da OFLOX, OFLOX/ β CD e OFLOX/HP β CD nas concentrações de 50 μ M, 100 μ M e 300 μ M em células MDA-MB-231 após 48 horas de tratamento.



Legenda: OFLOX: ofloxacino; OFLOX/ β CD: complexo de inclusão ofloxacino/ β -ciclodextrina; OFLOX/HP β CD: complexo de inclusão ofloxacino/hidroxipropil- β -ciclodextrina; MDA-MB-231: linhagem de câncer de mama.

Os complexos de inclusão OFLOX/ β CD e OFLOX/HP β CD, apresentaram redução da viabilidade celular para abaixo de 70% na linhagem de MDA-MB-231, essa redução foi dependente da concentração em comparação a células não tratadas. Contudo, na concentração de 300 μ M estes complexos mostraram um melhor resultado na diminuição de viabilidade

celular. De acordo a ISO 10993-5 (2009), uma substância apresenta potencial citotóxico no teste de MTT quando reflete em uma viabilidade celular menor que 70%. Desta forma, o potencial citotóxico do OFLOX complexado com ciclodextrinas, foi observado nos resultados de viabilidade celular após 48 horas e 72 horas, principalmente, quando se trata do complexo OFLOX/HP β CD na concentração de 300 μ M.

Seay e colaboradores (1996) realizaram um estudo para avaliar a inibição da proliferação celular e síntese de DNA, utilizando duas fluoroquinolonas (ciprofloxacino e OFLOX) em três linhagens de carcinoma de células transicionais. Os autores concluíram que, os antibióticos em estudo inibiram a proliferação e síntese de DNA nas três linhagens celulares de forma dependente de dose e tempo. Assim, os resultados corroboram com os obtidos no presente trabalho, em que nas maiores concentrações a redução de viabilidade foi maior. Além disso, a inibição da síntese de DNA no estudo de Seay e colaboradores (1996), corrobora com o possível mecanismo antitumoral do OFLOX de inibição da topoisomerase II proposto por Yadav *et al.* (2015) e Oppegard *et al.* (2018).

Outro estudo em consonância aos resultados obtidos de MTT, é o de Yamakuchi e colaboradores (1997). Os autores constataram que a atividade antiproliferativa de OFLOX e levofloxacino em células de tumor geniturinário é dependente de concentração e tempo e que, na concentração de 200 μ g/ml houve redução significativa do material genético. Ainda levantaram a hipótese que esses compostos perturbaram a função mitocondrial, uma vez que, o método de MTT analisa a atividade mitocondrial.

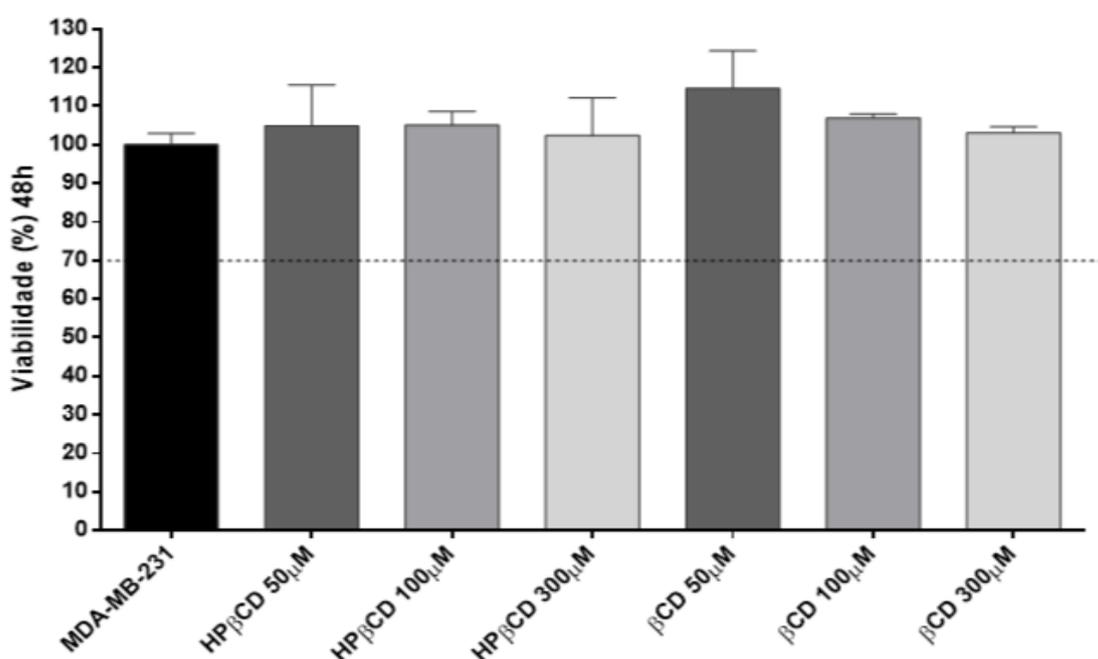
Yadav *et al.* (2015), investigaram moxifloxacina e ciprofloxacino na proliferação de células de câncer pancreático (MIA PaCa-2 e Panc-1). Foi observado que as duas fluoroquinolonas inibiram a proliferação das linhagens de câncer pancreático de maneira dose e tempo dependentes. Visto que, os resultados mostram que na concentração de 400 μ g/ml e no tempo maior de estudo 48 horas, houve maior inibição. Também avaliaram a redução do potencial de membrana causado pelas fluoroquinolonas, e os resultados indicam que moxifloxacino e ciprofloxacino induzem uma ruptura significativa do potencial de membrana mitocondrial em ambas as linhagens celulares, o que pode ser relacionado com a hipótese de perturbação mitocondrial de Yamakuchi e colaboradores (1997).

Yu, Li e Zhang (2016) investigaram os efeitos do levofloxacino na proliferação e apoptose em quatro linhagens de células de câncer de mama (MCF-7, MDA-MB-468, SkBr-3 e MDA-MB-231) e duas linhagens de células de mama normais (HMT-3522 e MCF-10A). A fluoroquinolona inibiu a proliferação celular das quatro linhagens de células de câncer de mama

de forma dose dependente. Também foi observado que as células mamárias normais eram menos sensíveis ao composto que as tumorais. Além disso, os resultados mostraram que o levofloxacino inibiu a biogênese mitocondrial, reduziu o potencial de membrana e níveis de ATP nas linhagens tratadas. As células tumorais utilizam o maquinário mitocondrial muito mais que uma célula normal, portanto, o mtDNA que estipula a massa mitocondrial e demanda energética é encontrado em quantidade maior no câncer de mama. Deste modo, o tumor mamário necessita mais da biogênese mitocondrial que uma célula normal, sendo assim, uma inibição do metabolismo mitocondrial causa mais efeito no tumor (JÄRÅS; EBERT, 2011).

No presente trabalho foi avaliada a citotoxicidade das CDs puras (β CD e HP β CD) nas concentrações de 50 μ M, 100 μ M e 300 μ M em células MDA-MB-231 após 48 horas de tratamento. Como mostrado na figura 9, foi observado que as nanopartículas não apresentaram citotoxicidade e desta forma não possuem impacto na redução da viabilidade das células estudadas.

Figura 9: Avaliação da citotoxicidade de β CD e HP β CD nas concentrações de 50 μ M, 100 μ M e 300 μ M em células MDA-MB-231 após 48 horas.

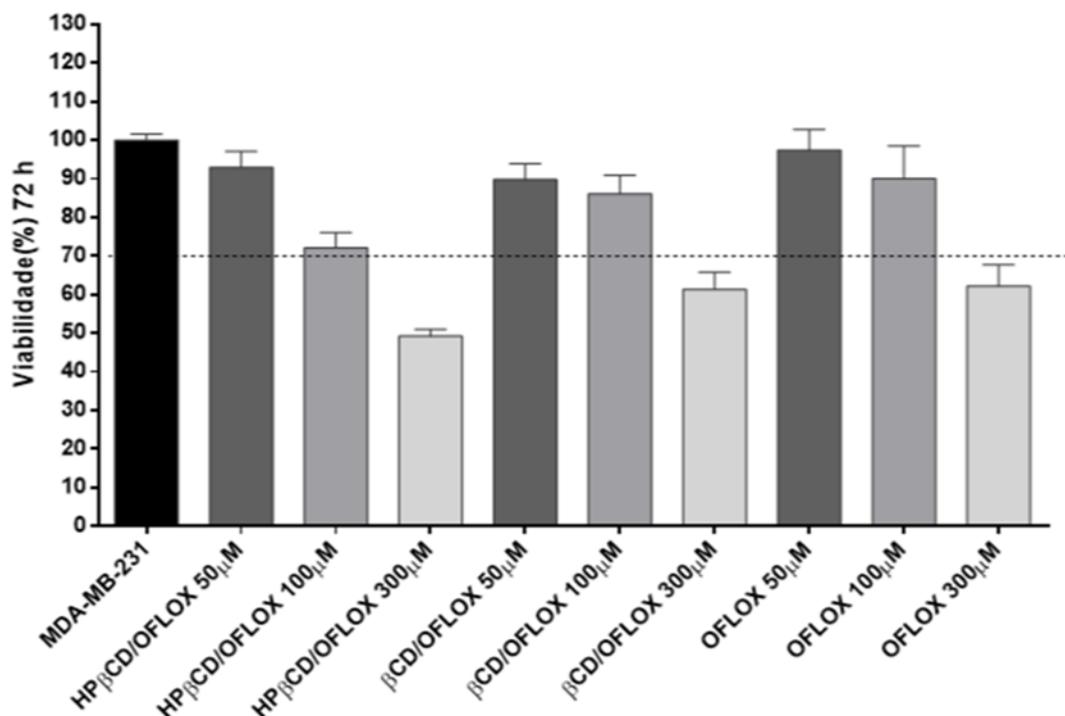


Legenda: β CD: β -ciclodextrina; HP β CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina; MDA-MB-231: linhagem de câncer de mama.

A figura 10 representa os resultados de viabilidade celular de MDA-MB-231 após 72 horas do tratamento com os complexos de inclusão OFLOX/ β CD e OFLOX/HP β CD, nas concentrações de 50 μ M, 100 μ M e 300 μ M. Também, estão representados os resultados da célula

com a presença de OFLOX puro, nas concentrações de 50 μ M, 100 μ M e 300 μ M e a célula sem tratamento. Os complexos de inclusão OFLOX/ β CD 300 μ M e OFLOX/HP β CD 300 μ M e OFLOX 300 μ M, apresentaram redução da viabilidade celular para abaixo de 70% na linhagem de MDA-MB-231 dependente da concentração em comparação a células não tratadas.

Figura 10: Avaliação da citotoxicidade da OFLOX, OFLOX/ β CD e OFLOX/HP β CD nas concentrações de 50 μ M, 300 μ M e 300 μ M em células MDA-MB-231 após 72 horas.



Legenda: OFLOX: ofloxacino; OFLOX/ β CD: complexo de inclusão ofloxacino/ β -ciclodextrina; OFLOX/ HP β CD: complexo de inclusão ofloxacino/hidroxipropil- β -ciclodextrina; MDA-MB-231: linhagem de câncer de mama.

Como é possível observar nos dois ensaios de citotoxicidade (48 e 72 horas) os complexos de inclusão, principalmente OFLOX/HP β CD, apresentaram melhores resultados quando comparados com o OFLOX puro. Esse efeito mais acentuado provavelmente aconteceu pela capacidade que as ciclodextrinas possuem em melhorar as propriedades dos compostos incluídos em sua cavidade (TIAN *et al.*, 2020).

Um estudo da interação de OFLOX e HP β CD, mostrou que essa complexação resultou no aumento da solubilidade de OFLOX e melhor estabilidade aquosa. A solubilidade em água apresentada pelo fármaco puro no estudo foi de $300 \pm 8,1$ μ g/mL, enquanto a solubilidade do OFLOX-HP- β -CD foi 3,7 vezes maior ($1100 \pm 21,3$ μ g/mL). A formação de complexo de inclusão é de 1:1 entre OFLOX e HP β CD. Os autores também observaram que a solubilidade do OFLOX aumentou de forma linear à medida que a concentração de HP β CD era aumentada

(MISIUK; JOZEFOWICZ, 2015). Em contrapartida, Koester *et al.* (2001), investigaram a complexação de OFLOX com β CD e os complexos apresentaram um aumento da solubilidade em água de aproximadamente 2,6 vezes. Assim, a comparação do aumento das solubilidades obtidas por Misiuk e Jozefowicz (2015) e Koester *et al.* (2001), pode justificar os melhores resultados de OFLOX/HP β CD no presente trabalho.

Ding e colaboradores (2020) avaliaram a solubilidade, perfil de dissolução e biodisponibilidade dos complexos de inclusão de enrofloxacino e HP β CD. A solubilidade de enrofloxacino é de 0,23 mg/mL, enquanto a do complexo é 916 vezes maior (210 mg/mL). A dissolução em 15 minutos foi de 100% e significativamente maior que do fármaco sozinho. O complexo de enrofloxacino e HP β CD em ratos incrementou a absorção e biodisponibilidade do fármaco. Isto corrobora com a diferença dos resultados entre os complexos de inclusão e OFLOX puro encontrada no presente trabalho, em que, os complexos obtiveram melhor resultado na diminuição da viabilidade celular.

Como observado no presente trabalho, o complexo de inclusão OFLOX/HP β CD na maior concentração testada apresentou melhor resultado quando comparado com o complexo de inclusão OFLOX/ β CD. Outros trabalhos corroboram com esse resultado, mostrando que a CD semissintética tem a capacidade de melhorar ainda mais algumas propriedades da molécula hóspede em comparação com a CD natural.

Em um estudo, a oxaliplatina foi complexada com β CD, γ CD e HP β CD e analisada a citotoxicidade *in vitro* frente a células HCT116 (câncer de cólon humano) e MCF-7 (câncer de mama humano) e também as propriedades físico-químicas dos complexos. Os complexos de inclusão apresentaram atividade citotóxica quase que duas vezes maior que oxaliplatina sozinha nas células testadas. O complexo de inclusão com HP β CD apresentou melhor resultado em relação a β CD, uma vez que, possui maior solubilidade em água e desta forma, aumentou significativamente a biodisponibilidade do fármaco complexado e conseqüentemente sua atividade antitumoral (ZHANG *et al.*, 2016).

No estudo de Iacobazzi *et al.* (2020), foram analisados complexos de HP β CD com PTA34 e PTA73, moléculas potencialmente anticancerígenas, mas com baixa solubilidade. Os autores avaliaram a melhora na solubilidade e atividade antitumoral. De acordo o estudo de solubilidade, a complexação com HP β CD aumentou em 150 vezes a solubilidade em água de PTA34 e 106 vezes em PTA73. No ensaio de citotoxicidade, os complexos se mostraram ainda mais ativos que PTA34 e PTA73 puros em linhagens de câncer de pâncreas após 72 horas de tratamento.

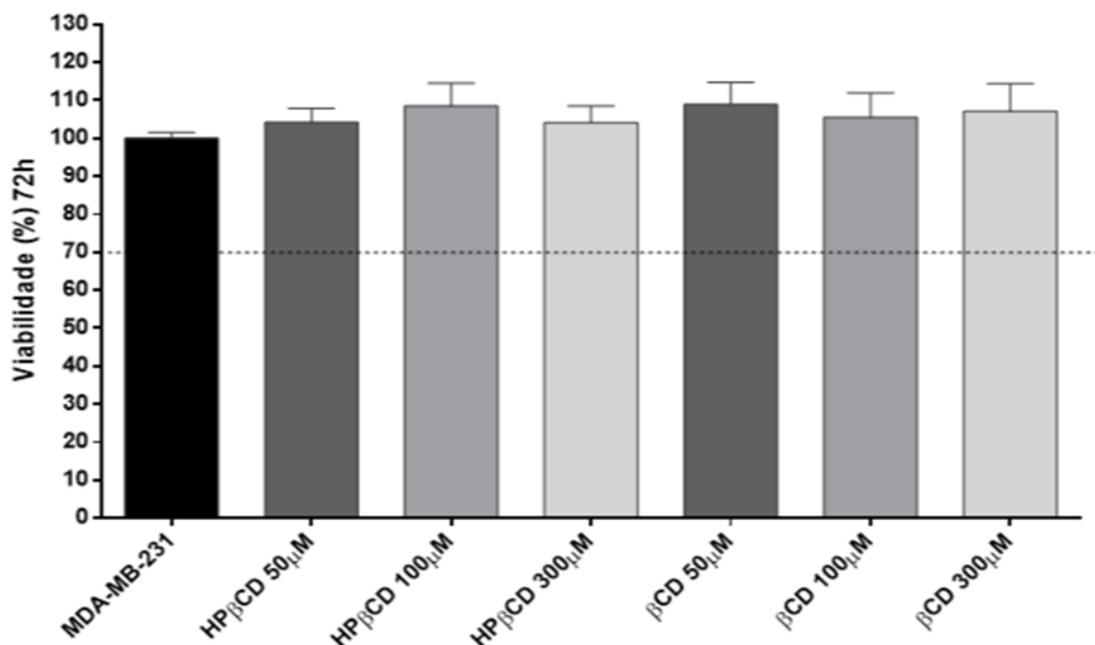
A HP β CD foi complexada com Dentatina (DEN), um fármaco antitumoral, para avaliar a solubilidade e o efeito do complexo de inclusão na citotoxicidade em células de câncer de mama (MDA-MB-231), câncer de próstata (InCAP) e adenocarcinoma gástrico humano (HDT) após 72 horas. Foi apresentado que a HP β CD aumentou a solubilidade do fármaco de forma proporcional à sua concentração. Nas concentrações mais altas do complexo DEN/HP β CD, todas as linhagens tumorais testadas foram sensíveis ao tratamento, demonstrando uma redução significativa na viabilidade dessas células, esse resultado pode estar relacionado ao incremento da solubilidade do fármaco quando complexado com HP β CD (ASHWAQ *et al.*, 2017).

Calsavara, Zanin e Moraes (2012), realizaram um estudo de complexação do enrofloxacino com β CD, γ CD e HP β CD para avaliar o aumento da solubilidade desse fármaco. O complexo formado por HP β CD e enrofloxacino obteve o melhor resultado de incremento da solubilidade, sendo esse aumento de 1258% em relação a solubilidade do fármaco não complexado. A ordem de solubilidade da maior para menor obtida foi: HP β CD, γ CD e β CD. A β CD é precursora da HP β CD, porém, as hidroxilas externas da HP β CD são mais flexíveis e com isso confere maior solubilidade ao fármaco complexado (MISIUK; JOZEFOWICZ, 2015). O OFLOX assim como o enrofloxacino é uma fluoroquinolona de segunda geração, desta forma, uma associação de comportamento similar entre os dois medicamentos pode ser sugerida.

No presente estudo, o complexo OFLOX/HP β CD na sua maior concentração apresentou melhor resultado na citotoxicidade em células MDA-MB-231, assim os resultados de Ashwaq *et al.* (2017), Calsavara, Zanin e Moraes (2012), Iacobazzi *et al.* (2020) e Zhang *et al.* (2016) quanto ao aumento de solubilidade promovida por CDs, principalmente HP β CD, pode justificar o melhor efeito do OFLOX neste trabalho.

Também foi avaliada a citotoxicidade das CDs puras nas concentrações de 300 μ M, 100 μ M e 50 μ M em células MDA-MB-231 após 72 horas de tratamento. Foi observado que as nanopartículas não apresentaram citotoxicidade e desta forma não exibem influência nos resultados de redução da viabilidade das células em foco (Figura 11).

Figura 11: Avaliação da citotoxicidade de β CD e HP β CD nas concentrações de 300 μ M, 100 μ M e 50 μ M em células MDA-MB-231 após 72 horas



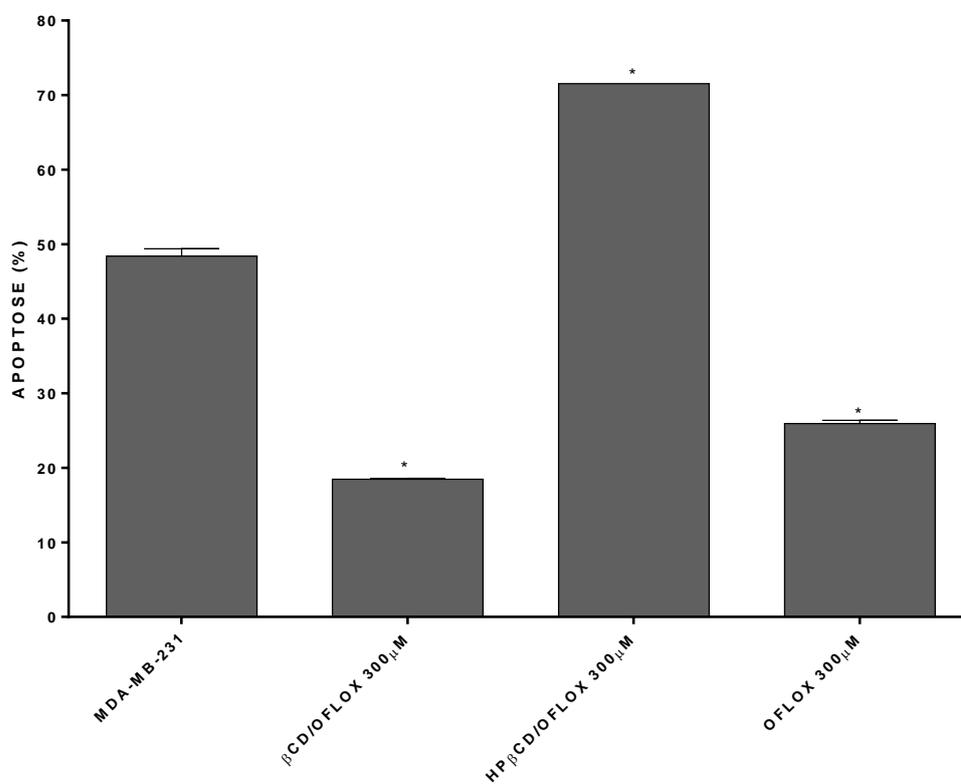
Legenda- β CD: β -ciclodextrina; HP β CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina; MDA-MB-231: linhagem câncer de mama.

5.2. AVALIAÇÃO DA APOPTOSE DAS CÉLULAS MDA-MB-231 APÓS 36 HORAS DO TRATAMENTO COM OS COMPLEXOS DE OFLOXACINO COM CICLODEXTRINAS

A figura 12 corresponde à avaliação de apoptose em 36 horas dos complexos de inclusão OFLOX/ β CD e OFLOX/HP β CD na concentração de 300 μ M em células de câncer de mama MDA-MB-231. Através dos resultados foi possível observar que o composto OFLOX/HP β CD na concentração de 300 μ M induziu significativamente a apoptose em MDA-MB-231 em cerca de 70%.

Assim como mostrado anteriormente que o provável efeito antitumoral das fluoroquinolonas está relacionado à inibição da topoisomerase II (OPPEGARD *et al.*, 2018), é possível pressupor que a morte celular por apoptose causada pelos complexos de inclusão provavelmente ocorreu por causa do efeito do OFLOX em inibir as topoisomerases, afetando o processo de replicação do DNA das células. Os resultados de outros trabalhos corroboram com o presente estudo.

Figura 12: Porcentagem de apoptose em células MDA-MB-231 tratadas com OFLOX, OFLOX/ β CD, OFLOX/HP β CD a 300 μ M em 36 horas.



Legenda: OFLOX: ofloxacino; OFLOX/ β CD: complexo de inclusão ofloxacino/ β -ciclodextrina; OFLOX/HP β CD: complexo de inclusão ofloxacino/hidroxipropil- β -ciclodextrina. * $p < 0,05$.

O mecanismo de indução de apoptose do OFLOX em condrócitos foi avaliado por Sheng *et al.* (2008). Os autores apresentaram que OFLOX ativou caspases iniciadoras (caspase-8 e -9) e em consequência a caspase-3 (caspase executora). Ainda, observaram que o OFLOX provocou a despolarização do potencial de membrana da mitocôndria e com isso, houve liberação do citocromo c. Os níveis de p53, Bax e tBid também aumentaram nas células tratadas com OFLOX. Dessa maneira, segundo os autores, a morte celular por apoptose induzida por OFLOX está relacionada à via mitocondrial.

Beberok e colaboradores (2018) apresentaram nos resultados que a ciprofloxacina induz apoptose na linhagem de MDA-MB-231. Após o tratamento das células tumorais com 0,01 e 0,1 μ M/mL de ciprofloxacina por 24 horas, a proporção de células em apoptose precoce foi de 14%, enquanto o controle apresentou 8%. Um aumento foi observado quando as células foram expostas a concentrações elevadas de ciprofloxacino (1,0 μ M/mL), em que a extensão de células apoptóticas aumentou para $86 \pm 4\%$. Isso corrobora com o achado no presente trabalho, em que, as maiores concentrações dos complexos de inclusão (OFLOX/ β CD 300 μ M e

OFLOX/HP β CD 300 μ M) apresentaram resultado maiores que 70% na avaliação de morte por apoptose.

Amaro *et al.* (2020), realizaram um estudo da complexação de OFLOX e ciclodextrinas (β CD e HP β CD) e seu efeito em células A549 (câncer de pulmão). O resultado foi bastante similar ao encontrado no presente trabalho. Foi observado que após 36 horas de tratamento, os complexos OFLOX/ β CD 300 μ M e OFLOX/HP β CD 300 μ M induziram significativamente a morte por apoptose em relação ao controle (células sem tratamento).

Bisacchi e Hale (2016) abordam que os inibidores de topoisomerase II da classe das fluoroquinolonas aparentam menor suscetibilidade de resistência tumoral através do mecanismo de efluxo do fármaco. O que corrobora com o estudo de Terashi *et al.* (2000), em que, o OFLOX foi testado em células de leucemia humana (HL60R) com superexpressão de MRP (proteína de resistência múltipla a drogas). Foi observado que o OFLOX, inibe a função da MRP de bomba de efluxo pelo acúmulo de calceína-AM (éster acetoximetílico de calceína). Em conclusão, os autores sugerem que OFLOX é substrato para MRP. Este fato pode ser explorado para avaliar ainda mais o potencial dessa classe, uma vez que, diversos tipos de câncer possuem algum mecanismo de resistência às diferentes classes de medicamentos antineoplásicos.

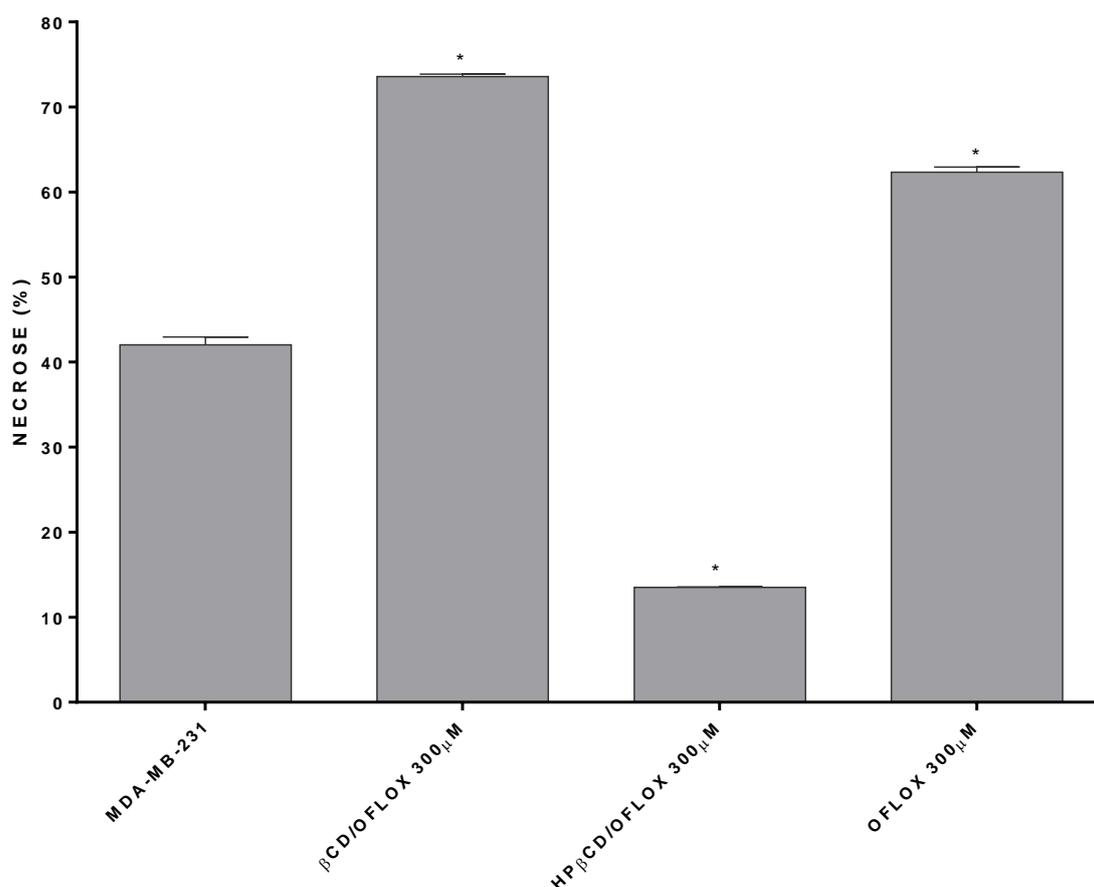
5.3. AVALIAÇÃO DA NECROSE DAS CÉLULAS MDA-MB-231 APÓS 36 HORAS DO TRATAMENTO COM OS COMPLEXOS DE OFLOXACINO COM CICLODEXTRINAS

A figura 13 corresponde à avaliação de necrose em 36 horas dos complexos de inclusão OFLOX/ β CD 300 μ M e OFLOX/HP β CD 300 μ M em células de câncer de mama triplo negativo (MDA-MB-231), é possível constatar que o composto OFLOX/ β CD na concentração de 300 μ M, induziu significativamente a necrose em MDA-MB-231 em cerca de 70%.

A necrose pode acontecer de forma concomitante, sucessiva ou independente da apoptose (ZONG; THOMPSON, 2006). Essa é um tipo de morte celular em que ocorre o extravasamento dos constituintes celulares devido ao processo de inchaço do retículo endoplasmático, mitocôndrias e mudanças na permeabilidade da membrana e consequente lise celular. Com isso, a necrose desencadeia reações inflamatórias (CHAABANE *et al.*, 2012). A necrose assim como a apoptose necessita de energia para ocorrer, porém, quando se tem um nível baixo de ATP a morte celular ocorre por necrose e em níveis altos de ATP a apoptose é a

via de morte celular. Em caso de não indução da apoptose, a necrose pode acontecer induzida por poli ADP-ribose polimerase (PARP) como auxílio. A PARP é uma enzima de reparo do DNA frente a danos e fragmentações, a ativação de PARP leva ao esgotamento do pool de NAD presente no citosol das células, essa molécula é importante para manter a capacidade de realizar a glicólise e produzir ATP. Essa enzima também pode dar início ao processo necrótico das células tumorais quando superativada, já que seu mecanismo de depleção de NAD citosólico impede a metabolização da glicose para produção de ATP (ZONG; THOMPSON, 2006). Como resultado, essa enzima aumenta os níveis de espécies reativas de oxigênio EROs pela falta de ATP nas células, com isso proteases citosólicas dependentes de cálcio são ativadas o que contribui para a permeabilização dos poros de membranas. Com a depleção de ATP a função mitocondrial fica prejudicada e desta forma as EROs são produzidas nas mitocôndrias de forma excessiva (NIKOLETOPOULOU *et al.*, 2013).

Figura 13: Porcentagem de necrose em células MCF-7 tratadas com OFLOX, OFLOX/ β CD, OFLOX/HP β CD a 300 μ M em 36 horas.



Legenda: OFLOX: ofloxacino; OFLOX/ β CD: complexo de inclusão ofloxacino/ β -ciclodextrina; OFLOX/HP β CD: complexo de inclusão ofloxacino/hidroxipropil- β -ciclodextrina. * $p < 0,05$.

As células tumorais são caracterizadas pela alta taxa de proliferação e crescimento desordenado, para suprir essa demanda são necessários altos níveis de energia. Essa energia é fornecida pela quebra aeróbica de glicose (YEE; LI, 2021). Agentes que quebram a fita de DNA ativam a enzima PARP, e com isso interrompem o suprimento energético das células tumorais. O OFLOX tem como mecanismo de ação a inibição da topoisomerase II (DNA girase) bacteriana e da topoisomerase IV ocasionando quebra da fita-dupla de DNA (ZONG; THOMPSON, 2006). Assim, o resultado obtido de necrose no presente trabalho pode estar relacionado a esse mecanismo do OFLOX, uma vez que, a indução da morte por necrose ocorre pela ativação da enzima PARP resultando em depleção de energia e produção de espécies reativas de oxigênio, o que afeta o metabolismo das células cancerígenas.

Ferrándiz, *et al.* (2016), realizaram um estudo para analisar o efeito de moxifloxacino na produção de espécies reativas de oxigênio. Segundo os autores, além do mecanismo conhecido das fluoroquinolonas, essas induzem a produção de EROs o que contribui para a morte celular mediada por esses fármacos. Foi demonstrado que nas células tratadas com a fluoroquinolona houve um acúmulo de EROs e em *S. pneumoniae*, moxifloxacino afeta a composição da membrana e induz a morte. Segundo Yee e Li (2021), o estresse oxidativo gerado por alta produção de EROs pode levar a morte celular. Os autores relatam ainda que a via de morte celular depende da taxa de EROs, sendo assim, baixa concentração de EROs induz morte por apoptose enquanto níveis altos de espécies reativas de oxigênio induzem morte celular por necrose. Com isso, se pode sugerir que OFLOX induz um acúmulo de EROs contribuindo para o estresse oxidativo e disfunção mitocondrial, o que ocasiona um colapso energético na célula e conduz a morte celular por necrose.

Portanto, os resultados de citotoxicidade celular e morte em consonância com a literatura, mostram como a complexação com ciclodextrinas pode favorecer a atividade de substâncias. Neste estudo foi utilizada uma linhagem de câncer de mama representativa do subtipo triplo negativo, um subtipo complexo e que como não expressa nenhum receptor hormonal não responde aos tratamentos disponíveis, além da quimioterapia. Desta forma, a intervenção por complexos de inclusão é promissora não apenas em câncer de mama, mas também em outros tipos de câncer. Amaro e colaboradores (2020) realizaram um estudo semelhante com células de câncer de pulmão, refletindo em resultados igualmente promissores dos complexos de inclusão.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados dos testes *in vitro*, é possível afirmar que o OFLOX complexado com β CD e HP β CD, apresentou potencial citotóxico ao diminuir a viabilidade celular (abaixo de 70%) e indução de morte em células MDA-MB-231 de maneira dose dependente em relação ao fármaco puro. Esses resultados são associados à melhora proporcionada pelas ciclodextrinas de propriedades físico-químicas de fármacos, como a solubilidade. Vale ressaltar que a linhagem MDA-MB-231 representa o câncer de mama triplo-negativo, ou seja, não expressa nenhum receptor hormonal, é mais agressiva e menos sensível aos tratamentos. Atualmente não existe terapia direcionada para o câncer de mama triplo-negativo e estudos de compostos que exibem ação de imunomodulação, como os do presente trabalho, são promissores para realização de estudos *in vivo*. Assim, são necessários mais análises e testes clínicos para que o efeito antitumoral do OFLOX complexado com ciclodextrinas seja comprovado.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-AAL, Mohamed A. A. *et al.* Towards anticancer fluoroquinolones: a review article. **Archiv Der Pharmazie**, [S.L.], v. 352, n. 7, p. 1800376, 19 jun. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ardp.201800376>.
- AHADI, Hamideh; EMAMI, Saeed. Modification of 7-piperazinylquinolone antibacterials to promising anticancer lead compounds: synthesis and in vitro studies. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 187, p. 111970, fev. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111970>.
- AHMADIAN, Somaieh *et al.* Cellular Toxicity of Nanogenomedicine in MCF-7 Cell Line: mtt assay. **Journal Of Visualized Experiments**, [S.L.], n. 26, p. 1, 3 abr. 2009. MyJove Corporation. <http://dx.doi.org/10.3791/1191>.
- AKEKAWATCHAI, Chareeporn *et al.* Transactivation of CXCR4 by the Insulin-like Growth Factor-1 Receptor (IGF-1R) in Human MDA-MB-231 Breast Cancer Epithelial Cells. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 280, n. 48, p. 39701-39708, dez. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m509829200>.
- AKRAM, Muhammad *et al.* Awareness and current knowledge of breast cancer. **Biological Research**, [S.L.], v. 50, n. 1, 2 out. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s40659-017-0140-9>.
- AL-OMAR, Mohammed A. Ofloxacin. In: Profiles of drug substances, excipients and related methodology, **Academic Press**, 2009. v 34, p. 265-298. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s1871-5125\(09\)34006-6](http://dx.doi.org/10.1016/s1871-5125(09)34006-6).
- AMARO, B. *et al.* Multifunctionality of β CD/Ofloxacin and HP β CD/Ofloxacin Complexes: Improvement of the Antimicrobial Activity and Apoptosis Induction on Lung Adenocarcinoma A549 Cells. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2020.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. About Breast Cancer. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about.html>>. Acesso em: 08/10/2022.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Breast Cancer Early Detection and Diagnosis. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/screening-tests-and-early-detection.html>>. Acesso em: 08/10/2022.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Treating Breast Cancer. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment.html>>. Acesso em: 08/10/2022.
- ARMANDO, Romina; GOMEZ, Diego Mengual; GOMEZ, Daniel. New drugs are not enough-drug repositioning in oncology: an update. **International Journal Of Oncology**, [S.L.], 20 jan. 2020. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2020.4966>.
- ASHWAQ, Al-Abboodi Shakir *et al.* Characterization, drug release profile and cytotoxicity of Dentatin-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin complex. **Journal Of Inclusion Phenomena And**

Macrocyclic Chemistry, [S.L.], v. 87, n. 1-2, p. 167-178, 5 jan. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10847-016-0688-y>.

ASIF, M. A review on anticancer and antimicrobial activity of tetrafluoroquinolone compounds. **Annals of Medicinal Chemistry and Research**, v. 1, n. 1, p. 1003-1013, 2014.

BANCO DE CÉLULAS DO RIO DE JANEIRO. Duque de Caxias: BCRJ, c2022. Disponível em: <<https://bcRJ.org.br/celula/Mdamb231-Breast-Adenocarcinoma>>. Acesso em: 28 Out 2022.

BARROS, A. C. S. D *et al.* Diagnóstico e tratamento do câncer de mama. **Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina**, [S.L.], p. 1-13, 2001.

BEBEROK, Artur *et al.* Ciprofloxacin triggers the apoptosis of human triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cells via the p53/Bax/Bcl-2 signaling pathway. **International Journal Of Oncology**, [S.L.], 8 mar. 2018. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2018.4310>

BERRIDGE, Michael V.; HERST, Patries M.; TAN, An S.. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. **Biotechnology Annual Review**, [S.L.], p. 127-152, 2005. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s1387-2656\(05\)11004-7](http://dx.doi.org/10.1016/s1387-2656(05)11004-7).

BISACCHI, Gregory; HALE, Michael. A “Double-Edged” Scaffold: antitumor power within the antibacterial quinolone. **Current Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 23, n. 6, p. 520-577, 3 mar. 2016. Bentham Science Publishers Ltd. <http://dx.doi.org/10.2174/0929867323666151223095839>

BRAGA, Susana Santos. Cyclodextrins: emerging medicines of the new millennium. **Biomolecules**, [S.L.], v. 9, n. 12, p. 801, 28 nov. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biom9120801>.

BRASIL. “Tratamento.” Instituto Nacional de Câncer - INCA, 2022. Disponível em: www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/gestor-e-profissional-de-saude/controlado-cancer-de-mama/acoes/tratamento. Acesso em 10/10/2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas em Oncologia**/Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde – Brasília : Ministério da Saúde, 2014.

BRAY, Freddie *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**, [S.L.], v. 68, n. 6, p. 394-424, 12 set. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21492>.

BURANAAMNUAY, Kakanang. The MTT assay application to measure the viability of spermatozoa: a variety of the assay protocols. **Open Veterinary Journal**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 251, 2021. ScopeMed. <http://dx.doi.org/10.5455/ovj.2021.v11.i2.9>.

CALSAVARA, Luiza P. V.; ZANIN, Gisella M.; MORAES, Flavio F. de. Enrofloxacin inclusion complexes with cyclodextrins. **Journal Of Inclusion Phenomena And**

Macrocyclic Chemistry, [S.L.], v. 73, n. 1-4, p. 219-224, 3 nov. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10847-011-0045-0>.

CARNEIRO, Simone *et al.* Cyclodextrin–Drug Inclusion Complexes: in vivo and in vitro approaches. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 20, n. 3, p. 642, 2 fev. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20030642>.

CARVALHO, Suzana Gonçalves. **Complexos de inclusão furazolidona:ciclodextrinas visando o desenvolvimento de medicamentos para o tratamento da leishmaniose cutânea canina: caracterização física e avaliação biológica *in vitro***. 2019. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2019.

CHA, Y *et al.* Drug repurposing from the perspective of pharmaceutical companies. **British Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 175, n. 2, p. 168-180, 18 maio 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/bph.13798>

CHAABANE, Wiem *et al.* Autophagy, Apoptosis, Mitoptosis and Necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer. **Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis**, [S.L.], v. 61, n. 1, p. 43-58, 11 dez. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00005-012-0205-y>.

CHIERENTIN, Lucas *et al.* Influence of β -cyclodextrin on the Properties of Norfloxacin Form A. **Aaps Pharmscitech**, [S.L.], v. 16, n. 3, p. 683-691, 16 dez. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1208/s12249-014-0259-8>.

COELHO, A. S. *et al.* Predisposição hereditária aocâncer de mama e sua relação com os genes BRCA1 e BRCA2: revisão da literatura. **RBAC**. v. 50, n. 1. 2018.

COISNE, Caroline *et al.* Cyclodextrins as Emerging Therapeutic Tools in the Treatment of Cholesterol-Associated Vascular and Neurodegenerative Diseases. **Molecules**, [S.L.] vol. 21,12 1748. 20 Dec. 2016, doi:10.3390/molecules21121748.

CUNHA-FILHO, M. S. S.; SÁ-BARRETO, L. C. L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2007.

Dai X, Li T, Bai Z, *et al.* Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. **Am J Cancer Res**, v. 5, n. 10, p. 2929-2943, 2015.

DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 9, p. 1033-1046, 2004.

DENIZOT, François; LANG, Rita. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. **Journal Of Immunological Methods**, [S.L.], v. 89, n. 2, p. 271-277, maio 1986. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90368-6](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(86)90368-6).

DIAZ-MORALLI, Santiago *et al.* Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, [S.L.], v. 138, n. 2, p. 255-271, maio 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.01.011>.

DILLY, Suzanne J.; MORRIS, George S.. Pimping up Drugs Recovered, Superannuated and Under Exploited Drugs - An Introduction to the Basics of Drug Reprofilng. **Current Drug Discovery Technologies**, [S.L.], v. 14, n. 2, p. 121-126, 16 abr. 2017. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1570163814666170117120005>.

DING, Yili *et al.* Formation of inclusion complex of enrofloxacin with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Drug Delivery**, [S.L.], v. 27, n. 1, p. 334-343, 1 jan. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10717544.2020.1724210>.

DO, Ha Thi Thu; CHO, Jungsook. Involvement of the ERK/HIF-1 α /EMT Pathway in XCL1-Induced Migration of MDA-MB-231 and SK-BR-3 Breast Cancer Cells. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 89, 23 dez. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22010089>.

DOMAGALA, J. M. Structure-activity and structure-side-effect relationships for the quinolone antibacterials. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 33, n. 5, p. 685-706, 1994.

ELMORE, Susan. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, [S.L.], v. 35, n. 4, p. 495-516, jun. 2007. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1080/01926230701320337>.

EL-ZAHRY, Marwa R.; LENDL, Bernhard. Structure elucidation and degradation kinetic study of Ofloxacin using surface enhanced Raman spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [S.L.], v. 193, p. 63-70, mar. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2017.12.007>.

ESPARZA-LÓPEZ, José *et al.* Breast Cancer Intra-Tumor Heterogeneity: one tumor, different entities. **Revista de Investigacion Clinica**, [S.L.], v. 69, n. 2, p. 1, 24 abr. 2017. Publicidad Permanyer, SLU.

ESTEVES, Valéria Sant'anna Dantas. **REQUISITOS DE BIOISENÇÃO COM BASE NO SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA NO BRASIL E NO MUNDO**. 2019. 21 v. Tese (Doutorado) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2020.

FAHMY, Sherif Ashraf *et al.* Enhanced Antioxidant, Antiviral, and Anticancer Activities of the Extract of Fermented Egyptian Rice Bran Complexed with Hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Acs Omega**, [S.L.], v. 7, n. 23, p. 19545-19554, 1 jun. 2022. **American Chemical Society (ACS)**. <http://dx.doi.org/10.1021/acsomega.2c01281>.

FERLAY, J. *et al.* Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: globocan sources and methods. **International Journal Of Cancer**, [S.L.], v. 144, n. 8, p. 1941-1953, 6 dez. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.31937>.

FERRÁNDIZ, M. J. *et al.* Reactive Oxygen Species Contribute to the Bactericidal Effects of the Fluoroquinolone Moxifloxacin in *Streptococcus pneumoniae*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 60, n. 1, p. 409-417, jan. 2016. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.02299-15>.

FOTAKIS, George; TIMBRELL, John A.. In vitro cytotoxicity assays: comparison of ldh, neutral red, mtt and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, [S.L.], v. 160, n. 2, p. 171-177, jan. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.07.001>

GANOT, Nitzan *et al.* Anticancer Metal Complexes: synthesis and cytotoxicity evaluation by the mtt assay. **Journal Of Visualized Experiments**, [S.L.], n. 81, p. 1, 10 nov. 2013. MyJove Corporation. <http://dx.doi.org/10.3791/50767>.

GAO, Su-Wei; LIU, Feng. Novel insights into cell cycle regulation of cell fate determination. **Journal Of Zhejiang University-Science B**, [S.L.], v. 20, n. 6, p. 467-475, 17 maio 2019. Zhejiang University Press. <http://dx.doi.org/10.1631/jzus.b1900197>.

GENNARO, Alfonso R.. Remington's: **Pharmaceutical Sciences**. 18. ed. Pennsylvania: Mack Printing Company, p. 1540, 1990.

GHASEMI, Mahshid *et al.* The MTT Assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 23, p. 12827, 26 nov. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms222312827>.

GOUVEA, Ligiane Rios. **Complexos Metálicos de Fluorquinolonas: Síntese, Atividade Biológica e Estudos do Mecanismo de Ação**. 2013. 128 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

GRAHAM DB, Tripp J. Ofloxacin. [Updated 2020 Jul 6]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan.

GRELA, Ewa; KOZIOWSKA, Joanna; GRABOWIECKA, Agnieszka. Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. **Acta Histochemica**, [S.L.], v. 120, n. 4, p. 303-311, maio 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2018.03.007>.

HEUVEL, Sander van Den. Cell-cycle regulation. **Wormbook**, [S.L.], p. 2, 2005. WormBook. <http://dx.doi.org/10.1895/wormbook.1.28.1>.

HOLLIDAY, Deborah L; SPEIRS, Valerie. Choosing the right cell line for breast cancer research. **Breast Cancer Research**, [S.L.], ago. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/bcr2889>.

HUANG, Haoyang *et al.* Progress in Redirecting Antiparasitic Drugs for Cancer Treatment. **Drug Design, Development And Therapy**, [S.L.], v. 15, p. 2747-2767, jun. 2021. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/dddt.s308973>.

IACOBAZZI, Rosa Maria *et al.* Hydroxy-Propil- β -Cyclodextrin Inclusion Complexes of two Biphenylnicotinamide Derivatives: formulation and anti-proliferative activity evaluation in pancreatic cancer cell models. **International journal of molecular sciences**, [S.L.], v. 21, n. 18, p. 6545, 7 set. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21186545>.

IDOWU, Temilolu; SCHWEIZER, Frank. Ubiquitous Nature of Fluoroquinolones: the oscillation between antibacterial and anticancer activities. **Antibiotics**, [S.L.], v. 6, n. 4, p. 26-26, 7 nov. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics6040026>.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: INCA, 2019.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity. Geneva, 2009.

JAIN, Vishakha; GUPTA, Op. Repositioning of drugs: hydroxychloroquine. **Journal Of Mahatma Gandhi Institute Of Medical Sciences**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 1, 2015. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/0971-9903.151715>.

JANSOOK, Phatsawee *et al.* Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. **International Journal Of Pharmaceutics**, [S.L.], v. 535, n. 1-2, p. 272-284, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.11.018>.

JÄRÅS, Marcus; EBERT, Benjamin L.. Power Cut: inhibiting mitochondrial translation to target leukemia. **Cancer Cell**, [S.L.], v. 20, n. 5, p. 555-556, nov. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2011.10.028>.

KAMAT, Ashish M; DEHAVEN, Jean I; LAMM, Donald L. Quinolone antibiotics: a potential adjunct to intravesical chemotherapy for bladder cancer. **Urology**, [S.L.], v. 54, n. 1, p. 56-61, jul. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0090-4295\(99\)00064-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0090-4295(99)00064-3).

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

KLOSKOWSKI, Tomasz *et al.* Ciprofloxacin and Levofloxacin as Potential Drugs in Genitourinary Cancer Treatment—The Effect of Dose–Response on 2D and 3D Cell Cultures. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 21, p. 11970, 4 nov. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms222111970>.

KOESTER, L. S. *et al.* Ofloxacin/ β -Cyclodextrin Complexation. **Drug Development And Industrial Pharmacy**, [S.L.], v. 27, n. 6, p. 533-540, jan. 2001. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1081/ddc-100105178>.

KURKOV, Sergey V.; LOFTSSON, Thorsteinn. Cyclodextrins. **International Journal Of Pharmaceutics**, [S.L.], v. 453, n. 1, p. 167-180, ago. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.055>.

LEAL-ORTA, Elizabeth *et al.* Extracellular vesicles from MDA-MB-231 breast cancer cells stimulated with insulin-like growth factor 1 mediate an epithelial–mesenchymal transition process in MCF10A mammary epithelial cells. **Journal Of Cell Communication And Signaling**, [S.L.], p. 1, 26 jul. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12079-021-00638-y>.

LEE, E. Y. H. P.; MULLER, W. J.. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. **Cold Spring Harbor Perspectives In Biology**, [S.L.], v. 2, n. 10, p. 2, 18 ago. 2010. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a003236>.

LEE, Joyce H.; BERGER, James M.. Cell Cycle-Dependent Control and Roles of DNA Topoisomerase II. **Genes**, [S.L.], v. 10, n. 11, p. 859, 30 out. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/genes10110859>.

LI, Yuanfang *et al.* Enhanced antibacterial activity of levofloxacin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex: in vitro and in vivo evaluation. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [S.L.], v. 215, p. 112514, jul. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112514>.

LOFTSSON, Thorsteinn. Cyclodextrins and the Biopharmaceutics Classification System of Drugs. **Journal Of Inclusion Phenomena And Macrocyclic Chemistry**, [S.L.], v. 44, n. 1/4, p. 63-67, 2002. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1023088423667>

MCKINNON, Katherine M.. Flow Cytometry: an overview. **Current Protocols In Immunology**, [S.L.], v. 120, n. 1, p. 4, jan. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cpim.40>.

MENS, Michelle M. J.; GHANBARI, Mohsen. Cell Cycle Regulation of Stem Cells by MicroRNAs. **Stem Cell Reviews And Reports**, [S.L.], v. 14, n. 3, p. 309-322, 14 mar. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12015-018-9808-y>.

MISIUK, W.; JOZEFOWICZ, M. Study on a host–guest interaction of hydroxypropyl- β -cyclodextrin with ofloxacin. **Journal of Molecular Liquids**, v. 202, n. 2, p. 101-106, 2015.

MOMENI, Hamid Reza; ABNOSI, Mohammad Hussein; ESKANDARI, Najmeh. Quantitative evaluation of human sperm viability using MTT assay: a laboratory study. **International Journal Of Reproductive Biomedicine (Ijrm)**, [S.L.], p. 1, 22 nov. 2020. Knowledge E. <http://dx.doi.org/10.18502/ijrm.v13i11.7966>.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1, p. 55-63, 1983

MUANKAEW, Chutimon; LOFTSSON, Thorsteinn. Cyclodextrin-Based Formulations: a non-invasive platform for targeted drug delivery. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, [S.L.], v. 122, n. 1, p. 46-55, 20 nov. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/bcpt.12917>.

NGA, N.T.H. *et al.* Optimization and application of MTT assay in determining density of suspension cells. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 610, p. 113937, dez. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2020.113937>.

NICHOLSON, Donald W.. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. **Nature**, [S.L.], v. 407, n. 6805, p. 810-816, out. 2000. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/35037747>

NIKOLETOPOULOU, Vassiliki *et al.* Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Molecular Cell Research**, [S.L.], v. 1833, n. 12, p. 3448-3459, dez. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.001>.

OLIVEIRA, Rita; SANTOS, Delfim; COELHO, Pedro - Ciclodextrinas: formação de complexos e sua aplicação farmacêutica. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde**. Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa, 2009.

ONRUST, Susan V.; LAMB, Harriet M.; BALFOUR, Julia A. Barman. Ofloxacin. **Drugs**, [S.L.], v. 56, n. 5, p. 895-928, 1998. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.2165/00003495-199856050-00015>.

OPPEGARD, Lisa M. *et al.* Novel N-1 substituted fluoroquinolones inhibit human topoisomerase I activity and exhibit anti-proliferative activity. **Investigational New Drugs**, [S.L.], v. 37, n. 2, p. 378-383, 10 set. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10637-018-0666-x>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Breast câncer, 2021. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>>. Acesso em: 08/10/2022.

PARIS, J.-M.. 1.3 Chirality in Antibacterial Agents. **Comprehensive Chirality**, [S.L.], p. 30-53, 2012. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-08-095167-6.00109-9>.

PARK, In Hae *et al.* Tumor-derived IL-18 induces PD-1 expression on immunosuppressive NK cells in triple-negative breast cancer. **Oncotarget**, [S.L.], v. 8, n. 20, p. 32722-32730, 16 mar. 2017. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.16281>.

PASCUA-MAESTRO, Raquel *et al.* The MTT-formazan assay: complementary technical approaches and in vivo validation in drosophila larvae. **Acta Histochemica**, [S.L.], v. 120, n. 3, p. 179-186, abr. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2018.01.006>.

PILLAIYAR, Thanigaimalai *et al.* A medicinal chemistry perspective of drug repositioning: recent advances and challenges in drug discovery. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 195, p. 112275, jun. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112275>.

PISTRITTO, Giuseppa *et al.* Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. **Aging**, [S.L.], v. 8, n. 4, p. 603-619, 27 mar. 2016. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/aging.100934>.

POLYAK, Kornelia. Breast cancer: origins and evolution. **Journal Of Clinical Investigation**, [S.L.], v. 117, n. 11, p. 3155-3163, 1 nov. 2007. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci33295>.

POLYAK, Kornelia. Heterogeneity in breast cancer. **Journal Of Clinical Investigation**, [S.L.], v. 121, n. 10, p. 3786-3788, 3 out. 2011. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci60534>.

PUSHPAKOM, Sudeep *et al.* Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 41-58, 12 out. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd.2018.168>.

REN, Xiuyun *et al.* Preparation, Characterization, and Properties of Inclusion Complexes of Balofloxacin with Cyclodextrins. **Aaps Pharmscitech**, [S.L.], v. 20, n. 7, p. 2, 8 ago. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1208/s12249-019-1425-9>.

SAOKHAM, Phennapha *et al.* Solubility of Cyclodextrins and Drug/Cyclodextrin Complexes. **Molecules**, [S.L.], v. 23, n. 5, p. 1161, 11 maio 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23051161>.

SARAIVA, Diana P. *et al.* Establishment of a 3D Co-culture With MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Line and Patient-Derived Immune Cells for Application in the Development of Immunotherapies. **Frontiers In Oncology**, [S.L.], v. 10, p. 9, 27 ago. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2020.01543>.

SARTORI, Ana Clara N.; BASSO, Caroline S. Câncer de mama: uma breve revisão de literatura. **Perspectiva**, Erechim, v. 43, n. 161, p. 07-13, mar. 2019.

SCHOLAR, Eric. Ofloxacin. Xpharm: The Comprehensive Pharmacology Reference, [S.L.], p. 1-8, 2007. **Elsevier**. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-008055232-3.62318-9>.

SEAY, Thomas M. *et al.* Inhibition of Human Transitional Cell Carcinoma in Vitro Proliferation by Fluoroquinolone Antibiotics. **Journal Of Urology**, [S.L.], v. 155, n. 2, p. 757-762, fev. 1996. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-5347\(01\)66516-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-5347(01)66516-9).

SHENG, Z. *et al.* Ofloxacin induces apoptosis in microencapsulated juvenile rabbit chondrocytes by caspase-8-dependent mitochondrial pathway. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 226, n. 2, p. 119-127, 2008.

SONG, Meijun *et al.* Antibiotic drug levofloxacin inhibits proliferation and induces apoptosis of lung cancer cells through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative damage. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 84, n. 1, p. 1137-1143, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.10.034>.

SUBIK, Kristina *et al.* The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. **Breast Cancer: Basic and Clinical Research**, [S.L.], v. 4, p. 117822341000400, jan. 2010. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/117822341000400004>.

SUN, Yi-Sheng *et al.* Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. **International Journal Of Biological Sciences**, [S.L.], v. 13, n. 11, p. 1387-1397, 2017. Ivyspring International Publisher. <http://dx.doi.org/10.7150/ijbs.21635>.

STOCKERT, Juan C. *et al.* MTT assay for cell viability: intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta Histochemica**, [S.L.], v. 114, n. 8, p. 785-796, dez. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2012.01.006>.

SWEETMAN, Sean C.. Martindale: The Complete Drug Reference. 33 ed. The Pharmaceutical Press, Chicago, p. 232, 2002.

SZEJTLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5, p. 1743-1753, 1998.

TAYLOR, Rebecca C.; CULLEN, Sean P.; MARTIN, Seamus J.. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S.L.], v. 9, n. 3, p. 231-241, mar. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2312>.

TERASHI, Kenji *et al.* Interactions of Ofloxacin and Erythromycin with the Multidrug Resistance Protein (MRP) in MRP-Overexpressing Human Leukemia Cells. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 44, n. 6, p. 1697-1700, jun. 2000. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.44.6.1697-1700.2000>.

THU, Kl *et al.* Targeting the cell cycle in breast cancer: towards the next phase. **Cell Cycle**, [S.L.], v. 17, n. 15, p. 1871-1885, 3 ago. 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/15384101.2018.1502567>

TIAN, Bingren *et al.* The application and prospects of cyclodextrin inclusion complexes and polymers in the food industry: a review. **Polymer International**, [S.L.], v. 69, n. 7, p. 597-603, 10 mar. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/pi.5992>.

VAN DEN BERG, B M. Microscopic analysis of MTT stained boar sperm cells. **Open veterinary journal**, vol. 5, n. 1, p. 58-63, 2015.

VAN TONDER, Alet; JOUBERT, Annie M; CROMARTY, A Duncan. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. **Bmc Research Notes**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 2, 20 fev. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13104-015-1000-8>.

VAZ, Patrícia Alexandra Amaro Martins. **Estudos de síntese e transformação de novos derivados de 4-quinolona**. 2010. 153 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Departamento de Química, Universidade de Aveiro, [S.L], 2010.

VERMEULEN, Katrien; VAN BOCKSTAELE, Dirk R.; BERNEMAN, Zwi N.. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, [S.L.], v. 36, n. 3, p. 131-149, jun. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x>.

VENTURINI, Cristina de Garcia *et al.* Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, [S.L.], v. 31, n. 2, p. 360-368, 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422008000200032>.

WANG, Yifan *et al.* Twist-mediated PAR1 induction is required for breast cancer progression and metastasis by inhibiting Hippo pathway. **Cell Death & Disease**, [S.L.], v. 11, n. 7, p. 500-520, jul. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-020-2725-4>.

WANG, Zhixiang. Regulation of Cell Cycle Progression by Growth Factor-Induced Cell Signaling. **Cells**, [S.L.], v. 10, n. 12, p. 3327, 26 nov. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells10123327>.

WEIGELT, Britta; GEYER, Felipe C.; REIS-FILHO, Jorge S.. Histological types of breast cancer: how special are they?. **Molecular Oncology**, [S.L.], v. 4, n. 3, p. 192-208, 18 abr. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molonc.2010.04.004>.

WELSH, JoEllen, Chapter 40 - **Animal models for studying prevention and treatment of breast cancer**. Editor(s): P. Michael Conn. In: *Animal models for the study of human disease*. Academic Press, 2013. p. 997-1018.

WITTKOWSKI, Knut M. *et al.* Complex polymorphisms in endocytosis genes suggest alpha-cyclodextrin as a treatment for breast cancer. **Plos One**, [S.L.], v. 13, n. 7, 2018. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0199012>.

WLODKOWIC, Donald *et al.* Apoptosis and Beyond: cytometry in studies of programmed cell death. **Methods In Cell Biology**, [S.L.], p. 55-98, 2011. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-385493-3.00004-8>

WONG, Rebecca Sy. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **Journal Of Experimental & Clinical Cancer Research**, [S.L.], v. 30, n. 1, p. 17, 26 set. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-9966-30-87>.

XUE, Hanqing *et al.* Review of Drug Repositioning Approaches and Resources. **International Journal Of Biological Sciences**, [S.L.], v. 14, n. 10, p. 1232-1244, 2018. Ivyspring International Publisher. <http://dx.doi.org/10.7150/ijbs.24612>.

YADAV, Vikas *et al.* Moxifloxacin and ciprofloxacin induces S-phase arrest and augments apoptotic effects of cisplatin in human pancreatic cancer cells via ERK activation. **Bmc Cancer**, [S.L.], v. 15, n. 1, 11 ago. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-015-1560-y>.

YADAV, Vikas; TALWAR, Puneet. Repositioning of fluoroquinolones from antibiotic to anti-cancer agents: an underestimated truth. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 111, p. 934-946, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.119>.

YAMAKUCHI, Munekazu *et al.* New quinolones, ofloxacin and levofloxacin, inhibit telomerase activity in transitional cell carcinoma cell lines. **Cancer Letters**, [S.L.], v. 119, n. 2, p. 213-219, nov. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0304-3835\(97\)00269-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0304-3835(97)00269-3).

YEE, Patricia P.; LI, Wei. Tumor necrosis: a synergistic consequence of metabolic stress and inflammation. **Bioessays**, [S.L.], v. 43, n. 7, p. 2100029, 16 maio 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bies.202100029>.

YU, Min; LI, Ruishu; ZHANG, Juan. Repositioning of antibiotic levofloxacin as a mitochondrial biogenesis inhibitor to target breast cancer. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [S.L.], v. 471, n. 4, p. 639-645, mar. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.02.072>.

YUE, Wen *et al.* Repurposing of Metformin and Aspirin by Targeting AMPK- mTOR and Inflammation for Pancreatic Cancer Prevention and Treatment. **American Association for Cancer Research**, 2014, p. 388-97.

YUK, J H *et al.* Bioavailability and pharmacokinetics of ofloxacin in healthy volunteers. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 35, n. 2, p. 384-386, fev. 1991. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.35.2.384>.

ZAFAR, Aameduzzafar *et al.* Formulation of Genistein-HP β Cyclodextrin-Poloxamer 188 Ternary Inclusion Complex: solubility to cytotoxicity assessment. **Pharmaceutics**, [S.L.], v. 13, n. 12, p. 1997, 24 nov. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics13121997>.

ZHANG, Da *et al.* Preparation, characterisation and antitumour activity of β -, γ - and HP- β -cyclodextrin inclusion complexes of oxaliplatin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [S.L.], v. 152, p. 501-508, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2015.07.088>.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P.. Morphological Features of Cell Death. **Physiology**, [S.L.], v. 19, n. 3, p. 124-128, jun. 2004. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/nips.01519.2004>.

ZONG, Wei-Xing; THOMPSON, Craig B.. Necrotic death as a cell fate. **Genes & Development**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 1-15, 1 jan. 2006. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1376506>.