



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS**



**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTICÂNCER DE COMPOSTOS SINTÉTICOS
DERIVADOS DO NÚCLEO TETRAIDROPIRANO**

BRUNA BRAGA DANTAS

JOÃO PESSOA-PB

2014

BRUNA BRAGA DANTAS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTICÂNCER DE COMPOSTOS SINTÉTICOS
DERIVADOS DO NÚCLEO TETRAIDROPIRANO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título **Mestre** em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: **Farmacologia.**

Orientador:

Prof. Dr^o. Demetrius Antonio Machado de Araújo

JOÃO PESSOA

2014

BRUNA BRAGA DANTAS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTICÂNCER DE COMPOSTOS SINTÉTICOS
DERIVADOS DO NÚCLEO TETRAIDROPIRANO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: Farmacologia.

A citação de qualquer trecho deste trabalho é permitida, desde que seja feita com as normas da ética científica.

Avaliada em 24 de fevereiro de 2014.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Demetrius Antonio Machado de Araújo
Universidade Federal da Paraíba
(Orientador)

Prof^ª. Dr^ª. Sandra Rodrigues Mascarenhas
Universidade Federal da Paraíba
(Membro interno)

Prof^ª. Dr^ª. Gardenia Carmem Gadelha Militão
Universidade Federal de Pernambuco
(Membro externo)

Agradecimentos

A Deus que me deu vida e coragem pra buscar meus sonhos! Pela força e presença em todos os instantes de desânimo!

Aos meus pais, Rita Braga e Paulo Afonso, que fizeram de mim o ser que hoje sou e sempre me apoiam e confiam em minhas vontades. Obrigada!

Aos meus irmãos, Vinicius e Diane, que apesar da distância sempre me ouvem e tentam me compreender, SAUDADE que nunca passa!

Aos amigos presentes, aqueles que acompanham meus desvaneios, misturam-se na bagunça de minha rotina e fazem meus dias mais especiais. Obrigada: Karen Brito, Paulo Victor, Neuma Vanya, Thawana Moura, Jocicleia, Jancerlan Rocha, Jocelmo, Gedson, Kennyo e Andrezza Miná.

Aos amigos mais distantes, que mesmo ausente, sempre se fizeram presente em minha caminhada. Obrigada: Caio César, Francinaide, Danila Santana, Carlinhos, Edson e Tállita.

Aos colegas e grandes amigos do PPGPNSB, que muito acrescentam aos meus dias. Em especial a: Flávia Danielle, Lílian, Lucas, Itamar e Jésser.

Ao grupo de biotecnologia celular e molecular que é uma parte da minha família desde 2007, e que muito contribuíram com esse trabalho e com a consolidação dos meus aprendizados. Obrigada: Aletheia Lacerda, Aliny Vasconcellos, Katyana, Teresa Cristina, Itácio Padilha, Éneas, Hervé Couliat. Muito obrigada!

Em especial, obrigada a todos que fazem parte do grupo de citotoxicidade com quem compartilho a rotina diária.

A Gláucia Faheina Verissimo Martins, que pertence ao grupo à cima, mas que tem um lugar mais que especial em minha história,

exemplo de pesquisadora e de pessoa, obrigada por compartilhar comigo um pouco da tua rotina, aprendo muito contigo!!

*Ao meu orientador, com quem tive o privilégio de conviver e aprender desde o primeiro dia de graduação, e hoje é mais que um orientador de conhecimento, e sim um companheiro de conquistas.
Obrigada!*

A todos os sábios professores que tive a graça de ter em minha jornada e sem dúvida me ajudaram na construção do pouco que hoje sei.

Aos professores Dr. Adolfo Horn e as professoras Dr^a Sandra Mascarenhas, Dr^a Marcia Piuvezam e Dr^a Gardênia Militão que aceitaram avaliar o meu trabalho e com certeza irão contribuir com o meu amadurecimento científico.

Aos funcionários do PPgPNSB, em especial a Caroline Mangueira e a Mônica, que sempre nos recebe com um sorriso no rosto.

Ao CNPq e UFPB pelo apoio financeiro

Muito obrigada!

*Tudo é loucura ou sonho no começo.
Nada do que o homem fez no mundo teve
início de outra maneira,
mas tantos sonhos se realizaram que
não temos o direito de duvidar de nenhum.*

Monteiro Lobato

ÍNDICE

1. Introdução	17
1.1. Câncer	17
1.2. Química medicinal	21
1.2.1. Derivados do núcleo tetraidropirano	22
1.3. Citotoxicidade	23
1.4. Morte celular	24
2. Objetivos	32
2.1. Objetivo geral	32
2.2. Objetivos específicos	32
3. Metodologia	34
3.1. Materiais utilizados	34
3.2. Equipamentos utilizados	34
3.3. Soluções	35
3.4. Estudos da atividade citotóxica <i>in vitro</i>	37
3.4.1. Moléculas estudadas	37
3.4.2. Modelos biológicos experimentais	42
3.4.2.1. Cultivo celular	42
3.4.2.2. Obtenção de células mononucleares de sangue humano	46
3.4.3. Viabilidade celular	48
3.4.3.1. Redução do MTT (MTT)	48
3.4.3.2. Ensaio de capturação do vermelho neutro (CVN)	49
3.4.4. Estudo do mecanismo de morte celular	50
3.4.4.1. Análise do conteúdo de DNA e distribuição nas fases do ciclo celular	50
3.4.4.2. Detecção de apoptose – externalização da fosfatidilserina	51
3.4.4.3. Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial	52
3.4.4.4. Avaliação das espécies reativas de oxigênio (EROs)	52
4. Resultados	56
4.1. Efeito citotóxico de compostos derivados do núcleo tetraidropirano	55
4.2. Avaliação do tipo de morte celular	61
4.2.1. Determinação de características moleculares do tipo de morte celular induzida pelos DNT na linhagem de leucemia mieloide crônica – K562	62
4.2.1.1. Os DNTs alteram a distribuição do DNA no ciclo celular	62

4.2.1.2.	Efeito dos DNTs no potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	64
4.2.1.3.	Avaliação da produção de EROs induzida por DNTs	65
4.2.1.4.	Efeito dos DNTs na externalização de fosfatidilserina	66
4.2.2.	Determinação de características moleculares do tipo de morte celular induzida pelos DNT na linhagem de leucemia mieloide aguda – HL-60	69
4.2.2.1.	Os DNTs alteram a distribuição do DNA no ciclo celular	79
4.2.2.2.	Os DNTs induzem despolarização no potencial transmembrânico mitocondrial	69
4.2.2.3.	Os DNTs estimulam a produção de EROs	72
4.2.2.4.	Efeito dos DNTs na externalização da fosfatidilserina	73
5.	Discussão	77
6.	Conclusão	85
REFERÊNCIAS		87
ANEXO		99

Lista de ilustrações

Figura 1: Características essenciais (marcadores ou <i>hallmarks</i> do câncer) para o crescimento, progressão do câncer e alvos para quimioterápicos.	18
Figura 2: Taxas brutas de incidência das localizações primárias do câncer estimadas para 2014, em homens (à direita) e em mulheres (à esquerda), Brasil.	20
Figura 3: Primeiro exemplo da reação, que seria futuramente denominada de reação de ciclização de Prins.	23
Figura 4: As duas principais vias apoptóticas.	28
Figura 5: Representação das estruturas químicas dos alcoóis homoamílicos utilizados para a síntese dos compostos DNT.	39
Figura 6: Representação das estruturas químicas dos DNT utilizados no “screening” farmacológico.	41
Figura 7: Fotomicrografia da linhagem celular HL-60, em microscópio óptico invertido. Aumento: 400x.	43
Figura 8: Fotomicrografia da linhagem celular K562, em microscópio óptico invertido. Aumento: 400x.	44
Figura 9: Fotomicrografia da linhagem celular HT-29, em microscópio óptico invertido. Aumento: 400x.	44
Figura 10: Fotomicrografia da linhagem celular MCF-7, em microscópio óptico invertido. Aumento: 400x.	45
Figura 11: Fotomicrografia da linhagem celular L929, em microscópio óptico invertido. Aumento: 400x.	45
Figura 12: Esquema da metodologia de extração de células mononucleares de sangue humano.	48
Figura 13: Efeitos de 42b sobre a progressão do ciclo celular em células K562, após 24 horas.	63
Figura 14: Efeitos de 43c sobre a progressão do ciclo celular em células K562, após 24 horas.	64
Figura 15: Avaliação da despolarização mitocondrial de células K562 tratadas com 42b (A) e 43c (B) por um período de 24 h.	65
Figura 16: Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por células K562 tratadas com 42b (A) e 43c (B) por um período de 24 h.	66

Figura 17: Efeito do composto 42b na linhagem K562 com dupla marcação Anexina/IP analisado por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento.	67
Figura 18: Efeito do composto 43c na linhagem K562 com dupla marcação Anexina/IP analisado por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento.	68
Figura 19: Efeitos de 42b sobre a progressão do ciclo celular em células HL-60, após 24 horas.	70
Figura 20: Efeitos de 43c sobre a progressão do ciclo celular em células K562, após 24 horas.	71
Figura 21: Avaliação da despolarização mitocondrial de células HL-60 tratadas com 42b (A) e 43c (B) por um período de 24 h.	72
Figura 22: Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por células HL-60 tratadas com 42b (A) e 43c (B) por um período de 24 h.	73
Figura 23: Efeito do composto 42b na linhagem HL-60 com dupla marcação Anexina/IP analisado por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento.	74
Figura 24: Efeito do composto 43c na linhagem HL-60 com dupla marcação Anexina/IP analisado por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento.	75

Lista de tabelas

Tabela 1: Reagentes e Soluções	35
Tabela 2: Meios de cultura	36
Tabela 3: Tampões	37
Tabela 4: Linhagens tumorais utilizadas nos ensaios de citotoxicidade	43
Tabela 5: Culturas primárias utilizadas nos ensaios de citotoxicidade.	47
Tabela 6: Os valores da CI_{50} obtidos pelo ensaio de MTT, após a incubação das células K562 com derivados de tetraidropiranos, por 24 horas.	56
Tabela 7: Os valores da CI_{50} obtidos pelo ensaio de MTT, após a incubação das células cancerígenas HL-60, K562, HT-29, MCF-7 com derivados de tetraidropirano, por 24 horas.	57
Tabela 8: Os valores da CI_{50} obtidos pelo ensaio de MTT, após a incubação das células cancerígenas HL-60, K562, HT-29, MCF-7 com derivados de tetraidropirano, por 72 horas.	58
Tabela 9: Os valores da CI_{50} obtidos pelo ensaio de MTT, após a incubação das células não cancerígenas PBMC e L929 com derivados de tetraidropirano, por 24 horas e 72 horas.	59
Tabela 10: Os valores da CI_{50} obtidos pelo ensaio de CVN, após a incubação das células cancerígenas HL-60, K562 com derivados de tetraidropirano 42b e 43c , por um período de 24 e 72 horas.	60
Tabela 11: Os valores da CI_{50} obtidos pelo ensaio de MTT, após a incubação da cultura primária de células de pacientes com leucemia mieloide crônica com derivados de tetraidropiranos, por 24 horas e 72 horas.	61

Lista de símbolo e abreviações

AIF	Fator indutor de apoptose
AKT	Protein cinase B
ANOVA	Análise de variância
Apaf-1	Fator 1 de ativação de protease apoptótica
AMPK	Proteína cinase ativada por monofosfato de adenina
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BAX	BCL-2 associada a proteína x
BMBMC	Células Mononucleares da Medula Óssea Humana
CAD	DNase ativada por caspase
CD95L	Ligante de Fas
CEP/HULW	Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do Hospital Universitário Lauro Wanderley
CVN	Captação do vermelho neutro
CI ₅₀	Concentração Inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo
CNS/MS	Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde
CO ₂	Dióxido de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNT	Derivados do Núcleo Tetraidropiranos
EDTA	Ácido tetracético Etilenodiamino dissódico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FasL	Fas ligante
FADD	Proteína Fas associada ao domínio de morte
HEPES	Ácido N-2-hidroximetilpiperazina-N'-2-etanosulfônico
HL-60	Linhagem de células de leucemia mieloide aguda
HT-29	Linhagem de células de câncer de colon
IAP	Proteína inibidora de apoptose (Inhibitory apoptosis protein)
ICAD	Inibitor de CAD
IP	Iodeto de propídeo
ISO	International Standard Organization
LMC	Leucemia Mieloide Crônica
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
L929	Fibroblasto Murino
K562	Linhagem de células de leucemia mieloide crônica
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
MCF-7	Linhagem de células tumorais de epitélio mamário

MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol]-2,5-difeniltetrazólio
NCCD	Nomenclature Committee on Cell Death
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato-salina
PBMC	Células Mononucleares de Sangue Humano Periférico
pH	Potencial hidrogeniônico
PHA	fitohemaglutinina
p53	Proteína supressora tumoral
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RIP1	Receptor-Interacting Protein 1
RIP3	Receptor-Interacting Protein 3
SAR	Relação estrutura atividade
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Smac/DIABLO	Proteína mitocondrial pró-apoptótica
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
TRAIL	Ligante indutor de apoptose
TRMR	Tetrametilrodamina
WHO	World Health Organization
$\Delta\Psi_m$	Potencial transmembrânico mitocondrial

RESUMO

Apesar dos investimentos na busca de terapias mais eficazes contra o câncer, as elevadas taxas de incidência e mortalidade provocadas por esta doença, continuam a crescer, consistindo assim, um dos principais problemas de saúde pública. Em paralelo ao avanço dessa patologia, houve um avanço na química medicinal que permite a síntese de uma variedade de compostos, favorecendo a investigação de novas estruturas com excelentes perspectivas terapêuticas. A síntese de compostos derivados do núcleo tetraidropiranos (DNT) vem recebendo atenção, considerando a ampla atividade biológica dessas estruturas. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi analisar a atividade citotóxica de compostos DNT. A viabilidade celular foi determinada pelos ensaios de redução do sal de MTT e CVN. Dos 31 compostos DNT estudados, **42a-c** e **43a-c** demonstraram potente efeito citotóxico em linhagens cancerígenas (K562, HL-60, HT-29, MCF-7), e um efeito citotóxico menos expressivo em células não cancerígenas (L929, PBMC), as linhagens leucêmicas humanas K562 e HL-60 foram as mais sensíveis. Os compostos **42b** e **43c**, com valores de CI_{50} que variam de $8,97 \pm 4,1$ a $35,35 \pm 5,2$ para as linhagens HL-60 e K562, foram considerados os mais promissores, demonstrando também um efeito citotóxico similar em cultura primária de sangue periférico e de medula óssea de pacientes com leucemia mieloide crônica. A capacidade destes compostos provocarem alterações moleculares associadas ao tipo de morte celular foi avaliada por citometria de fluxo. Na linhagem K562, os compostos **42b** e **43c** tiveram efeito semelhante, provocando um aumento na concentração do DNA hipodiploide e parada na fase G1 do ciclo celular. No ensaio com dupla marcação anexina/iodeto de propídeo (IP) o composto **43c** aumentou 20% de fluorescência para o IP. Para a linhagem HL-60, os compostos **42b** e **43c** induziram aumento da concentração de DNA hipodiploide, nas maiores concentrações, além de induzir despolarização na membrana mitocondrial. Apenas o composto **43c** estimulou produção de EROs, e **42b** e **43c** aumentaram a dupla marcação para anexina/IP. Desta forma, observa-se que os compostos **42b** e **43c** apresentaram um potente efeito citotóxico e atividade antileucêmica, sendo capazes de induzir apoptose e parada no ciclo celular, porém há ainda necessidade de modificações estruturais que aumentem a seletividade destes compostos para células cancerígenas.

Palavras-chave: câncer, citotoxicidade, morte celular, tetraidropirano.

ABSTRACT

Despite the investments in the search for more effective cancer therapies, the high incidence and mortality produced by this disease continue to increase, which has provoked public health problems to the population. In parallel to the progress of this situation, it has been found a breakthrough in the medicinal chemistry allowing synthesis of a variety of compounds, encouraging researchers into new structures with rich therapeutic potential. The synthesis of compounds derived from tetrahydropyran nucleus (DNT) has been receiving attention, considering the broad of biological activity from these structures. Therefore, the aim of this study was to analyze the cytotoxic activity of 31 DNT compounds. Cell viability was determined by MTT reduction and neutral red stain (CVN) assays. From such 31 compounds studied, only **42a-c** and **43a - c** showed potent cytotoxic effect on human cancer lines (K562, HL-60, HT-29 and MCF- 7) and a less significant cytotoxic effect on non-cancerous cells (L929 and PBMC cells) were shown. The leukemic cell lines K562 and HL-60 were the most sensitive ones. Compounds **42b** and **43c**, with IC_{50} values which range from 8.97 ± 4.1 to 35.35 ± 5.2 for the lines HL-60 and K562, were considered the most promising molecules in terms of their cytotoxic effect and they also demonstrated in primary cultures of peripheral blood and bone marrow from patients with chronic myeloid leukemia. The ability of **42b** and **43c** compounds to induce molecular changes related to the type of cell death was assessed by flow cytometry. In K562 cells, the compounds **42b** and **43c** showed similar effect causing an increase in the concentration of hipodiploide DNA and they arrested in the G1 phase of the cell cycle. From double labeling annexin/IP assay, the compound **43c** increased about 20% of PI fluorescence. For HL-60 cell line, the compounds **42b** and **43c** augmented the concentration of hipodiploide DNA and and depolarization of mitochondrial membrane. The compound **43c** stimulated ROS production and double staining to annexina/IP. Compounds **42b** and **43c** showed a potent cytotoxic effect and antileukemic activity, inducing apoptosis and cell cycle. However, there is a need for structural modifications that increase the selectivity of these compounds for cancer cells.

Keywords : cancer , cytotoxicity , cell death , tetrahydropyran .

Introdução

1. Introdução

1.1. Câncer

O processo de carcinogênese comumente ocorre de forma lenta, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa se prolifere e dê origem a um tumor visível. Esse processo é composto por vários estágios antes de gerar um tumor visível (JAFARNEJAD e LI, 2012; LEE; MULLER, 2010; SANTARIUS et al., 2010).

O câncer é uma doença genética complexa, causada principalmente por fatores ambientais que alteram a expressão de genes responsáveis pela codificação de proteínas com papel crítico na regulação da homeostasia celular. Assim, esta doença surge como consequência do acúmulo de alterações na expressão de proto-oncogene ou de gene supressor de tumor e este fenômeno pode acontecer devido a eventos genotóxicos que causam mutações ou anormalidades cromossômicas, e também podem acontecer devido a modificações epigenéticas, tais como a metilação do DNA e a remodelação da cromatina por proteínas histonas (SHEN e LAIRD, 2013; HANAHAN e WEIMBERG, 2011; ALISSON, 2001).

Estas alterações, eventualmente, levam a malignização das células, que continuam a crescer de forma independentemente dos sinais de regulação intrínsecos ou extrínsecos. Para isso, as células cancerígenas adquirirão várias características (figura 1), incluindo potencial replicativo ilimitado, a auto-suficiência à sinais de crescimento, insensibilidade a sinais anticrescimento, instabilidade genômica, evasão a apoptose, reprogramação do metabolismo energético, evasão da resposta imune, angiogênese sustentada, a capacidade de invadir locais secundários e causar metástase (TALMADGE e FIDLER, 2010; CHENG et al, 2008, BURKHART e SAGE, 2008; CURTO et al, 2007; ADAMS e CORY, 2007; BLASCO, 2005; HANAHAN e FOLKMAM, 1996).

Apesar das alterações genéticas determinarem a célula de origem do câncer, os fatores do microambiente são agora conhecidos por regular a progressão do processo maligno, portanto, esses fatores são incluídos como um novo paradigma em indicações do câncer (SHEN e LAIRD, 2013; HANAHAN e WEIMBERG, 2011). Além de células cancerígenas em distintos estágios de diferenciação, o microambiente tumoral inclui fibroblastos, células endoteliais, macrófagos, linfócitos, neutrófilos e mastócitos, os

quais respondem a vários estímulos e comunicam-se por meio do contato físico ou por mediadores inflamatórios (GALES et al, 2013).

A fim de controlar o processo de carcinogênese, os atuais métodos terapêuticos para o tratamento incluem ressecções cirúrgicas, radioterapia, quimioterapia e a hormonoterapia. Embora muito desses tratamentos sejam efetivos na remoção e ataque das células malignas, sabe-se que algumas dessas intervenções também afetam células saudáveis, desencadeando uma série de efeitos deletérios que podem levar a debilitações agudas e crônicas em função da citotoxicidade (LYNCH et al, 2008; DE BACKER et al, 2008; SCHNEIDER et al, 2007).



Figura 1: Características essenciais (marcadores ou *hallmarks* do câncer) para o crescimento e progressão do câncer. Fonte: Modificado de HANAHAN 2011.

Percebe-se que ao longo dos anos, diversas mudanças ocorreram em relação ao perfil epidemiológico de mortalidade mundial, houve redução e maior controle das doenças infecciosas, as quais foram uma das principais causas de morte nos séculos passados. Atualmente se verifica que doenças não transmissíveis, tais como, doenças cardiovasculares e câncer estão ganhando espaço (WHO,2008). O câncer é a segunda

causa de morte no mundo, estando atrás apenas das doenças cardiovasculares. As elevadas taxas de incidência e mortalidade por câncer estão em constante aumento, possivelmente devido ao aumento das expectativas de vida, o crescimento populacional e a globalização associada a estilos de vida pouco saudáveis (MURTHY et al, 2012; MISHRA et al, 2010).

As causas de câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas externas relacionam-se a fatores ambientais; como exemplo, o meio ambiente (água, ar, luz solar), o meio ocupacional (produtos químicos e radioativos) e os hábitos alimentares (DE ALMEIDA et al, 2005; REDDY, ODHAV e BHOOLA, 2003). As causas internas são na maioria das vezes geneticamente pré-determinadas, e podem estar associadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas. Esses fatores causais podem interagir de várias formas (WEINBERG, 2008). De todos os casos, 80% a 90% dos cânceres estão associados a fatores ambientais. A interação de carcinógenos com cada indivíduo determina a vulnerabilidade à indução do câncer. Esta vulnerabilidade é baseada em como o indivíduo lida com as substâncias cancerígenas, idealmente, eliminando-os em uma forma inofensiva antes de fazer qualquer dano genético ou sendo capaz de reparar os danos causados (WHO, 2008, ALISON, 2000).

A correlação de muitos fatores ambientais com determinados tipos de câncer é bastante descrita na literatura, como o cigarro que pode causar câncer de pulmão, a exposição excessiva ao sol que pode causar câncer de pele, e alguns vírus favorecem o desenvolvimento da leucemia e do câncer uterino e alguns componentes dos alimentos que ingerimos promovem câncer de colon (MA, et al 2013; MARSHALL e CHRISTIANI, 2013; LÓPEZ, 2012; ROBINSON, et al, 2013).

Sabe-se ainda que a faixa etária da população também tem contribuído para o aumento da incidência do câncer, visto que o envelhecimento traz mudanças nas células que aumentam a sua suscetibilidade à transformação maligna. Isso, somado ao fato de as células das pessoas idosas terem sido expostas por mais tempo aos diferentes fatores de risco para câncer, explica em parte o porquê de o câncer ser mais frequente nesses indivíduos (CAMPSI, 2013).

Outra faixa etária que se destaca devido a alta taxa de mortalidade provocada pelo câncer são as crianças e adolescentes. Diferentemente do câncer de adulto, o câncer da criança geralmente afeta as células do sistema sanguíneo e os tecidos de sustentação, enquanto que no do adulto as células afetadas são do epitélio, que recobre os diferentes

órgãos (câncer de mama e câncer de pulmão). Doenças malignas da infância, por serem predominantemente de natureza embrionária, são constituídas de células indiferenciadas, o que determina, em geral, uma melhor resposta aos métodos terapêuticos atuais (INCA, 2009).

Neste contexto, o câncer configura-se um dos principais problemas de saúde pública mundial. Pois é uma doença crônico-degenerativa que apresenta um desenvolvimento prolongado e progressivo, afetando várias dimensões da vida humana e causando importante impacto econômico na sociedade (TONON, SECOLI e CAPONERO, 2007).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, haverá 75 milhões de pessoas com câncer, esperando-se 27 milhões de casos incidentes e 17 milhões de mortes (WHO, 2009; SRIVASTAVA et al, 2005). No Brasil, as estimativas para o ano de 2014 apontam para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. De fato, os tipos mais incidentes serão os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon e reto, e estômago para o sexo masculino; e os cânceres de pele não melanoma, mama, cólon e reto, colo do útero e pulmão, para o sexo feminino (Figura 2) (INCA 2013).

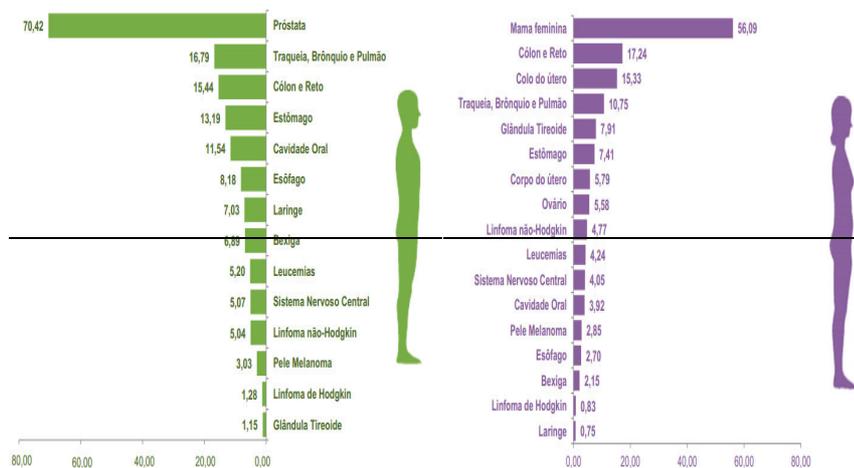


Figura 2: Taxas brutas de incidência das localizações primárias do câncer estimadas para 2014, em homens (à direita) e em mulheres (à esquerda), Brasil. Fonte: MS/INCA/ Estimativa de Câncer no Brasil, 2013. Os valores por 100 mil pessoas.

Compreender e controlar as doenças malignas requer conhecimentos científicos e experiências que vão desde escolhas individuais do estilo de vida do paciente até o conhecimento dos complexos mecanismos de regulação molecular intracelular. Assim, a

busca de novos alvos terapêuticos e de estratégias contra o câncer, podem ser realizados por meio do estudo de novos compostos na regulação da progressão tumoral.

1.2. Química medicinal

Várias são as etapas que levam ao descobrimento, planejamento e desenvolvimento de uma droga. A evolução medicamentosa vem ocorrendo desde o século XIX por meio de sistemáticos avanços. A princípio, usavam-se os medicamentos tradicionais, muitos dos quais derivados de plantas. Posteriormente, os produtos naturais começam a ser isolados de plantas e animais favorecendo a busca de novos medicamentos que atendam melhor as necessidades da população. No final do século XIX e mais destacadamente durante todo o século XX, houve um rápido crescimento na busca de produtos sintéticos resultantes de alterações na estrutura molecular de produtos naturais. Atualmente, os medicamentos já estão sendo preparados com base em um planejamento racional (GARETH e THOMAS, 2003; MONTANARI, 1995).

A química medicinal é baseada no desenvolvimento racional de medicações, sendo definida como uma ciência interdisciplinar responsável pela invenção, descoberta, identificação, preparação de compostos biologicamente ativos, interpretação de sua interação molecular, construção de sua relação estrutura atividade, além de estudar o metabolismo (BARREIRO, 2009).

A atividade biológica apresentada pelos fármacos está diretamente relacionada com a sua estrutura química. Por isso, uma das mais importantes contribuições na área da Química Farmacêutica é a relação entre a estrutura química e a atividade biológica (SAR) apresentada pela substância (WERMUTH et al, 1998).

O estudo de uma classe de compostos previamente sintetizados e avaliados biologicamente podem trazer informações acerca de grupos ou partes das moléculas que são responsáveis pela atividade biológica (farmacofórico). Estas informações podem ser utilizadas para desenvolver uma nova droga que possua maior atividade, sendo esta selecionada a partir de uma substância cuja estrutura possua melhor atividade farmacológica e com menores efeitos colaterais (THOMAS, 2007).

A escolha da estratégia de planejamento estrutural a ser adotada para o desenho molecular do ligante, a partir de uma abordagem fisiológica, dependerá do nível de conhecimento estrutural do alvo terapêutico eleito. Quando a estrutura do alvo terapêutico eleito não é conhecida, o planejamento molecular do protótipo pode ser

conduzido a partir da estrutura química de seu substrato natural, inspirando novos análogos ativos, empregando-se estratégias de planejamento estrutural (BARREIRO, 2009).

Estes protótipos serão avaliados por meio de bioensaios *in vitro* que, se obtido sucesso, fornecerá um ligante do biorreceptor, eleito como alvo terapêutico (BARREIRO e FRAGA, 2005).

1.2.1. Derivados do núcleo tetraidropirano

As drogas são concebidas para interferir em processos patológicos. Na última década, avanços na pesquisa têm intensificado nosso conhecimento de agentes moleculares no câncer, o que têm sido útil para concepção de novos fármacos que tenham potencial anticâncer (FREDERIC et al, 2013; REDDY et al., 2003).

Em paralelo ao avanço dessa patologia e a necessidade de quimioterápicos mais eficazes, houve um avanço na química medicinal que permite a síntese de uma variedade de compostos, favorecendo a busca por novas estruturas com importante valor terapêutico. A síntese de novos derivados do núcleo tetraidropiranos (DNT) vem recebendo atenção (EL-ALZAB et al, 2010; AL-TEL, 2010) . Anéis tetraidropirânicos substituídos são amplamente distribuídos nas estruturas de produtos naturais que apresentam um grande potencial farmacológico (OLIER et al, 2010). Estes compostos são alvos atraentes de síntese orgânica, devido a sua enorme diversidade estrutural e ampla atividade biológica, sendo uma fonte para desenvolvimento de novos fármacos (ERIC et al, 2012; ZHAO et al, 2006; YADAV et al, 2004).

Muitas estratégias seletivas estão sendo desenvolvidas buscando a preparação de DNT, como a reação de ciclização de Prins, que demonstra ser uma reação com excelentes rendimentos e de custo relativamente baixos (VASCONCELLOS e MIRANDA, 2006). A reação de Prins (1919) é a precursora da moderna reação de ciclização de Prins, ela foi realizada inicialmente pela condensação de olefinas com formaldeído, feita em meio aquoso e catalisada por ácidos minerais. Devido à formação de uma mistura complexa de produtos, a reação de Prins permaneceu várias décadas sem aplicações sintéticas muito relevantes (VASCONCELLOS e MIRANDA, 2006). Em 1955, Hanschke e Gendorf publicaram o primeiro relato da reação direta entre álcool homoalílico puro e formaldeído, utilizando ácido sulfúrico como catalisador em

aquecimento, levando ao tetraidropirano como produto principal em bom rendimento (Figura 3)

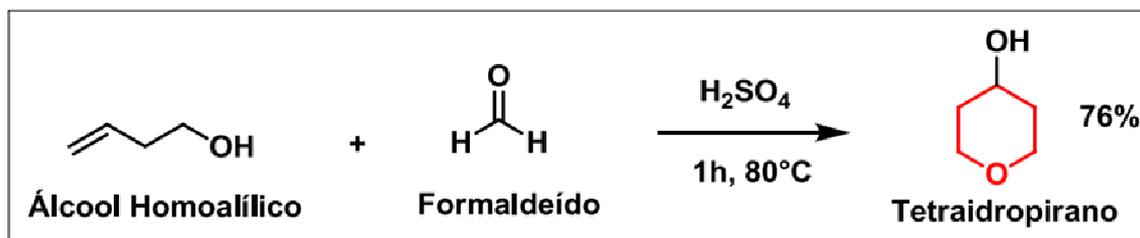


Figura 3: Primeiro exemplo da reação, que seria futuramente denominada de reação de ciclização de Prins. Fonte: HANSCHKE et al., 1955.

Desta forma, podemos definir a reação de ciclização de Prins como o acoplamento entre álcoois homoalílicos (ou éteres) e aldeídos (ou acetais), mediada principalmente por um ácido de Lewis ou de Brønsted (AlCl₃, AlBr₄, SnCl₄, SnBr₄, BF₃.Et₂O, InCl₃, H₂SO₄, entre outros), conduzindo exclusivamente a tetraidropiranos. Geralmente são utilizados como substratos álcoois homoalílicos terminais (R, R₁=H), ou álcoois homoalílicos de geometria E (VASCONCELLOS e MIRANDA, 2006).

Dessa forma, a síntese e o estudo biológico de novos compostos DNT torna-se bastante promissor na busca de novas moléculas com potente atividade anticâncer.

1.3. Citotoxicidade

Antes da aprovação de qualquer novo composto para testes em seres humanos, são efetuados ensaios de toxicidade extensos em sistemas *in vitro* e *in vivo* utilizando diversas espécies animais (RANG et al, 2004). A toxicidade consiste em uma ciência que estuda os efeitos nocivos decorrentes das interações de substâncias químicas com o organismo (MINE, 2003). Sendo assim um fator limitante na liberação e consumo de fármacos.

Com o controle cada vez mais rigoroso em relação ao uso de animais em ensaios toxicológicos, tem-se a necessidade de desenvolver e padronizar testes *in vitro* que detectem a toxicidade de substâncias para uso em seres humanos, evitando a liberação de substâncias que possam causar reações adversas e lesionar o organismo do paciente (ROGERO et al, 2003). Assim, de acordo com o Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization), ISO 10993, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer produto para uso em

dispositivos biomédicos e depois de comprovada a sua não toxicidade, os estudos da biocompatibilidade do produto pode ter continuidade, realizando-se os ensaios necessários em animais de laboratório.

Diversos métodos *in vitro*, para avaliar a toxicidade de biomoléculas, foram padronizados utilizando-se culturas celulares. Estes são denominados testes de citotoxicidade, que consistem em colocar um composto direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células, verificando se há alterações celulares por diferentes mecanismos (ROGERO et al, 2000).

Vários parâmetros que avaliam diferentes alvos devem estar envolvidos nos ensaios de citotoxicidade. Os mais frequentemente utilizados são: inibição da proliferação celular, redução da função metabólica, danos à membrana celular, danos a organelas e alterações morfológicas. Esses parâmetros foram estabelecidos ao longo de vários anos de pesquisa, a partir de ensaios com muitos tipos celulares (KIM et al, 2009; MELO et al., 2003; EISENBRAND et al., 2002; BORENFREUND et al., 1988).

Estudos com estes métodos demonstraram que os testes com culturas celulares podem ser utilizados com sucesso, pois são reprodutíveis, relativamente rápidos, sensíveis e financeiramente acessíveis para a execução do estudo de biocompatibilidade *in vitro*, e resultam na redução do número de animais utilizados (ROGERO et al, 2003; MELO et al., 2000; CHU, 1995).

Os efeitos tóxicos nem sempre causam morte celular, ao menos não imediatamente, pois as células podem ter alterações metabólicas, ou alterações no ciclo celular sem nenhuma diminuição da viabilidade. Este tipo de resposta é denominada citostática e usualmente reversível, resultando da privação de nutrientes ou fator de crescimento, ou presença de um regulador negativo de crescimento. Mas pode ser também irreversível, por exemplo, quando as células entram em um processo irreversível de morte celular (FRESHNEY, 2001).

1.4. Morte celular

O processo de morte celular ocorre em todos os eucariotos multicelulares, sendo necessário para manutenção da homeostase em tecidos saudáveis. A evasão da morte celular é uma das principais características do câncer, portanto a indução da morte celular por meios farmacológicos é o principal fundamento de quase todas as terapias não invasivas contra o câncer. Na última década, muitas pesquisas têm contribuído com

o conhecimento em diversos mecanismos de morte celular, destacando a apoptose, necrose e autofagia (KROEMER et al, 2009).

A morte celular pode ser classificada de acordo com suas características morfológicas, critérios enzimáticos, aspectos funcionais e/ou imunológicos (MELINO, 2001). A *Nomenclature Committee on Cell Death* (NCCD) frequentemente define diferentes tipos de morte celular por critérios morfológicos, sem definição precisa dos mecanismos bioquímicos (KROEMER et al, 2005).

A aquisição de características de morte celular, nem sempre determinam a morte da célula. Para que as células morram é necessário transgredir um “ponto de restrição”, tornando o processo de morte irreversível. Na ausência de eventos bioquímicos claramente definidos para definir o “ponto de restrição”, o NCCD propõe que uma célula deve ser considerada morta na presença de qualquer um dos seguintes critérios moleculares ou morfológicos: a perda da integridade da membrana plasmática, tal como definido pela incorporação de corantes vitais *in vitro*; a fragmentação da célula, incluindo o seu núcleo, em corpos discretos (que são frequentemente definidos como "corpos apoptóticos"), e/ou quando os fragmentos celulares ou corpos apoptóticos são englobados por células adjacentes *in vivo* (KROEMER et al, 2009).

Os processos de morte celular descritos comumente associados ao câncer são a apoptose, autofagia, necrose e necroptose (OKADA, 2004; CASTEDO et al, 2004).

A apoptose é um tipo de morte celular programada caracterizada por células arredondadas, a redução do volume celular (picnose), condensação da cromatina, fragmentação nuclear, classicamente pouca ou nenhuma modificação ultraestrutural em organelas citoplasmáticas, enrugamento (“blebbing”) de membrana plasmática (mas manutenção de sua integridade até o estágios finais do processo) e englobamento por fagócitos residentes (*in vivo*). A avaliação da fragmentação do DNA e/ou da ativação das caspases também pode ser útil na identificação da apoptose (DRULLION et al, 2012; OBEID et al, 2007; BAEHRECKE, 2002). As caspases são sintetizadas como zimogênios, ou pró-enzimas inativas, e são ativadas por outras pró-caspases: encontradas solúveis no citoplasma, no espaço intermembrana mitocondrial e na matriz nuclear de todas as células. Esta cascata proteolítica na qual uma caspase pode ativar outra caspase amplifica a via de sinalização e isto leva a rápida morte celular (ELMORE, 2007). Dez principais caspases têm sido identificadas e amplamente categorizadas em iniciadoras (caspase-2,-8,-9,-10), efetoras ou executoras (caspase-3,-6,-7) e caspases inflamatórias (caspase-1,-4,-5) (COHEN, 1997; RAI et al, 2005).

Existem duas grandes vias de sinalização de apoptose que, embora morfológicamente semelhantes, podem ser desencadeadas por diferentes vias bioquímicas. A via extrínseca (receptor de morte celular) e a via intrínseca (mitocôndrial) (Figura 4).

A via extrínseca é desencadeada pela ativação de receptores de morte da superfamília do fator de necrose tumoral, expressos na superfície celular. Essa via de morte pode ser ativada por citocinas, como fator de necrose tumoral- α (TNF- α), Fas ligante (FasL) e ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral- α (TRAIL) (ASHKENAZI E HERBST, 2008). Uma vez que o receptor é ativado, por exemplo, ligando Fas, o receptor oligomeriza e recruta proteínas adaptadoras, formando um complexo proteico responsável por desencadear a sinalização intracelular, recrutando o FADD (Proteína Fas associada ao domínio de morte) (YOULE E STRASSER, 2008). O complexo proteico recruta um ou mais membros da família das caspases, classicamente, caspase-8. A clivagem da caspase-8 leva a formação de uma enzima ativa que cliva uma cascata de caspases efetoras, em particular caspase-3. A Caspase-3, em seguida, cliva um grande número de substratos intracelulares, que resultam nas alterações morfológicas características da apoptose (TAYLOR E NICOT, 2008). A caspase-8 ativada também pode ativar diretamente a proteína pró-apoptótica Bid, um membro da família Bcl-2, para formar Bid truncado ou tBid, a qual, subsequentemente, se localiza na mitocôndria promovendo oligomerização de outros membros da família Bcl-2, que são proteínas que regulam a permeabilidade da membrana mitocondrial, como Bax, o qual resulta na liberação de citocromo-*c* e da proteína Smac/DIABLO, da mitocôndria (BRECKENRIDGE e XUE 2004; ZIMMERNANN et al., 2001; VERHAGEN et al., 2000).

A via intrínseca é ativada principalmente por drogas anticâncer, ausência de fator de crescimento, hipoxia, entre outros fatores. Estes estímulos induzem a permeabilização da membrana mitocondrial externa, ativando assim a via mitocondrial. A via mitocondrial é caracterizada por liberar para o citosol, a partir do espaço intermembranar mitocondrial, fatores apoptogênicos, como o citocromo-*c* e o Smac/DIABLO. Esta liberação do citocromo-*c* no citosol desencadeia a ativação de caspase-3 por meio da formação do complexo apoptossomo, constituído do citocromo-*c*/Apaf-1/caspase-9- (RIEDL E SALVESEN, 2007). O apoptossomo vai então clivar a pró-caspase 3, ativando-a. A Smac/DIABLO promove a apoptose por inibição das IAPs (proteínas inibidoras de apoptose).

Um segundo grupo de proteínas pró-apoptóticas, AIF (fator indutor de apoptose), endonuclease G e CAD (DNase ativada por caspase) são liberadas da mitocôndria durante a apoptose, mas este evento é tardio e ocorre quando a célula já está condicionada a morrer. AIF é translocada para o núcleo e causa fragmentação do DNA em 50-300 kb e condensação da cromatina nuclear periférica (JOZA et al., 2001). A endonuclease G também é translocada para o núcleo e vai clivar a cromatina para produzir fragmentos do DNA oligonucleossomal (LI et al., 2001). CAD é subsequentemente liberada da mitocôndria e translocada para o núcleo após clivagem de ICAD (inibidor de CAD) pela caspase-3 ativa, o que leva a fragmentação do DNA oligonucleossomal, sendo um processo mais avançado que aumenta a condensação da cromatina (ENARI et al., 1998; NAGATA, 2000).

O controle e regulação destes eventos apoptóticos mitocondriais ocorrem por membros da família de proteínas Bcl-2. A família Bcl-2 de proteínas consiste em proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL e Mcl-1), assim como um grande número de moléculas pró-apoptóticas (Bax, Bad e Bim) (GILLINGS et al, 2009;. TAIT E GREEN, 2010). A proteína supressora tumoral p53 tem uma função crítica na regulação das proteínas da família Bcl-2, embora o exato mecanismo ainda não tenha sido elucidado.

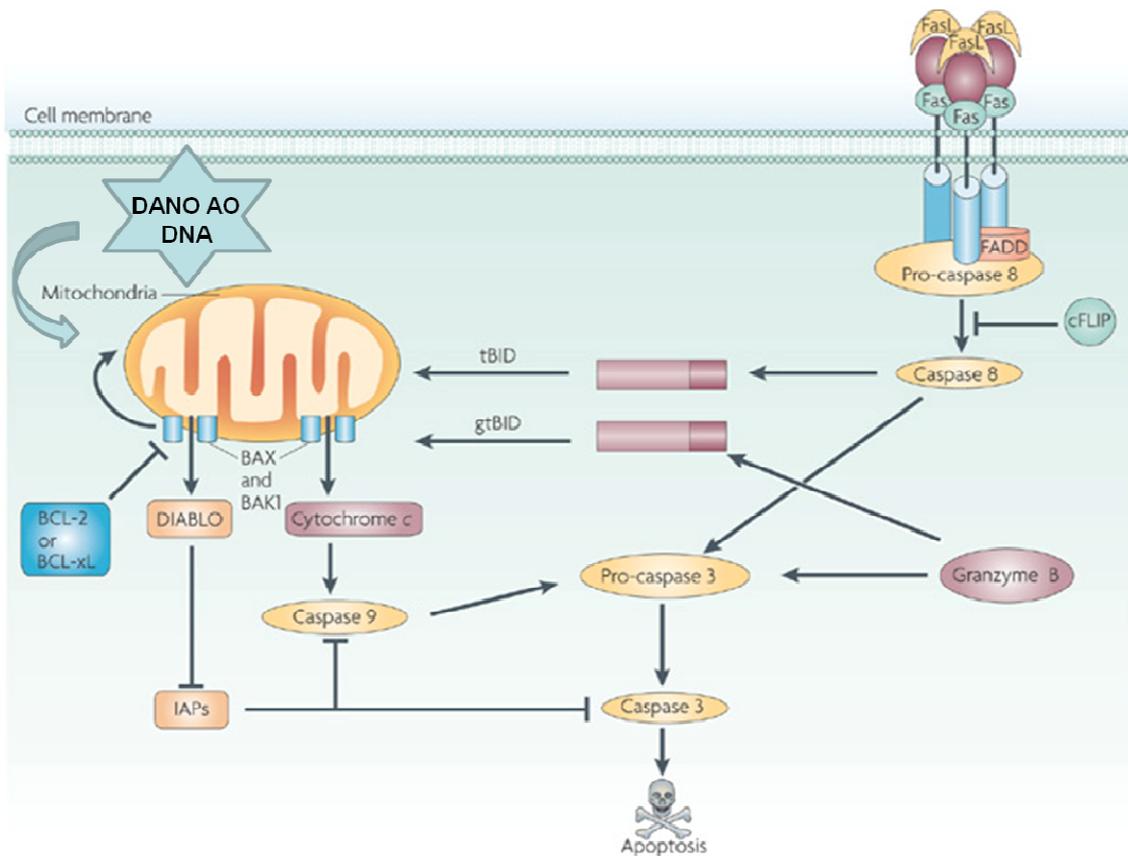


Figura 4: As duas principais vias apoptóticas. Na via mitocondrial o estresse celular induz a translocação de membros da família Bcl-2 pró-apoptóticos do citosol para a mitocôndria, onde induzem a saída do citocromo c. O citocromo c no citosol promove a ativação do Apaf-1 e da prócaspase 9, formando o apoptossoma, o qual ativa a pró-caspase 3, induzindo à apoptose. O citocromo c e o Smac/DIABLO são liberados da mitocôndria após estímulos apoptóticos. Enquanto o citocromo c ativa o Apaf-1, o Smac/DIABLO inibe a ligação das caspases às IAPs (Proteínas Inibidoras da Apoptose). A segunda via é dependente do receptor. A ativação da pró-caspase 8 pela ligação ao receptor de morte está ilustrada. O Fas-ligante (FasL) associa-se a FADD na região intracelular. Este complexo ativa a pró-caspase 8. A caspase-8 ativada pode ativar diretamente a pró-caspase-3 ou clivar a proteína pró-apoptótica Bid, a qual subsequente induz a saída do citocromo c. Granzima B pode unir diretamente e ativar a pró-caspase 3. Granzima B também pode unir BID, resultando em granzima tBID, que pode ativar a via apoptótica intrínseca. cFLIP (FLIP celular / caspase 8 proteína inibidora) pode bloquear a ativação de caspase 8. Bcl-xL, BCL-extra grande. Fonte: Adaptado de Clarke e Tyller, 2009.

A autofagia é outro tipo de morte celular morfologicamente definida como morte celular que ocorre na ausência de condensação da cromatina, mas acompanhada por vacuolização massiva do citoplasma, ou seja, sequestro de material dentro do citoplasma por autofagossomos (KROEMER et al, 2009). Não há relatos de células que

morrem por autofagia com células fagocitárias *in vivo* (BAEHRECKE, 2005; BOYA e GONZALES, 2005).

Autofagia é geralmente associada com resposta ao estresse celular, tais como, a ausência de nutrientes, a hipóxia, danos ao DNA ou estresse do retículo endoplasmático, sendo assim considerado um processo catabólico que na maioria das células pode ser usado para descartar componentes celulares supérfluos ou danificados. A via mais descrita como reguladora de autofagia é a via mTOR, que age associada a ativação da via AKT, a via de proteínas homólogas a Ras ou pela via AMPK (proteína cinase ativada por monofosfato de adenina). De um modo geral, altos níveis de nutrientes e fatores de crescimento estimulam a via mTOR, que por sua vez inibe autofagia (TRISTÃO et al, 2012; LEE et al, 2010). A inibição da via mTOR por estímulos fisiológicos ou farmacológicos ativa a autofagia por reprimir a interação entre ULK1, ULK2 e proteínas da família ATG e seus alvos (complexo beclin 1) (KIM, VIOLLET e GUAN, 2012).

A "morte celular por necrose" ou "necrose" é morfologicamente caracterizada por um ganho no volume celular (oncoses), inchaço das organelas, ruptura da membrana plasmática e consequente perda de conteúdo intracelular. Durante muito tempo, necrose foi considerada uma forma de morte celular acidental, porém recentemente, muitos estudos demonstram evidências de que a morte celular por necrose pode ser associada a um processo de morte celular programada (GOELSTEIN e KROEMER, 2007). Esse processo de morte celular programado, mas com características de necrose, foi denominado necroptose (KREUZALER e WATSON, 2012).

Embora a indução de necroptose é cada vez mais estudada, o seu mecanismo ainda não está totalmente esclarecido. Estudos moleculares demonstraram que o aparecimento de características necróticas é frequentemente induzido pela inibição ou ausência de ativação de caspases (VANLANGENAKKER, VANDEN e VANDENABEELE, 2011). A base molecular da necrose programada está associada à ativação de receptores de morte, como CD95L, o TNF, podendo provocar morte celular por necrose independente de caspase, mas dependente da atividade de um domínio de morte contendo quinase RIP1 (também conhecido como RIPK1) (HOLLER et al, 2000). Posteriormente, mais um membro da família RIP, o RIP3, foi identificado como um componente obrigatório do complexo de indução da necrose (CHO et al, 2009; ZHANG et al, 2009).

Portanto, compreender e descobrir novas vias de sinalização e prospectar moléculas que ativem estas vias de morte celular é bastante interesse para a oncologia, considerando que essas estratégias são geralmente independentes de mecanismos clássicos de morte, que são mutados na maioria dos tipos de câncer (KELLI e STRASSER, 2011). Assim, vias alternativas de morte celular são consideradas alvos promissores para novas terapias contra tipos de câncer que são particularmente difíceis de tratar.

Muitas moléculas que induzem a morte celular têm sido identificadas e utilizadas como alvo para a descoberta de quimioterápicos mais eficientes (REED, 2003). Estimulando assim, a descoberta de novos compostos que além de induzir a morte celular, apresentem uma maior seletividade para as células cancerígenas.

Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a citotoxicidade de moléculas derivadas do núcleo tetraidropirano sobre culturas de células cancerígenas e não cancerígenas, determinando o grupo farmacofórico e caracterizando o tipo de morte celular induzido pelas moléculas.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o potencial citotóxico de substâncias derivadas do núcleo tetraidropirano em culturas imortalizadas e em culturas primárias de células cancerígenas;
- ✓ Comparar a citotoxicidade dos compostos mais ativos em células cancerígenas e não-cancerígenas;
- ✓ Analisar o efeito dos compostos na distribuição do DNA nas fases do ciclo celular;
- ✓ Determinar o potencial transmembrânico da membrana mitocondrial;
- ✓ Mensurar alterações nos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) causado pelos compostos em estudo;
- ✓ Determinar o tipo de morte celular induzido pelas substâncias.

Metodologia

3. Metodologias

3.1. Materiais utilizados

- ✓ Balão volumétrico (250 a 1000 mL)
- ✓ Béquers (100 a 1000 mL)
- ✓ Câmera de Neubauer
- ✓ Erlenmeyer (200 a 500 mL)
- ✓ Frascos estéreis para cultivo celular (25 cm²)
- ✓ Frascos para armazenamento de soluções (250 a 1000 mL)
- ✓ Placas estéreis (24 e 96 poços)
- ✓ Placas de petri
- ✓ Pipetas pasteur estéreis
- ✓ Ponteiras
- ✓ Provetas (100 á 1000 mL)
- ✓ Tubos tipo “eppendorfs” (1,5 e 2 mL)
- ✓ Tubos tipo falcon (15 e 50 ml)
- ✓ Provetas (30 a 1000 mL)

3.2. Equipamentos utilizados

- ✓ Agitador de placa Certomat[®] MO, EUA
- ✓ Agitador magnético TE-088 TECNAL, BRASIL
- ✓ Agitador de placa MS1 MINISHAKER, IKA, EUA
- ✓ Autoclave, PHOENIX LUFERCO, BRASIL
- ✓ Balança analítica MODELO FA2104N, CELTAC, BRASIL
- ✓ Banho Maria com agitação, NOVA ÉTICA, BRASIL
- ✓ Banho Maria com agitação, MULTITEMP III, BRASIL
- ✓ Centrífuga refrigerada, HERMLE Labortedrik GMBH, ALEMANHA
- ✓ Citômetro de fluxo BD FACS CALIBUR, EUA
- ✓ Espectrofotômetro UV1101, BIOTECH
- ✓ Estufa de CO₂ HF 212 UV, ULTRASAFE, CHINA
- ✓ Estufa de secagem, De Leo , BRASIL

- ✓ Fluxo laminar PACHANE, BRASIL
- ✓ Freezer -20°C FE26, ELECTROLUX, BRASIL
- ✓ Freezer -86°C ULT390-3-D31 INDREL. EUA
- ✓ Leitora de ELISA ELx800, BIOTEK, ALEMANHA
- ✓ Microondas Panasonic, BRASIL
- ✓ Microscópio óptico de inversão XS201, TAIMIN, BRASIL
- ✓ pHmetro PHS-3B, LABMETER, BRASIL
- ✓ Refrigerador, Electrolux, BRASIL
- ✓ Vortex QL-90L, VERTEX, EUA
- ✓ Ultra-purificador, Scholar-UV, BRASIL

3.3. Soluções

Tabela 1: Reagentes e Soluções

Nome	Constituição	Fabricante
Álcool etílico 70%	*	TOSCANO
Azul de tripan 4%	0,4 g de azul de tripan	SIGMA
CCCP	PBS q.s.p. 10 mL 0,0051g de CCCP 500µL de DMSO	SIGMA
Dimetilsulfóxido (DMSO)	*	VETEC
EDTA 0,5 M	18,61 g de EDTA 5 mL de NaOH (10M)	SIGMA
Ficol-hitopaque	*	GE HEALTHCARE
Fito hemaglutinina	*	CULTILAB
H₂DCFDA	50 µg de H ₂ DCFDA 8,6 µL de DMSO	SIGMA
Iodeto de propídeo 50µg/mL	5 mg de IP PBS q.s.p. 100mL	SIGMA
MTT	5 mg de MTT PBS q.s.p. 1mL	AMRESCO
SDS/HCL	10 g de SDS 100 mL HCL 0,01 N	AMRESCO FISHER

Solução de antibióticos (Penicilina + Estreptomicina)	*	CULTILAB SIGMA
Soro fetal bovino Inativado (SFB)	*	CRIPION
Solução de lise (vermelho neutro)	1% de ácido acético 49% de etanol 50% água destilada	VERTEC
Solução de tripsina/EDTA	0,250 g de tripsina 0,0186 g de EDTA PBS q.s.p. 100 mL	AMRESCO
Tetrametilrodamina	5 mg de tetrametilrodamina 200 µL DMSO	INVITROGEN
Vermelho Neutro	5mg de vermelho neutro PBS q.s.p. 1mL	SIGMA

* Soluções que foram adquiridas já preparadas pelo fabricante

Tabela 2: Meios de cultura

Nome	Constituição	Fabricante
RPMI 1640	10,4 g de meio RPMI em pó 2,0 g de bicarbonato de sódio 5,9 g de HEPES 0,3 g de glutamina Água ultra-pura q.s.p. 1000 mL	HIMEDIA SIGMA
DMEM	10,4 g de meio RPMI em pó 3,7 g de bicarbonato de sódio 5,9 g de HEPES 0,3 g de glutamina Água ultra-pura q.s.p. 1000 mL	HIMEDIA SIGMA

Tabela 3: Tampões

Nome	Constituição	Fabricante
Tampão de lise (para análise do ciclo celular)	0,1g de citrato de sódio	GRUPO QUÍMICA
	0,1mL de Triton-X	ISO FAR
	0,2mg de iodeto de propídeo	SIGMA
	Água destilada q.s.p. 100mL	
Solução salina tamponada com sais de fosfato (PBS)	3,99 g de NaCl (136,88 mM)	VETEC
	0,1 g de KCl (2,7 mM)	VETEC
	0,061 g de KH ₂ PO ₄ (0,9 mM)	VETEC
	0,454 g de Na ₂ HPO ₄ (6,4 mM)	MERCK
	Água destilada q.s.p. 500 ml	
	(Solução autoclavada por 15 min a 121°C, sob 1 atm)	

3.4. Estudo da atividade citotóxica *in vitro*

3.4.1. Moléculas estudadas

Para realização do “screening” farmacológico, utilizaram-se moléculas sintéticas DNT obtidas da “ciclização de Pris”, reação relativamente econômica e de execução simplificada. Todas as moléculas utilizadas foram sintetizadas e fornecidas pelo professor Dr. Mário Luiz Araújo de Almeida Vasconcellos, do Departamento de Química da Universidade Federal da Paraíba, responsável pelo Laboratório de Síntese Química Medicinal.

Ressalta-se que os compostos em estudo são estruturas simplificadas e aquirais, ou seja, não dispõe de enantiômeros dispensando, desta forma, uma fase subsequente de estudo dos enantiômeros separados, uma das fases mais complicadas no desenvolvimento de novas drogas sintéticas (SILVA, 2013).

Para execução dos ensaios, os trinta e um compostos, em sua maioria inéditos, foram previamente dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) puro e estéril no preparo da solução estoque de 20 mM, e diluídos seriadamente em meio (RPMI ou DEMEM) para obtenção das concentrações finais. Os DNTs com efeito anticâncer mais promissor foram escolhidos para investigação do tipo de morte celular.

A figura 6 mostra a estrutura química dos 31 DNTs utilizados neste estudo. Os tetraidropiranos foram obtidos pela reação de “ciclização de Prins”, que consiste na reação de um álcool homoalílico com aldeídos aromáticos, mediada usualmente por ácidos de Lewis cuja escolha é fundamental para o sucesso da rota sintética. Isso porque os diversos grupos introduzidos na posição 4 do esqueleto tetraidropirânico vem a ser função do ácido de Lewis escolhido.

Os álcoois homoalílico **51a-c** (figura 5) foram submetidos às reações de “ciclização de Prins”, utilizando os aldeídos aromáticos (benzaldeído, 4-fluor-benzaldeído e o 2- naftaldeído, respectivamente) e o $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (trifluoreto de boro) para a obtenção dos tetraidropiranos hidroxilados **40a-c**, sendo **40b-c** inéditos. Depois de caracterizados, os tetraidropiranos hidroxilados foram utilizados com matéria prima para a preparação dos compostos **41a-c**, **42a-c**, **43a-c**, **46a-c**, **47a-c**, **48a-c**, **49a-c** e **50a-c**.

Para obtenção dos tetraidropiranos **44a-b**, também foi realizada a “ciclização de Prins”, com os mesmos álcoois homoalílico e aldeídos aromáticos (benzaldeído, 4-fluor-benzaldeído e o 2- naftaldeído, respectivamente), porém o ácido de Lewis utilizado foi o SnBr_4 (tetrabrometo de estanho), sendo os dois compostos inéditos. Enquanto que para obtenção dos tetraidropiranos **45a-b**, a diferença também foi o ácido de Lewis, utilizou-se o AlCl_3 (tetracloreto de estanho) e obteve-se estruturas inéditas.

Para obtenção das cetonas **41a-c**, realizou-se a oxidação dos tetraidropiranos hidroxilados **40a-c**, sendo as cetonas **41b-c** inéditas. Depois de caracterizadas, as cetonas **41a-c** na presença do cloridrato de aminoguanidina foram utilizadas para obtenção das hidrazonas **42a-c**, inéditas. Posteriormente, as guanil-hidrazonas **42a-c** foram utilizadas para a preparação das **43a-c** por redução com cianoborohidreto de sódio (NaCNBH_3 - agente redutor), sendo todas as aminoguanidina inéditas.

Para obtenção os toluenossulfonatos **46a-c**, os tetraidropiranos hidroxilados **40a-c** foram tosilados com cloreto de tosila, logo, para obtermos dos tetraidropiranos

metanossulfonatos **47a-c**, os tetraidropiranos hidroxilados **40a-c** foram mesilados com cloreto de mesila. Sendo os tetraidropiranos **46b-c** e **47a-c** inéditos.

Para obtenção dos análogos de nucleosídeos **48a-c**, foi realizado as reações de acoplamento dos tetraidropiranos tosilados **46a-c** com a base nitrogenada adenina para, utilizando K_2CO_3 e DMF. Todos esses análogos de nucleosídeos são inéditos.

Para obtenção os derivados do ácido acetil salicílico **49a-c**, os tetraidropiranos hidroxilados **40a-c** foram acetilados com o cloreto do ácido acetil salicílico, resultado inédito. E para obtenção dos compostos **50a-c**, foi realizada a adição de um segundo núcleo tetraidropirânico nos tetraidropiranos hidroxilados **40a-c**, obtendo também estruturas inéditas. Todas essas reações descritas por Silva (2013).

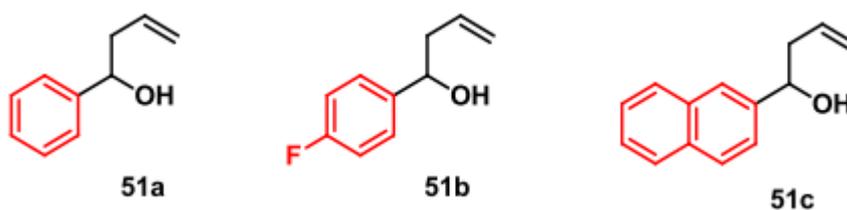
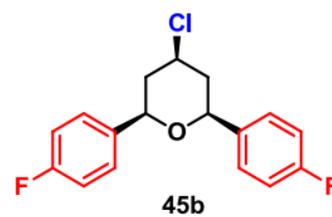
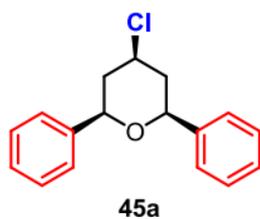
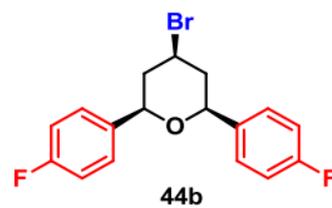
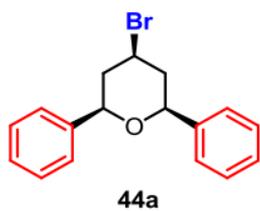
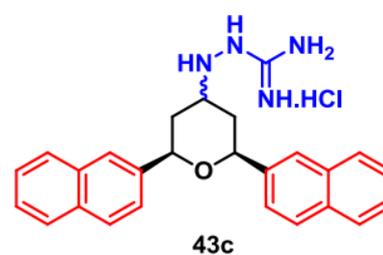
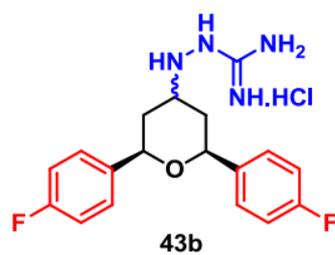
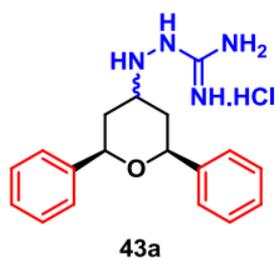
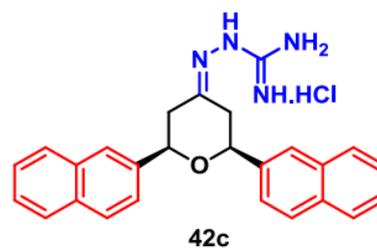
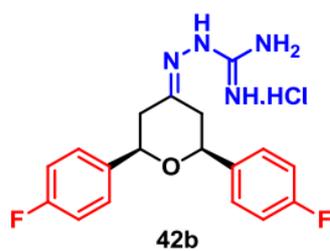
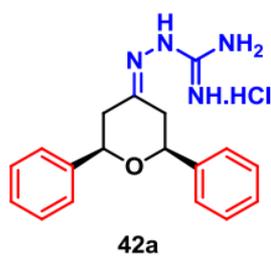
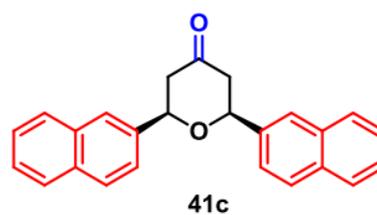
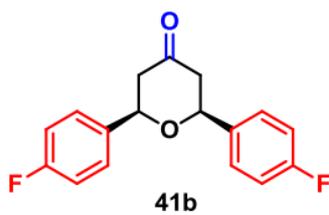
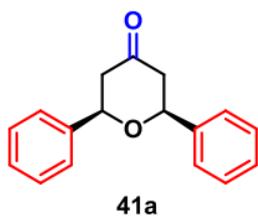
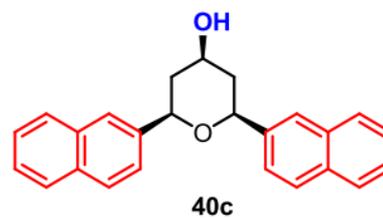
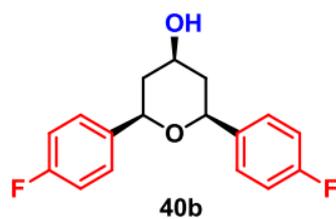
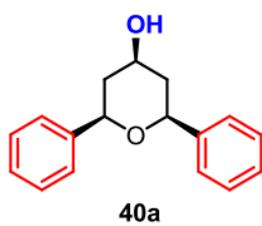


Figura 5: Representação das estruturas químicas dos alcoóis homoamílicos utilizados para a síntese dos compostos DNT.



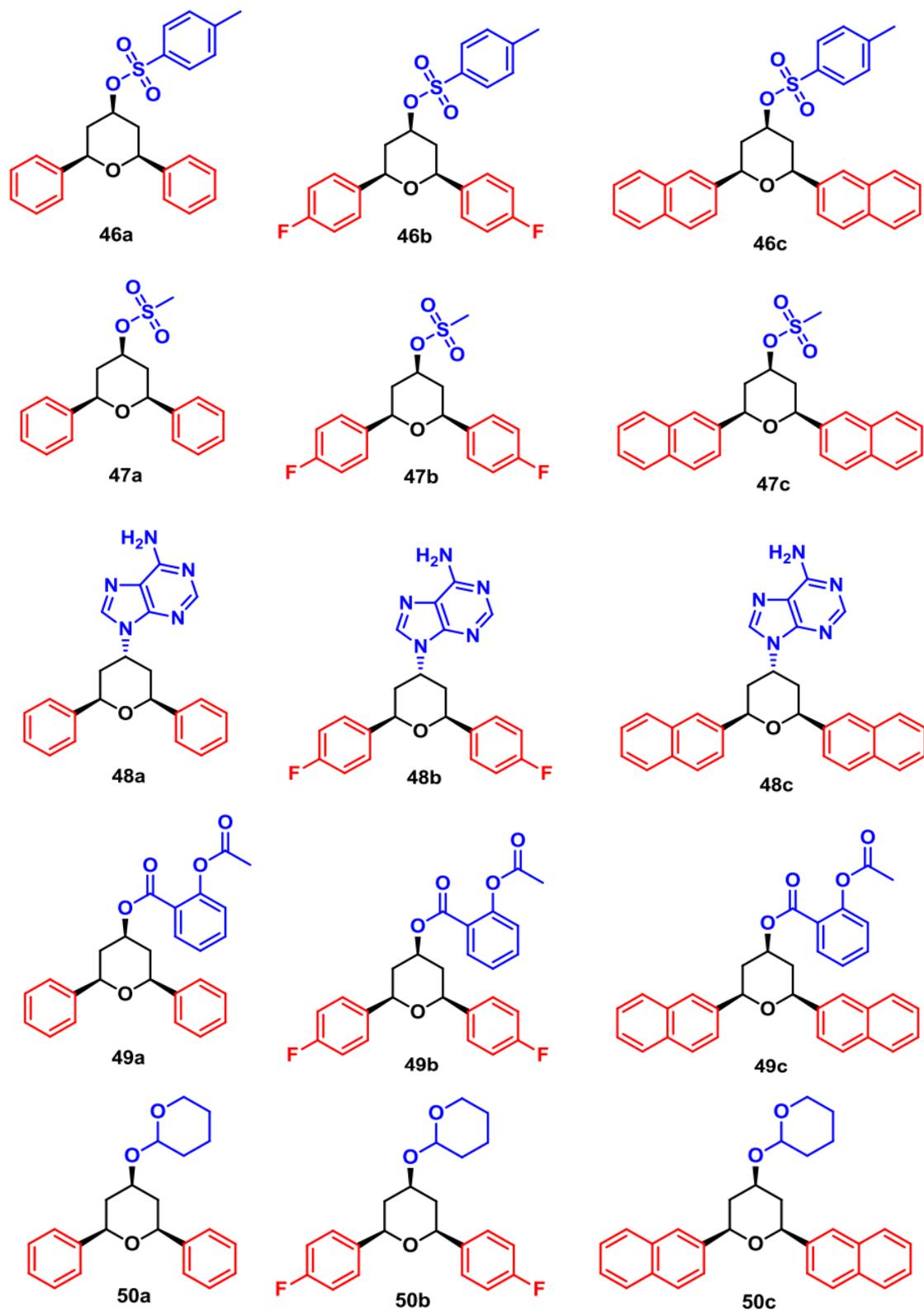


Figura 6: Representação das estruturas químicas dos DNTs utilizados no “screening” farmacológico.

3.4.2. Modelos biológicos experimentais

3.4.2.1. Cultivo celular

Foram utilizadas as linhagens listadas na tabela 4, sendo as linhagens cancerígenas HL-60 (figura 7), K562 (figura 8), HT-29 (figura 9), MCF-7 (figura 10) e a linhagem não cancerígena L929 (figura 11), provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram mantidas no Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular, da Universidade Federal da Paraíba.

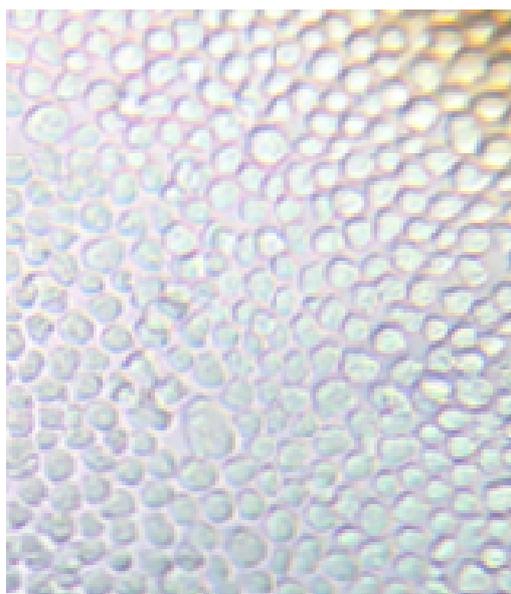
Essas células foram cultivadas em frascos estéreis (25 cm²) contendo meio RPMI 1640 ou DEMEM, de acordo com as especificidades de cada cultura, acrescido dos antibióticos: penicilina 100U/ml e estreptomicina 100µg/ml e suplementado com 10% de soro bovino fetal. Os frascos foram mantidos em estufa de células, a uma atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e temperatura controlada de 37°C.

O crescimento celular foi monitorado, diariamente, em microscópio óptico de inversão. A troca do meio de cultura foi realizada a cada dois dias. Quando as células atingiam uma confluência de 90%, realizava-se uma subcultura ou armazenamento das células em freezer -80 °C e nitrogênio líquido, para as linhagens aderentes, as mesmas foram dispersas utilizando uma solução de tripsina – EDTA (0,25%/0,02%).

Todos os procedimentos do cultivo foram realizados em capela de fluxo laminar, seguindo-se os protocolos para assegurar ausência de contaminação dos materiais. Antes da realização dos experimentos, as células foram contadas em hemacitômetro, utilizando-se o reagente azul de tripan, o qual tem a capacidade de penetrar nas células cujas membranas encontram-se danificadas, corando assim de azul as células inviáveis, e os experimentos só foram realizados quando as células em análise atingem uma viabilidade superior ou igual a 90%.

Tabela 4: Linhagens utilizadas nos ensaios de citotoxicidade

Linhagem	Tipo histológico das células	Origem
HL-60	Leucemia promielocítica aguda	Humana
HT-29	Adenocarcinoma de colón	Humana
K562	Leucemia promielocítica crônica	Humana
MCF-7	Adenocarcinoma de mama	Humana
L929	Fibroblastos do tecido conjuntivo	Rato

**Figura 7:** Fotomicrografia da linhagem celular HL-60, em microscópio óptico invertido. Aumento: 400x.

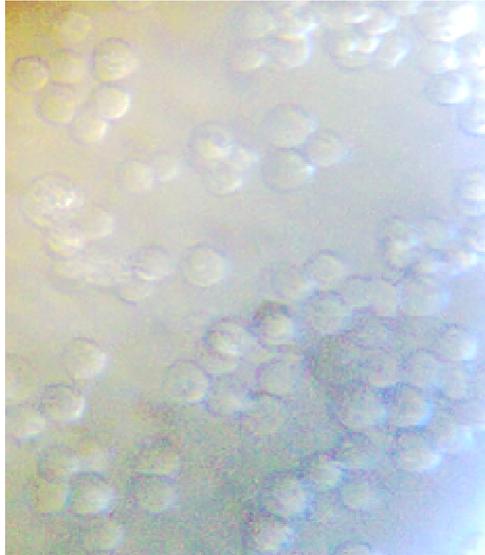


Figura 8: Fotomicrografia da linhagem celular K562, em microscópio óptico invertido. Aumento: 400x.

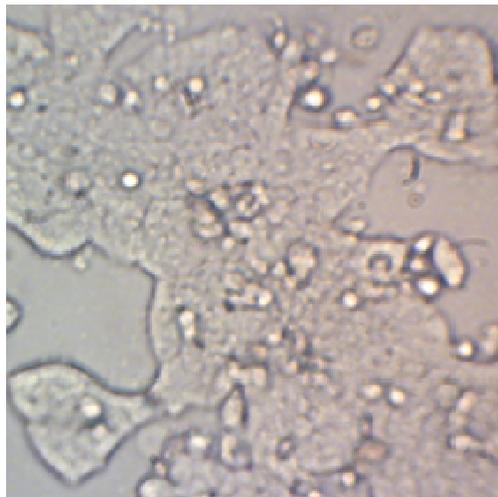


Figura 9: Fotomicrografia da linhagem celular HT-29, em microscópio óptico invertido. Aumento: 400x.

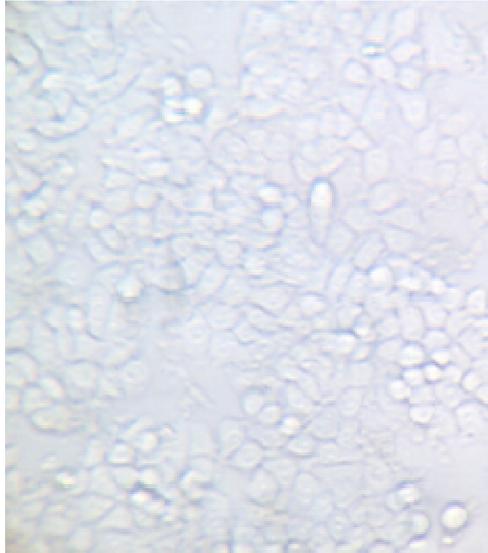


Figura 10: Fotomicrografia da linhagem celular MCF-7, em microscópio óptico invertido. Aumento: 400x.

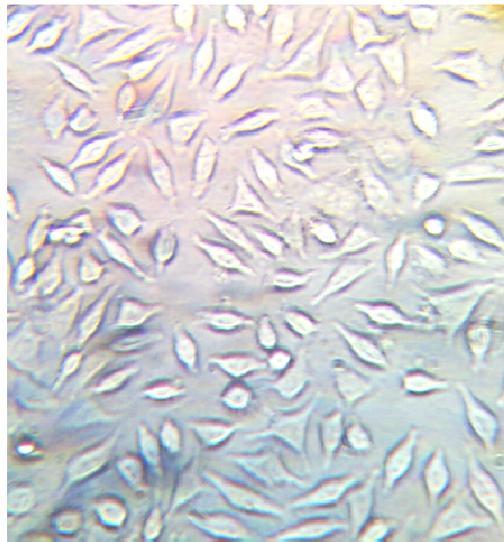


Figura 11: Fotomicrografia da linhagem celular L929, em microscópio óptico invertido. Aumento: 400x.

3.4.2.2. Obtenção de células mononucleares de sangue humano.

A fim de analisar a ação das moléculas em estudo sobre as culturas primárias listadas na tabela 5, foi feito o isolamento de células mononucleares de sangue humano. Essas células encontram-se na corrente sanguínea ou medula óssea, pertencem ao grupo dos leucócitos e são representadas por monócitos (6,5%) e por linfócitos (35%) (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008).

As células mononucleares não cancerígenas foram isoladas a partir de amostras de sangue periférico de doadores saudáveis, não fumantes, que não tinham tomado qualquer medicamento por pelo menos 15 dias antes da doação e com idade entre 18-30 anos, essas amostras foram cedidas pelo Hemocentro da Paraíba. Convém mencionar que as amostras que foram fornecidas seriam descartadas. As células mononucleares também foram isoladas a partir de amostras de sangue periférico e de medula óssea de pacientes com leucemia mielóide crônica (LMC). Neste caso, foram escolhidas amostras de sangue de pacientes recém-diagnosticados para LMC e que não haviam iniciado o tratamento. Essas amostras foram cedidas do Hospital Napoleão Laureano, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

Esse estudo foi realizado com base na resolução nº 196/96 do CNS/MS que regulamenta a ética de pesquisa com seres humanos e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley – CEP/HULW, com o certificado de apresentação para apreciação ética (CAAE) número 05878712.7.0000.5183.

A técnica utilizada rotineiramente para a separação das células mononucleares consiste na mistura do sangue com compostos que agregam eritrócitos (polímeros e polissacarídeos) e aumentam a taxa de sedimentação dessas células. As células mononucleares são pouco afetadas pela centrifugação; portanto, podem ser coletados do sobrenadante do tubo, ao passo que os eritrócitos estão sedimentados e o plasma fica na fase superior, como demonstrado na figura 12.

Para a obtenção destas células retira-se uma alíquota de 3 mL de sangue e homogeneiza-se com 3mL de meio para cultivo sem suplemento ou PBS, em tubos estéreis, seguido da adição de 4,5mL de Ficoll-Histopaque. A seguir, realizou-se a centrifugação a 400g, ~20°C por 30 minutos sendo o plasma descartado

cuidadosamente. O anel de células mononucleares foi retirado e adicionado em um tubo do tipo falcon, realizando-se duas lavagens com 3 mL de meio para cultivo sem suplemento, seguido de centrifugação a 400g, ~20°C por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado agitado no vórtex com meio para cultivo suplementado com 10% de soro bovino fetal. Posteriormente, as células foram avaliadas quanto a sua viabilidade seguindo então para os experimentos, quando a viabilidade obtida foi igual ou superior a 90% (FAHENIA, 2012).

Tabela 5: Culturas primárias utilizadas nos ensaios de citotoxicidade.

Linhagem	Tipo histológico das células	Origem
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico (não cancerígena)	Humana
PBMC/LMC	Células mononucleares de sangue periférico (cancerígena – leucemia mieloide crônica)	Humana
BMBMC/LMC	Células mononucleares da medula óssea (cancerígena – leucemia mieloide crônica)	Humana

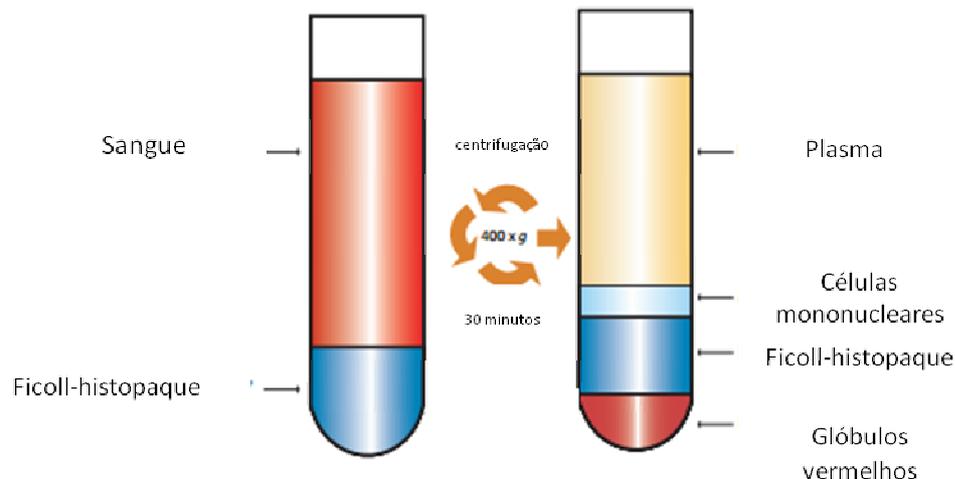


Figura 12: Esquema da metodologia de extração de células mononucleares de sangue humano. Fonte: <http://butterflyandbiotech.blogspot.com.br/2013/10/isolation-of-monocytes-from-pbmc.html>

3.4.3. Viabilidade celular

3.4.3.1. Redução do MTT

O MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium]) é um ensaio colorimétrico utilizado para mensurar de forma indireta a citotoxicidade, a proliferação ou viabilidade celular (MOSMANN, 1983). O MTT permite avaliar a capacidade das células metabolicamente ativas converterem o sal de tetrazólio amarelo e solúvel em água, em cristais de formazam púrpuras e insolúveis em água, cuja quantidade é medida espectrofotometricamente, mensurando assim a viabilidade celular. Esta reação de redução é intermediada pelo produto das desidrogenases mitocondriais (NADH e NADPH) e por algumas enzimas lisossomais (LIU et al, 1997). O valor da absorbância do formazam guarda proporção com o número de células viáveis. (SERRANO et al, 2004).

Metodologia experimental

As células foram semeadas em placas com 96 poços, nas concentrações de 3×10^4 , 5×10^4 e 5×10^5 células/mL, respectivamente para linhagens aderentes, linhagens não aderentes e culturas primárias, utilizando-se meio RPMI ou DMEM, conforme as especificidades de cada célula. As substâncias foram adicionadas aos poços nas concentrações desejadas (3 – 100 μ M). Antes da adição das substâncias, as células

mononucleares foram previamente tratadas com 1% de fitohemaglutinina. Foi realizado o controle negativo (200 µL de células e meio/poço), o branco (200 µL de Dodecil Sulfato de Sódio, SDS/poço). As células foram incubadas com os DNTs em estufa a 5% de CO₂ e 37°C por 24h e 72 horas. Após esse período, as células foram centrifugadas (5 min, 400 g) e o sobrenadante foi retirado, os poços foram lavados com PBS e colocou-se o MTT a 0,5 mg/mL. Após 3 horas, o sobrenadante foi removido e uma solução contendo 10% SDS foi acrescentada para solubilizar os cristais de formazam. Posteriormente, aguardou-se o formazam ser dissolvido, e registrou-se a absorbância em espectrofotômetro de placa tipo ELISA, com um filtro de 570 nm (FAHEINA et al., 2012). A viabilidade celular foi expressa em relação à porcentagem da absorbância da cultura controle, obtida por células não tratadas, após subtração da absorbância dos poços utilizados como branco, sendo utilizado o etoposídeo como substância controle. Os dados foram comparados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do pós-teste bonferrone, sendo considerado a diferença significativa quando $p < 0,05$.

3.4.3.2. Ensaio de captação do vermelho neutro (CVN)

Ao nível subcelular, o sistema lisossomal tem sido identificado como um alvo dos efeitos tóxicos de certas substâncias (SVENDSEN et al., 2004). A técnica de CVN baseia-se no uso do vermelho neutro, um fraco corante catiônico que se liga por ligações hidrofóbicas eletrostáticas em sítios aniônicos e/ou grupos fosfato na matriz lisossomal das células vivas (MELO, et al., 2000; THORNTON et al., 1995). A exposição a um agente tóxico que altere a superfície celular ou a membrana lisossomal promove o escoamento desse corante (RENZI et al., 1993). A quantidade de vermelho neutro, retida no lisossomo, é então determinada espectrofotometricamente (MELO et al., 2003).

Metodologia experimental

As células HL-60 e K562 foram semeadas em placas com 96 poços, na concentração de 5×10^4 células/mL. Os análogos **42b** e **43c** foram adicionadas aos poços nas concentrações desejadas (3 – 100 µM). As placas foram mantidas em estufa com 5% de CO₂ e a 37°C por 24 horas e 72h. Após esse período, retirou-se 100 µL do sobrenadante e colocou-se 100 µL de vermelho neutro (0,1 mg/mL), previamente dissolvido e filtrado em membrana. Após 4 horas, o sobrenadante foi removido e os poços foram lavados com solução salina PBS – Dulbecco para eliminar o excesso de

corante extracelular. Em seguida foi acrescentada a solução de lise, com a finalidade de extrair o vermelho neutro incorporado nos lisossomos. A placa foi agitada por 30 minutos e a absorbância foi mensurada a 540 nm, em leitor tipo ELISA (DAGUANO, SANTOS e ROGERO, 2007). Os dados foram comparados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do pós-teste bonferrone, sendo considerado a diferença significativa quando $p < 0,05$.

3.4.4. Estudo do mecanismo de morte celular

3.4.4.1. Análise do conteúdo de DNA e distribuição nas fases do ciclo celular

O ciclo celular é formado por diferentes fases: G1, S, G2 e M, cada uma com uma quantidade específica de DNA, caracterizando a fase do ciclo em que a célula se encontra (NUNEZ, 2001; RABINOVITCH, 1993). A avaliação do conteúdo celular de DNA consiste na capacidade do iodeto de propídeo se ligar ao DNA das células, para isso a membrana plasmática deve ser primeiramente rompida com um detergente, permitindo a entrada do corante até o núcleo. Dessa forma, o DNA celular será marcado estequiometricamente, ou seja, a quantidade de corante será diretamente proporcional à quantidade de DNA no interior da célula, permitindo a identificação da quantidade de células em cada fase do ciclo.

Metodologia experimental

As células foram semeadas em placas de 24 poços a uma concentração de 5×10^5 células/mL e incubadas com os análogos **42b** e **43c** em concentrações distintas para linhagem HL-60 e para linhagem K562, por um período de 24h. Posteriormente, as células foram coletadas em tubos tipo “eppendorfs” e centrifugadas a uma velocidade de 400 g, por 5 min, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi então descartado e as células ressuspensas em uma solução de lise e incubadas por um período de 30 minutos, a seguir as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo FACS Calibur (BD Biosciences). Para a aquisição das amostras foi utilizado o programa Cell Quest, e dez mil eventos foram adquiridos de cada amostra, cada um correspondendo a uma célula. Os parâmetros analisados foram FL2-W versus FL2-A, (NUNEZ, 2001). Os dados foram comparados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do pós-teste Newmam Keels, sendo considerado a diferença significativa quando $p < 0,05$.

3.4.4.2. Detecção de apoptose – externalização da fosfatidilserina

Fosfatidilserina (FS) é um fosfolípido carregado negativamente, que é normalmente predominantemente na face citosólica da membrana plasmática (FRÉDÉRIC e REUTELINGSPERGER, 2013). Quando ocorre a morte celular, FS é translocado para a camada externa da membrana. Isto ocorre nas fases iniciais da morte celular por apoptose, durante a qual a membrana celular continua intacta. A anexina tem a propriedade biológica de ligação a fosfolípidios, tais como FS, de um modo dependente de Ca^{2+} . A anexina V estará associada ao FITC, fluorocromo (RAYNAL e POLLARD, 1994). Por outro lado, a necrose é acompanhada por perda da integridade da membrana e extravasamento de constituintes celular no ambiente. Portanto, a medição de ligação da anexina V, executado simultaneamente com a exclusão do iodeto de propídeo que é incapaz de penetrar em células com a membrana intacta, proporcionaria um ensaio perfeito para detectar células em apoptose e de diferenciar entre apoptose e necrose (FRÉDÉRIC e REUTELINGSPERGER, 2013; VERMES et al, 1995). Assim, pode se determinar células viáveis (FITC-/PI-), células em apoptose (FITC + / PI-) e as células em necrose (FITC + / PI +).

Metodologia experimental

As células foram semadas em placas com 24 poços na concentração de 5×10^5 células/poço e incubadas com os análogos **42b** e **43c** em distintas concentrações para linhagem HL-60 e para linhagem K562, por um período de 24h. As células foram coletadas e lavadas com PBS. Após este processo o concentrado de células foi ressuspendido em tampão de ligação (100 μL). Então foi marcado com AnexinaV-Alexafluor kit (INVITROGEN, USA), e incubado por 15 min a temperatura ambiente no escuro. Após incubação, foi adicionado 400 μl do tampão de ligação e a fluorescência foi medida por citometria de fluxo FACS Calibur (BD Biosciences). Para a aquisição das amostras, foi utilizado o programa Cell Quest, e dez mil eventos foram adquiridos de cada amostra, cada um correspondendo a uma célula, por meio do filtro FL3 x FL1. Os dados foram comparados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do pós-teste Newmam Keels, sendo considerado a diferença significativa quando $p < 0,05$.

3.4.4.3. Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial

A mitocôndria está envolvida na via apoptótica intrínseca. O citocromo C liberado da membrana externa da mitocôndria irá contribuir para desdobramento de rotas apoptóticas e o espaço despreenchido funcionará como poro. Através destes poros formar-se-á um influxo de íon H^+ , induzindo uma alteração do potencial transmembrânico. A tetrametilrodamina, um corante fluorescente nucleofílico, é seqüestrado para dentro da mitocôndria quando esta apresenta seu potencial transmembrânico inalterado, assim, as células viáveis emitem fluorescência verde devido à maior quantidade de tetrametilrodamina ligada às cargas negativas internas, enquanto as mitocôndrias das células em processo apoptótico sofrem alteração no potencial transmembrânico emitindo menor fluorescência (MESQUITA, 2009).

Metodologia experimental

As células, na concentração de 5×10^5 células/mL, foram semeadas em placas de 24 poços e incubadas com os análogos **42b** e **43c** em distintas concentrações para linhagem HL-60 e para linhagem K562, por um período de 24h. Posteriormente, as células foram coletadas em tubos tipo “eppendorfs” e centrifugadas a uma velocidade de 400 g, por 5 min, em temperatura ambiente, o sobrenadante foi então descartado e as células incubadas com tetrametilrodamina, a uma concentração de 10 μ M, à 37 °C por 30 min no escuro, sendo em seguidas lavadas com PBS, e ressuspensas também em PBS e a fluorescência foi medida por citometria de fluxo FACS Calibur (BD Biosciences). O CCCP foi utilizado como controle positivo. Para a aquisição das amostras foi utilizado o programa Cell Quest, e dez mil eventos foram adquiridos de cada amostra, cada um correspondendo a uma célula, por meio do filtro FL2-H. Os dados foram comparados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do pós-teste Newmam Keels, sendo considerado a diferença significativa quando $p < 0,05$.

3.4.4.4. Avaliação das espécies reativas de oxigênio (EROs)

A presença de EROs intracelular foi estimada pela sonda fluorescente, 2',7'-dichlorohydrofluorescein diacetato (H_2 -DCF-DA). Este corante é desacetilado por esterases intracelulares e convertido em 2',7'-dichlorohydrofluorescein (H_2 -CDF) não fluorescente, o qual é rapidamente oxidado a um composto altamente fluorescente 2',7'-dichlorohydrofluorescein (DCF) na presença de EROs.

Metodologia experimental

As células foram semeadas em placas com 24 poços na concentração de 5×10^5 células/poço e incubadas com os análogos **42b** e **43c** em distintas concentrações para linhagem HL-60 e para linhagem K562, por um período de 24h. Como controle positivo será usado o peroxide de hidrogênio - H_2O_2 (100 μ M) por 15 min. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (400 g/ 5 minutos), lavadas com PBS e marcadas com 10 μ M H_2 -DCFH-DA por 30 min, no escuro a 37 °C. As células foram lavadas com PBS e a fluorescência foi medida por citometria de fluxo FACS Calibur (BD Biosciences). Para a aquisição das amostras foi utilizado o programa Cell Quest, e dez mil eventos foram adquiridos de cada amostra, cada um correspondendo a uma célula, por meio do filtro FL1-H. Os dados foram comparados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do pós-teste Newmam Keels, sendo considerado a diferença significativa quando $p < 0,05$.

Resultados

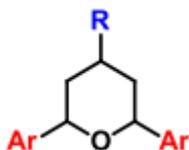
4. Resultados

4.1. Efeito citotóxico de compostos derivados do núcleo tetraidropirano

O efeito citotóxico dos compostos sintéticos DNT (Figura 6) foi investigado empregando diferentes tipos de células cancerígenas e não cancerígenas, utilizando o ensaio de redução do MTT, que avalia atividade metabólica e o ensaio de captação do vermelho neutro, o qual estima a integridade da membrana dos lisossomos.

A princípio, o efeito citotóxico dos compostos DNT foi avaliado na linhagem celular K562, pelo ensaio de MTT, por um período de 24 horas. A tabela 6 mostra a CI_{50} (concentração capaz de inibir 50% do efeito máximo) dos 31 compostos estudados. Observou-se o efeito apenas para as hidrazonas **42a-c** e as aminoguanidinas **43a-c**, enquanto os outros compostos exibidos não demonstraram efeitos significativos sobre a redução da viabilidade celular (tabela 6). Os 6 DNTs bioativos diferenciam-se dos demais compostos pela presença de um radical nitrogenado, NNHCNH(NH₂), o qual parece ser o radical farmacofórico responsável pelo potente efeito citotóxico. Pode-se observar que sempre as hidrazonas **42a-c** se mostraram mais ativas que as suas respectivas aminoguanidinas **43a-c**, logo observamos que a transformação das hidrazonas **42a-c** em aminoguanidinas **43a-c** (redução da dupla ligação, C=N) implicou em uma diminuição da atividade biológica.

Tabela 6: Os valores da CI_{50} obtidos pelo ensaio de MTT, após a incubação das células K562 com derivados de tetraidropiranos, por 24 horas. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos em triplicata e foram obtidos usando curva de regressão não-linear.



Tetraidropirano	Ar	R	CI_{50} (μ M)	\pm Desvio Padrão
40a	C ₆ H ₅	OH	>100	
41a	C ₆ H ₅	::O	>100	
42a	C ₆ H ₅	::NNHCNH(NH ₂)	14,99	\pm 4,5
43a	C ₆ H ₅	:NHNHCNH(NH ₂)	42,79	\pm 4,8
44a	C ₆ H ₅	Br	>100	
45a	C ₆ H ₅	Cl	>100	
46a	C ₆ H ₅	Ts	>100	
47a	C ₆ H ₅	Ms	>100	
48a	C ₆ H ₅	Adenina	>100	
49a	C ₆ H ₅	COAro-OCOCH ₃	>100	
50a	C ₆ H ₅	THP	>100	
40b	p-(F)C ₆ H ₄	OH	>100	
41b	p-(F)C ₆ H ₄	::O	>100	
42b	p-(F)C ₆ H ₄	::NNHCNH(NH ₂)	8,97	\pm 4,0
43b	p-(F)C ₆ H ₄	:NHNHCNH(NH ₂)	58,81	\pm 4,1
44b	p-(F)C ₆ H ₄	Br	>100	
45b	p-(F)C ₆ H ₄	Cl	>100	
46b	p-(F)C ₆ H ₄	Ts	>100	
47b	p-(F)C ₆ H ₄	Ms	>100	
48b	p-(F)C ₆ H ₄	Adenina	>100	
49b	p-(F)C ₆ H ₄	COAro-OCOCH ₃	>100	
50b	p-(F)C ₆ H ₄	THP	>100	
40c	2-C ₁₀ H ₇	OH	>100	
41c	2-C ₁₀ H ₇	::O	>100	
42c	2-C ₁₀ H ₇	::NNHCNH(NH ₂)	7,59	\pm 4,9
43c	2-C ₁₀ H ₇	:NHNHCNH(NH ₂)	15,50	\pm 5,1
44c	2-C ₁₀ H ₇	Br	>100	
45c	2-C ₁₀ H ₇	Cl	>100	
46c	2-C ₁₀ H ₇	Ts	>100	
47c	2-C ₁₀ H ₇	Ms	>100	
48c	2-C ₁₀ H ₇	Adenina	>100	
49c	2-C ₁₀ H ₇	COAro-OCOCH ₃	>100	
50c	2-C ₁₀ H ₇	THP	>100	

A atividade anticâncer dos compostos bioativos foi avaliada, em distintas células cancerígenas humanas (K562, HL-60, HT-29, MCF-7). Os valores de CI_{50} foram expressos nas tabelas 7 e 8, para o período de 24 e 72 horas, respectivamente. Observou-se um amplo espectro de ação dos DNTs bioativos e um efeito independente de tempo. A linhagem de leucemia mieloide crônica (K562) foi a mais sensível ao efeito dos DNTs, porém apresenta valores de CI_{50} semelhantes aos valores obtidos para linhagem HL-60 e HT-29, sendo a linhagem de câncer de adenocarcinoma humano de mama (MCF-7) a mais resistente.

Tabela 7: Os valores da CI_{50} obtidos pelo ensaio de MTT, após a incubação das células cancerígenas HL-60, K562, HT-29, MCF-7 com derivados do núcleo tetraidropiranos, por 24 horas. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos em triplicata e foram obtidos usando curva de regressão não-linear.

Célula Compostos	HL-60	K562	HT-29	MCF-7
	42a	16,06 \pm 4,7	13,62 \pm 4,5	15,98 \pm 3,7
43a	42,03 \pm 4,4	44,73 \pm 4,8	46,95 \pm 4,2	> 100
42b	12,54 \pm 4,5	8,97 \pm 4,1	11,27 \pm 4,0	31,74 \pm 4,7
43b	85,44 \pm 5,2	58,81 \pm 4,1	59,59 \pm 4,3	126,9 \pm 4,3
42c	9,29 \pm 4,6	7,59 \pm 4,9	7,37 \pm 4,7	16,70 \pm 5,2
43c	35,35 \pm 5,2	15,50 \pm 5,1	25,84 \pm 4,8	43,31 \pm 5,8
Etoposídeo	5,8 \pm 1,1	>50	*	*

*não testado

Tabela 8: Os valores da CI_{50} obtidos pelo ensaio de MTT, após a incubação das células cancerígenas HL-60, K562, HT-29, MCF-7 com derivados do núcleo tetraidropiranos, por 72 horas. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos em triplicata e foram obtidos usando curva de regressão não-linear.

Célula Compostos	24h		72h	
	PBMC	L929	PBMC	L929
42a	19,41 \pm 3,2	18,17 \pm 5,0	4,75 \pm 2,9	23,98 \pm 4,0
43a	51,56 \pm 3,0	65,82 \pm 4,7	11,45 \pm 2,7	46,99 \pm 4,5
42b	14,35 \pm 3,2	20,0 \pm 4,2	6,68 \pm 3,08	17,24 \pm 4,7
43b	72,73 \pm 3,4	72,27 \pm 3,9	12,53 \pm 2,8	79,43 \pm 3,8
42c	5,92 \pm 3,3	10,85 \pm 5,5	2,23 \pm 2,9	3,8 \pm 3,8
43c	20,80 \pm 3,5	39,77 \pm 5,5	7,53 \pm 3,4	16,88 \pm 4,15

O efeito citotóxico dos seis análogos bioativos foi avaliado em células não cancerígenas L929 e PBMC, após incubação por 24 e 72 horas. Os compostos apresentaram efeito sobre as células não cancerígenas (tabela 9) e o composto **42c** demonstrou um maior efeito citotóxico, inclusive quando comparado com o efeito nas linhagens cancerígenas.

Tabela 9: Os valores da CI_{50} obtidos pelo ensaio de MTT, após a incubação das células não cancerígenas PBMC e L929 com derivados de tetraidropiranos, por 24 horas e 72 horas. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos em triplicata e foram obtidos usando curva de regressão não-linear.

Célula	HL-60	K562	HT-29	MCF-7
Compostos				
42a	14,40 \pm 5,2	31,05 \pm 4,6	9,59 \pm 4,7	34,87 \pm 3,8
43a	41,36 \pm 5,8	71,39 \pm 5,0	19,97 \pm 3,9	47,24 \pm 3,5
42b	14,94 \pm 5,4	29,07 \pm 4,9	6,06 \pm 4,6	20,87 \pm 4,0
43b	66,49 \pm 5,3	> 100	36,94 \pm 3,0	42,91 \pm 4,1
42c	6,96 \pm 5,9	19,17 \pm 5,3	3,37 \pm 4,8	13,68 \pm 5,0
43c	25,39 \pm 5,3	43,59 \pm 5,6	11,82 \pm 4,3	24,14 \pm 3,5

A atividade citotóxica dos compostos **42b** e **43c**, considerados os mais promissores, também foi avaliada pelo ensaio de captação do vermelho neutro. As linhagens leucêmicas K562 e HL-60, escolhidas para dar continuidade aos estudos, foram incubados com os citados compostos por um período de 24 e 72 horas. Para a linhagem HL-60, não se observou efeito no período de 24 horas, enquanto para a linhagem K562 os compostos demonstram um potente efeito citotóxico, corroborando com os resultados vistos no ensaio de MTT (tabela 10).

Tabela 10: Os valores da CI_{50} obtidos pelo ensaio de CVN, após a incubação das células cancerígenas HL-60, K562 com derivados de tetraidropiranos **42b** e **43c**, por um período de 24 e 72 horas. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos em triplicata e foram obtidos usando curva de regressão não-linear.

Células			
Compostos	Tempo	HL-60	K562
42b	24h	>100	16,15 \pm 5,1
	72h	73,11 \pm 3,5	12,65 \pm 4,2
43c	24h	>100	23,22 \pm 5,3
	72h	85,61 \pm 4,5	65,86 \pm 5,0

A atividade antileucêmica dos análogos **42b** e **43c** foi observada em cultura primária de sangue periférico e medula óssea de pacientes com leucemia mieloide crônica. Constatou-se um potente efeito citotóxico (tabela 11), corroborando com os resultados obtidos na linhagem imortalizada referente a mesma patologia. Mostrou-se que o efeito foi mais expressivo com o maior tempo de exposição do composto para um dos pacientes, tanto para células isoladas do sangue periférico, quanto para células isoladas da medula óssea.

Tabela 11: Os valores da CI_{50} obtidos pelo ensaio de MTT, após a incubação da cultura primária de células de pacientes com leucemia mieloide crônica com derivados de tetraidropiranos, por 24 horas e 72 horas. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos em triplicata e foram obtidos usando curva de regressão não-linear.

Células				
Compostos	Tempo	PBMC/LMC	PBMC/LMC	MO/LMC
42b	24h	7,58 \pm 2,4	21,71 \pm 5,2	12,42 \pm 4,3
	72h	14,83 \pm 2,5	20,94 \pm 6,7	5,14 \pm 4,9
43c	24h	14,60 \pm 3,4	35,69 \pm 6,2	20,67 \pm 5,2
	72h	18,67 \pm 2,70	23,68 \pm 7,1	11,43 \pm 5,2
Etoposídeo	24h	*	7,85 \pm 2,64	15,69 \pm 4,31

*não testado

4.2. Avaliação do tipo de morte celular

Os efeitos farmacológicos resultam da interação do ligante com os componentes macromoleculares do organismo, alterando a função do componente celular, iniciando assim as alterações bioquímicas e fisiológicas características da resposta da molécula. Os fármacos anticancerígenos comumente reduzem a proliferação celular, causando na maioria das vezes morte das células cancerígenas (BARREIRO et al, 2008).

Os ensaios de análise das características de morte celular foram realizados com o auxílio do citômetro de fluxo, usando programa Cell Quest para análise e leitura das amostras.

Avaliou-se o mecanismo de ação dos compostos mais promissores **42b** e **43c**, após um período de 24 horas de incubação. Para a linhagem K562, as concentrações utilizadas foram 2,25; 4,5 e 9 μ M para o composto **42b** e 4; 8 e 16 μ M para o composto **43c**. Já para a linhagem HL-60, as concentrações utilizadas foram 3,25; 6,5 e 13 μ M

para os análogos **42b** e **9**; 18 e 35 μM para os análogos **43c**. As concentrações máximas testadas equivalem às respectivas CI_{50} .

4.2.1. Determinação de características moleculares do tipo de morte celular induzida pelos DNT na linhagem de leucemia mieloide crônica – K562

4.2.1.1. Os DNTs alteram a distribuição do DNA no ciclo celular.

Danos no ciclo celular podem ser reparados por mecanismos específicos em cada uma das fases, permitindo a célula progredir no ciclo celular e dividir-se ou então, os mecanismos de reparo podem não ser efetivos e ativar mecanismos de morte. A progressão das células nas fases do ciclo celular foi avaliada por citometria de fluxo usando o IP.

O composto **42b** atuou de forma concentração-dependente, causando aumento significativo da fração hipodiplóide (Sub-G1) de $3,4 \pm 0,4$ (Figura 13A) para $17,8 \pm 2,2$ % (Figura 13D) e parada no ciclo celular, aumentando a concentração de DNA na fase G1 de $47,9 \pm 1,8$ (Figura 13A) para $63,1 \pm 3,3$ % (Figura 13D) e consequente redução do DNA nas fases seguintes, de $26,9 \pm 0,7$ para $19,4 \pm 1,5$ % na fase S e de $19,02 \pm 1,1$ para $2,3 \pm 1,3$ % na fase G2/M (figura 13).

O composto **43c** atuou de modo semelhante, aumentando de forma concentração-dependente a fração hipodiplóide de $3,4 \pm 0,4$ (figura 14A) para $19,1 \pm 5,6$ % (figura 14D) e causando parada na fase G1, com um aumento na concentração de DNA de $47,9 \pm 1,8$ (figura 14A) % para $59,9 \pm 3,5$ (figura 14D), e consequentemente reduzindo a concentração de DNA nas fases seguintes, de $26,9 \pm 0,7$ para $18,47 \pm 0,94$ % na fase S e de $19,02 \pm 1,1$ para $2,2 \pm 1,0$ % na fase G2/M (figura 14).

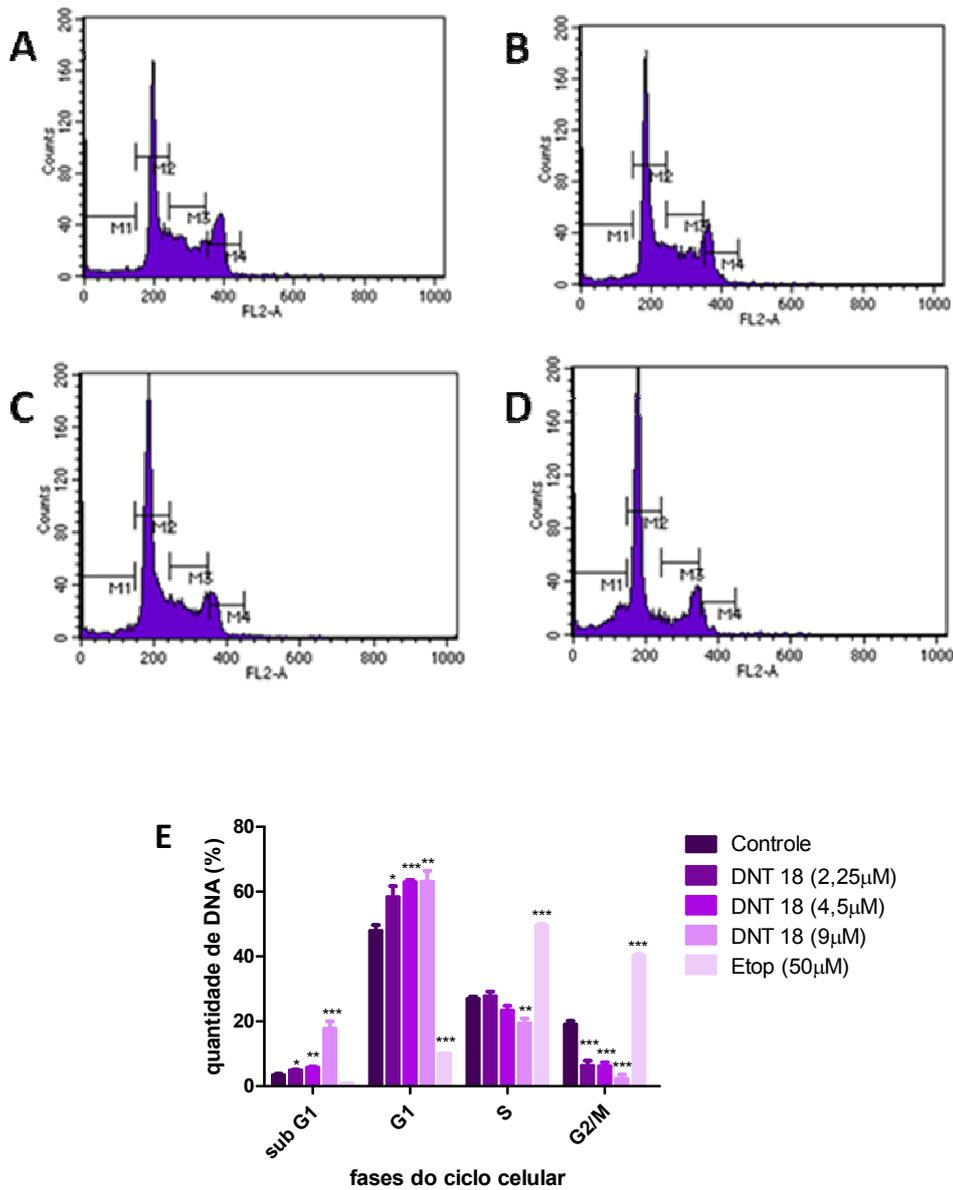


Figura 13: Efeitos de 42b sobre a progressão do ciclo celular em células K562, após 24 horas. A análise do ciclo celular foi quantificada por citometria de fluxo em FL2-A, dez mil eventos foram avaliados em cada experimento. Os gráficos representam o controle (A) e o resultado da exposição das células ao 42b por nas concentrações de 2,25 µM (B), 4,5 µM (C), 9 µM (D) e a fragmentação do DNA expressa no gráfico de barra (E). A área representada por M1, M2, M3 e M4 representam respectivamente sub-G1, G1, S e G2/M. Os dados são expressos como média ± desvio padrão de três experimentos em triplicata e foram analisados por ANOVA seguido de pós-teste Newman Keels. ***p<0,001, ** p<0,01 e * p<0,05 em relação ao controle.

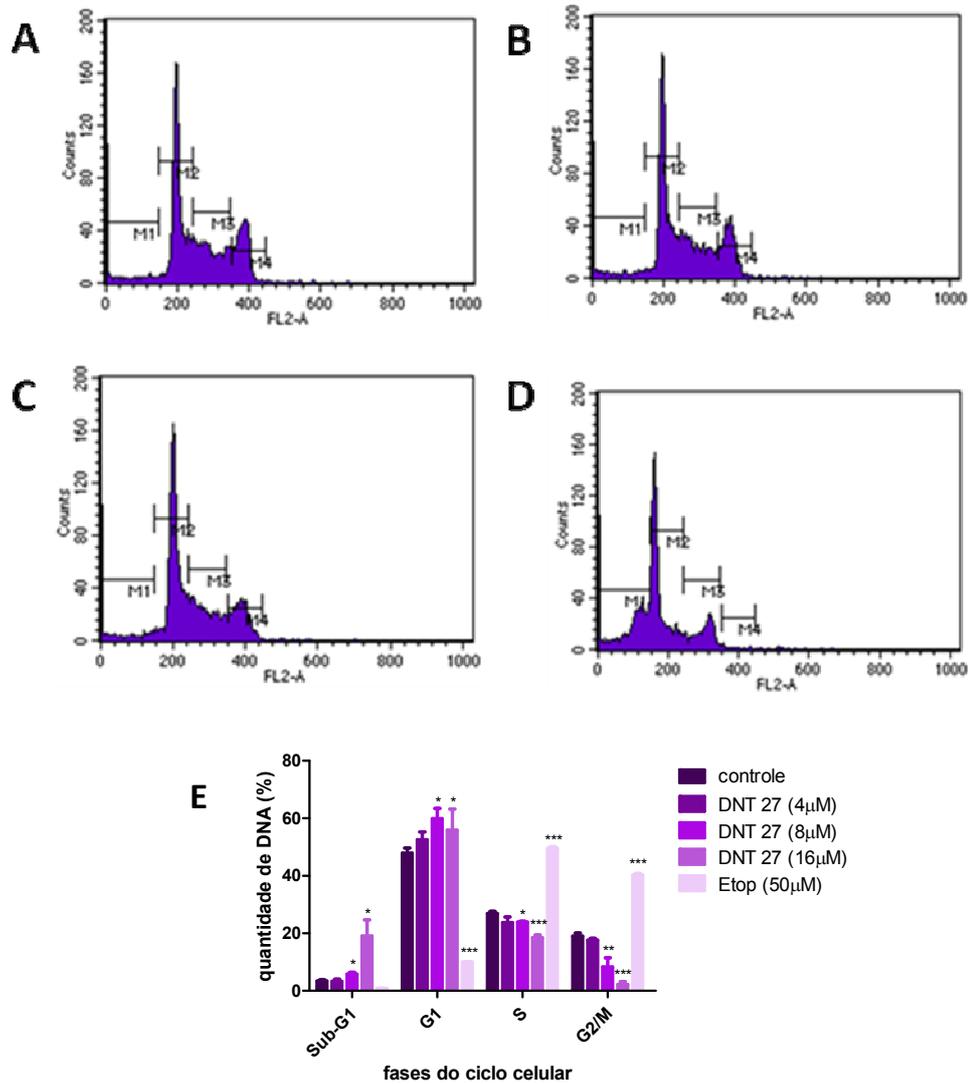


Figura 14: Efeitos de 43c sobre a progressão do ciclo celular em células K562, após 24 horas. A análise do ciclo celular foi quantificada por citometria de fluxo em FL2-A, dez mil eventos foram avaliados em cada experimento. Os gráficos representam o controle (A) e o resultado da exposição das células ao 43c por nas concentrações de 4 μM (B), 8 μM (C), 16 μM (D) e a fragmentação do DNA expressa no gráfico de barra (E). A área representada por M1, M2, M3 e M4 representam respectivamente sub-G1, G1, S e G2/M. Os dados são expressos como média ± desvio padrão de três experimentos em triplicata e foram analisados por ANOVA pós-teste newman keels. ***p<0,001, ** p<0,01 e * p<0,05 em relação ao controle.

4.2.1.2. Efeito dos DNTs no potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

A mitocôndria é uma organela essencial na bioenergética da célula, estando envolvida em processos de sinalização e crescimento celular e no mecanismo de morte celular por apoptose, assim foi avaliada a alteração no potencial transmembrânico

mitocondrial. Nos ensaios de determinação do potencial transmembrânico por citometria de fluxo, as células foram marcadas com tetrametilrodamina (TRMR), permitindo constatar a integridade das membranas mitocondriais por meio da alta emissão de fluorescência por células cuja membrana mitocondrial não foi danificada e a TRMR permaneceu concentrada no interior da organela. O composto **42b** e o composto **43c** não causaram danos na membrana mitcondrial (figura 15).

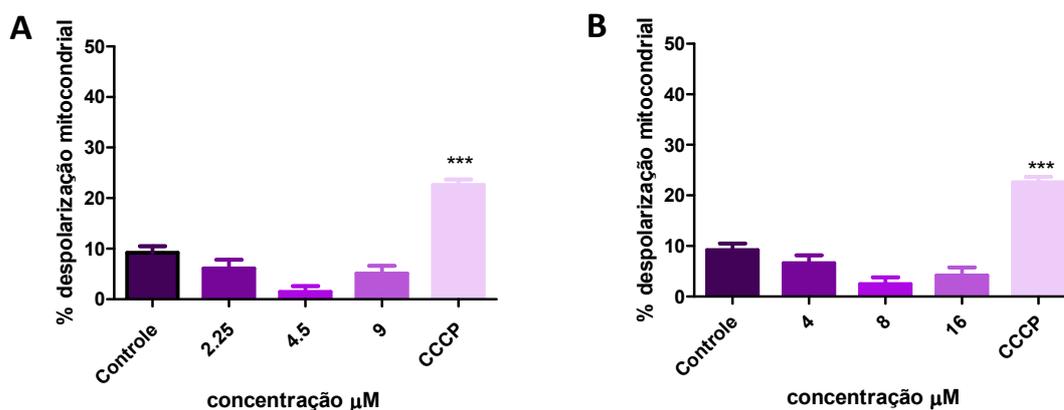


Figura 15: Avaliação da despolarização mitocondrial de células K562 tratadas com 42b (A) e 43c (B) por um período de 24 h. Dez mil eventos foram avaliados em cada experimento. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de dois experimentos em duplicata e foram analisados por ANOVA seguido do pós-teste Newman-keuls. * $p < 0,001$ em relação ao controle.**

4.2.1.3. Avaliação da produção de EROs induzida por DNTs

As EROs atuam como moléculas sinalizadoras que medeiam o crescimento celular, migração e diferenciação enquanto que em maiores concentrações, podem induzir morte celular (CASTRO et al, 2013). Para avaliar a produção de EROs por citometria de fluxo, utilizamos a sonda H_2DCFDA que será oxidada na presença de EROs em um produto fluorescente. Corroborando com os resultados precedentes, observamos que os compostos DNTs não aumentaram a produção de EROs na linhagem K562 (figura 16).

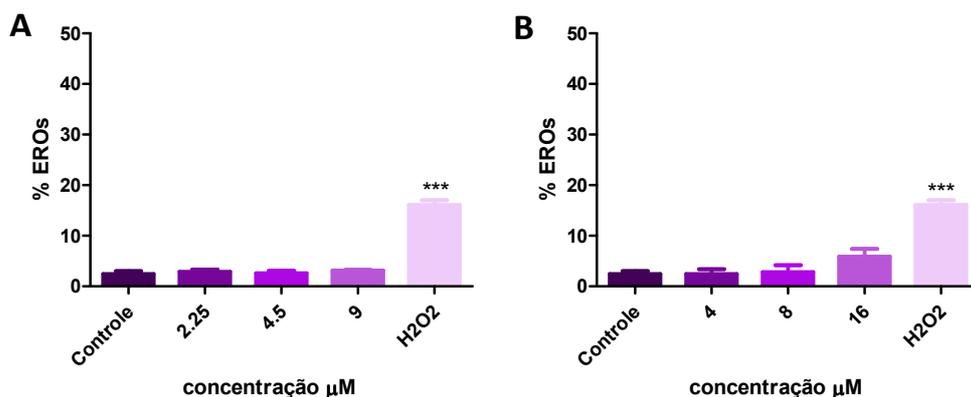


Figura 16: Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por células K562 tratadas com 42b (A) e 43c (B) por um período de 24 h. Dez mil eventos foram avaliados em cada experimento. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de dois experimentos em duplicata e foram analisados por ANOVA seguido do pós-teste Newman-keuls. * $p < 0,001$ em relação ao controle.**

4.2.1.4. Efeito dos DNTs na externalização de fosfatidilserina

A dupla marcação anexina V/IP permite, por citometria de fluxo, distinguir células viáveis, células em apoptose e células necrose. A fosfatidilserina interage com a anexina V, que está agrupada a um fluorocromo, enquanto o IP emite fluorescência ao interagir com o DNA, o que só acontece em células com a membrana celular danificada. O composto **42b** não causou alteração significativa na marcação na anexina e por IP (figura 17), enquanto o composto **43c** aumentou a fluorescência das células com IP de $4,0 \pm 1,6$ (figura 18A) para $20 \pm 0,3$ (figura 18D).

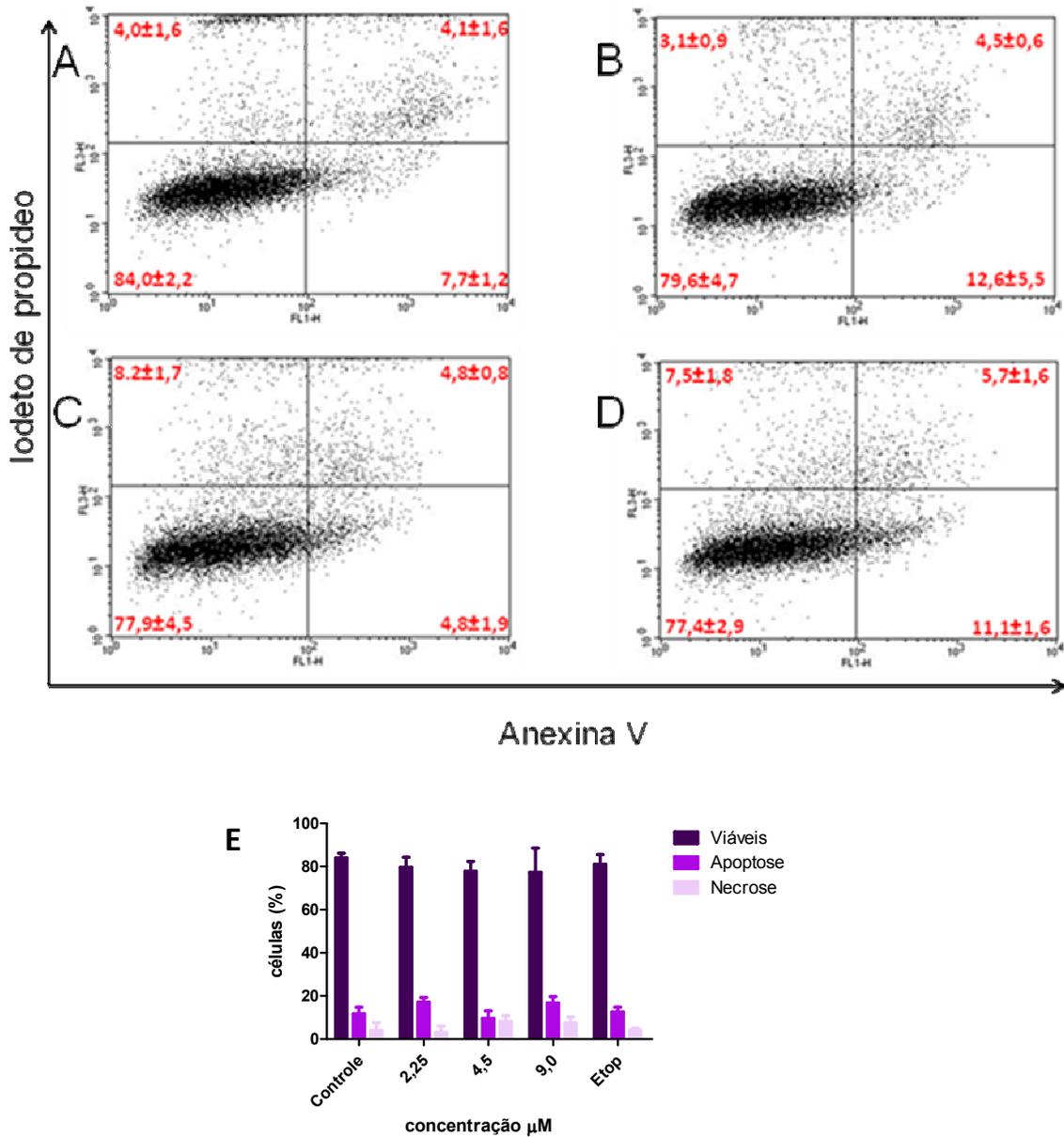


Figura 17: Efeito do composto 42b na linhagem K562 com dupla marcação Anexina/IP analisado por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento. Os gráficos representam o controle (A) e o resultado da exposição das células ao 42b por nas concentrações de 2,25 μM (B), 4,5 μM (C), 9 μM (D) e a análise estatística expressa no gráfico de barra (E). Os dados correspondem à média ± desvio padrão de dois experimentos em duplicata, analisados por ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls. *p<0,001 em relação ao controle.**

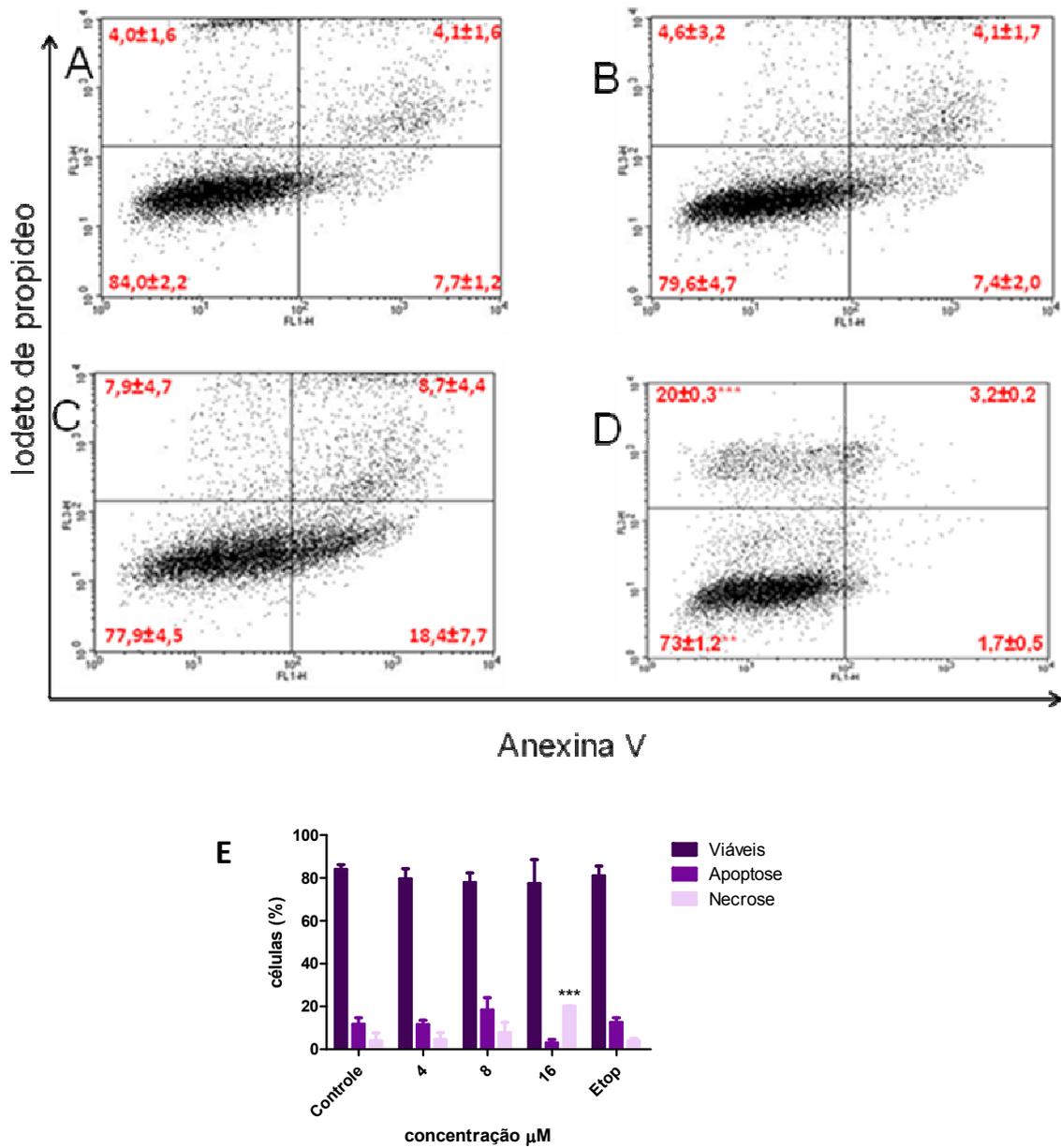


Figura 18: Efeito do composto 43c na linhagem K562 com dupla marcação Anexina/IP analisado por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento. Os gráficos representam o controle (A) e o resultado da exposição das células ao 43c por nas concentrações de 4 μM (B), 8 μM (C), 16 μM (D) e a análise estatística expressa no gráfico de barra (E). Os dados correspondem à média ± desvio padrão de dois experimentos em duplicata, analisados por ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls. *p<0,001 em relação ao controle.**

4.2.2. Determinação de características moleculares do tipo de morte celular induzida pelos DNT na linhagem de leucemia mieloide aguda – HL-60

4.2.2.1. Os DNTs alteram a distribuição do DNA no ciclo celular

A intensidade da fluorescência de IP será equivalente a quantidade de DNA, quando se induz o rompimento da membrana e o IP liga-se ao DNA celular, assim irá observar a quantidade de células em cada fase do ciclo celular. Os análogos **42b** e **43c** aumentaram de forma significativa a fração hipodiplóide, aumentando respectivamente a concentração de DNA de $5,2 \pm 1,3$ (figura 19A e 20A) para $26,4 \pm 3,4\%$ (figura 19D) e para $20,3 \pm 1,2\%$ (figura 20D), conseqüentemente reduzindo a quantidade de DNA nas fases subsequentes (figura 19E e 20E).

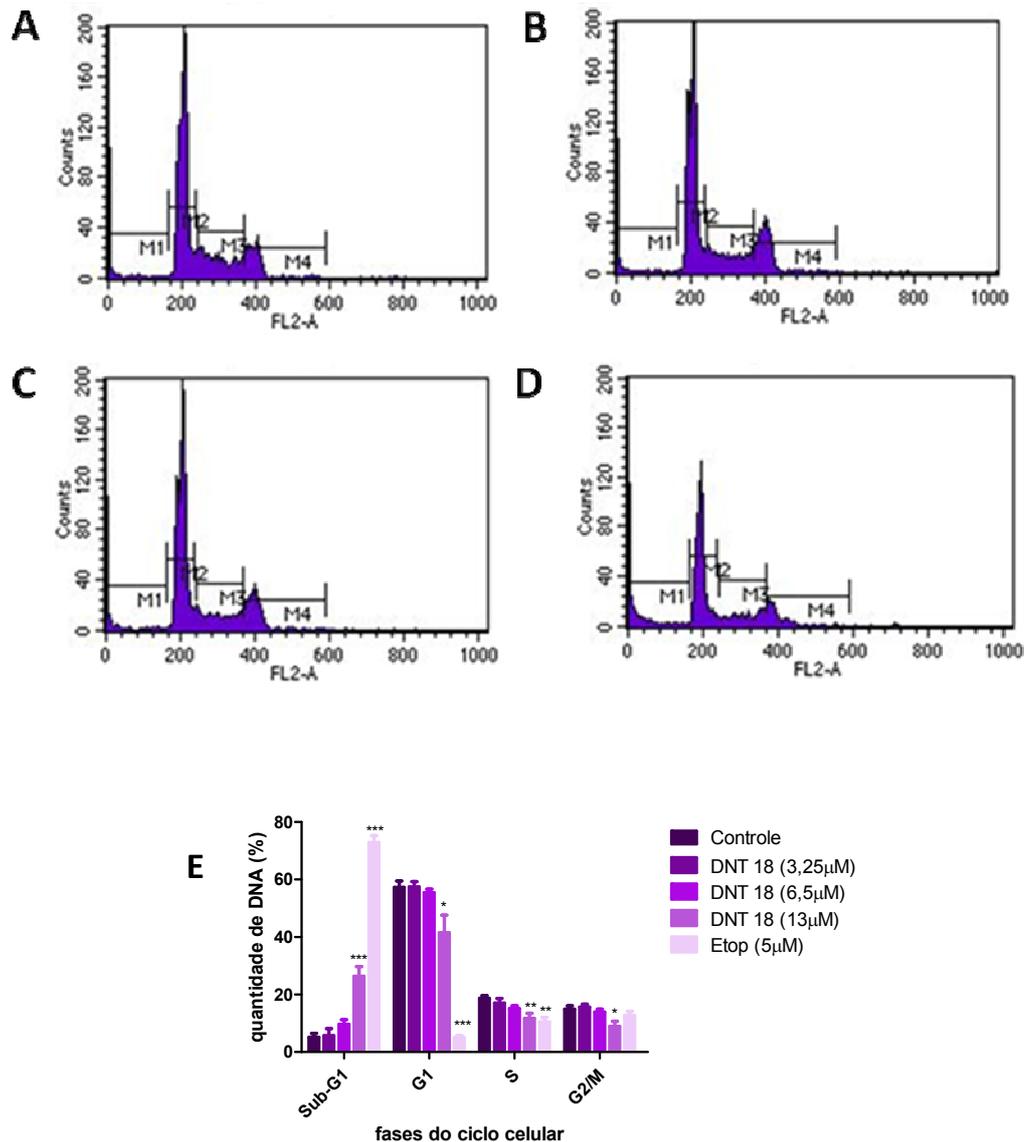


Figura 19: Efeitos de 42b sobre a progressão do ciclo celular em células HL-60, após 24 horas. A análise do ciclo celular foi quantificada por citometria de fluxo em FL2-A, dez mil eventos foram avaliados em cada experimento. Os gráficos representam o controle (A) e o resultado da exposição das células ao 42b por nas concentrações de 3,25 µM (B), 6,5 µM (C), 13 µM (D) e a fragmentação do DNA expressa no gráfico de barra (E). A área representada por M1, M2, M3 e M4 representam respectivamente sub-G1, G1, S e G2/M. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos em triplicata e foram analisados pela ANOVA seguido do pós-teste newman keels. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ em relação ao controle.

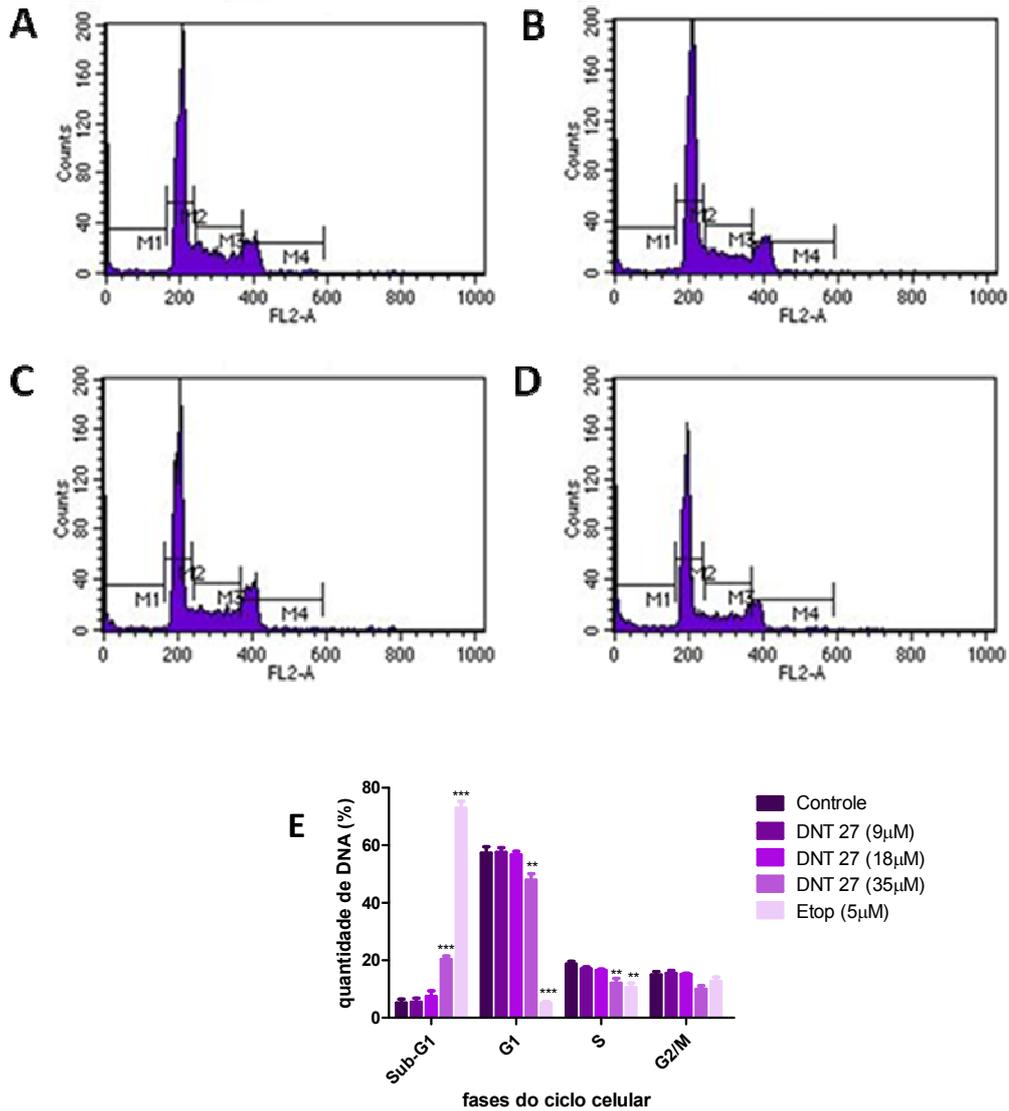


Figura 20: Efeitos de 43c sobre a progressão do ciclo celular em células K562, após 24 horas. A análise do ciclo celular foi medida quantificada por citometria de fluxo em FL2-A, dez mil eventos foram avaliados em cada experimento. Os gráficos representam o controle (A) e o resultado da exposição das células ao 43c por nas concentrações de 9 μM (B), 18 μM (C), 35 μM (D) e a fragmentação do DNA expressa no gráfico de barra (E). A área representada por M1, M2, M3 e M4 representam respectivamente sub-G1, G1, S e G2/M. Os dados são expressos como média ± desvio padrão de três experimentos em triplicata e foram analisados pelo newman keels. *p<0,001, ** p<0,01 e * p<0,05 em relação ao controle.**

4.2.2.2. Os DNTs induzem despolarização no potencial transmembrânico mitocondrial

A TRMR concentra-se no interior de mitocôndrias íntegras emitindo maior fluorescência. Os análogos **42b** e **43c** alteraram o potencial transmembrânico mitocondrial, induzindo respectivamente uma despolarização de $7,68 \pm 0,9$ para $16,95 \pm 1,2\%$ (Figura 21A) e para $46,38 \pm 8,0\%$ (figura 21B).

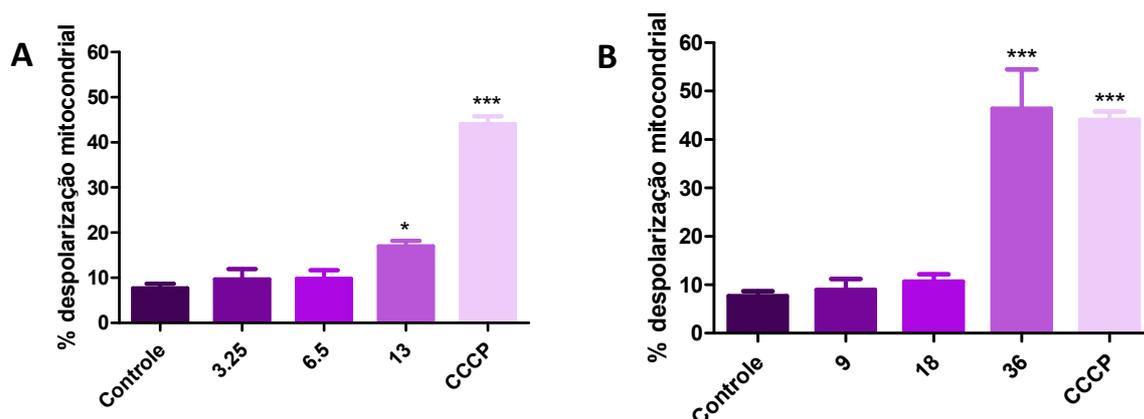


Figura 21: Avaliação da despolarização mitocondrial de células HL-60 tratadas com 42b (A) e 43c (B) por um período de 24 h. Dez mil eventos foram avaliados em cada experimento. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de dois experimentos em duplicata e foram analisados por ANOVA seguido do pós-teste Newman-keuls * $p < 0,001$ e * $p < 0,05$ em relação ao controle.**

4.2.2.3. Os DNTs estimulam a produção de EROs

A fim de avaliar a produção de EROs, a sonda H_2DCFDA foi utilizada e oxidada na presença de EROs em um produto fluorescente. O composto **42b** não aumentou a produção de EROs (figura 22A), enquanto o composto **43c** aumentou significativamente a produção de EROs de $2,61 \pm 0,3$ para $32,06 \pm 6,7\%$ (figura 22B).

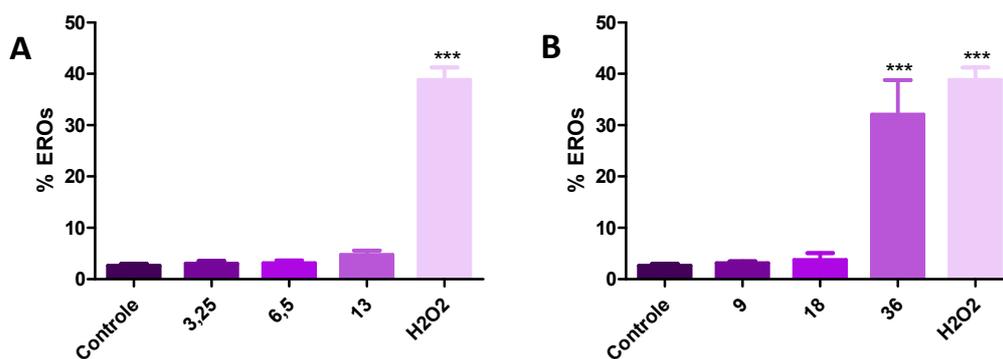


Figura 22: Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por células HL-60 tratadas com 42b (A) e 43c (B) por um período de 24 h. Dez mil eventos foram avaliados em cada experimento. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de dois experimentos em duplicata e foram analisados por ANOVA seguido do pós-teste Newman-keuls * $p < 0,001$ em relação ao controle.**

4.2.2.4. Efeito dos DNTs na externalização da fosfatidilserina

Como já descrito, a dupla marcação anexina V/IP permite distinguir características de células viáveis, células em apoptose e células em necrose. Para a linhagem HL-60, observou-se que os compostos DNTs são capazes de induzir apoptose. O composto **42b** aumentou a dupla marcação anexina/IP de $2,4 \pm 0,7$ (figura 23A) para $14,7 \pm 4\%$ de apoptose (figura 23D) e o composto **43c** também aumentou a dupla marcação de $2,4 \pm 0,7$ (figura 24A) para $63,1 \pm 13\%$ (figura 24D). Corroborando com os resultados anteriores.

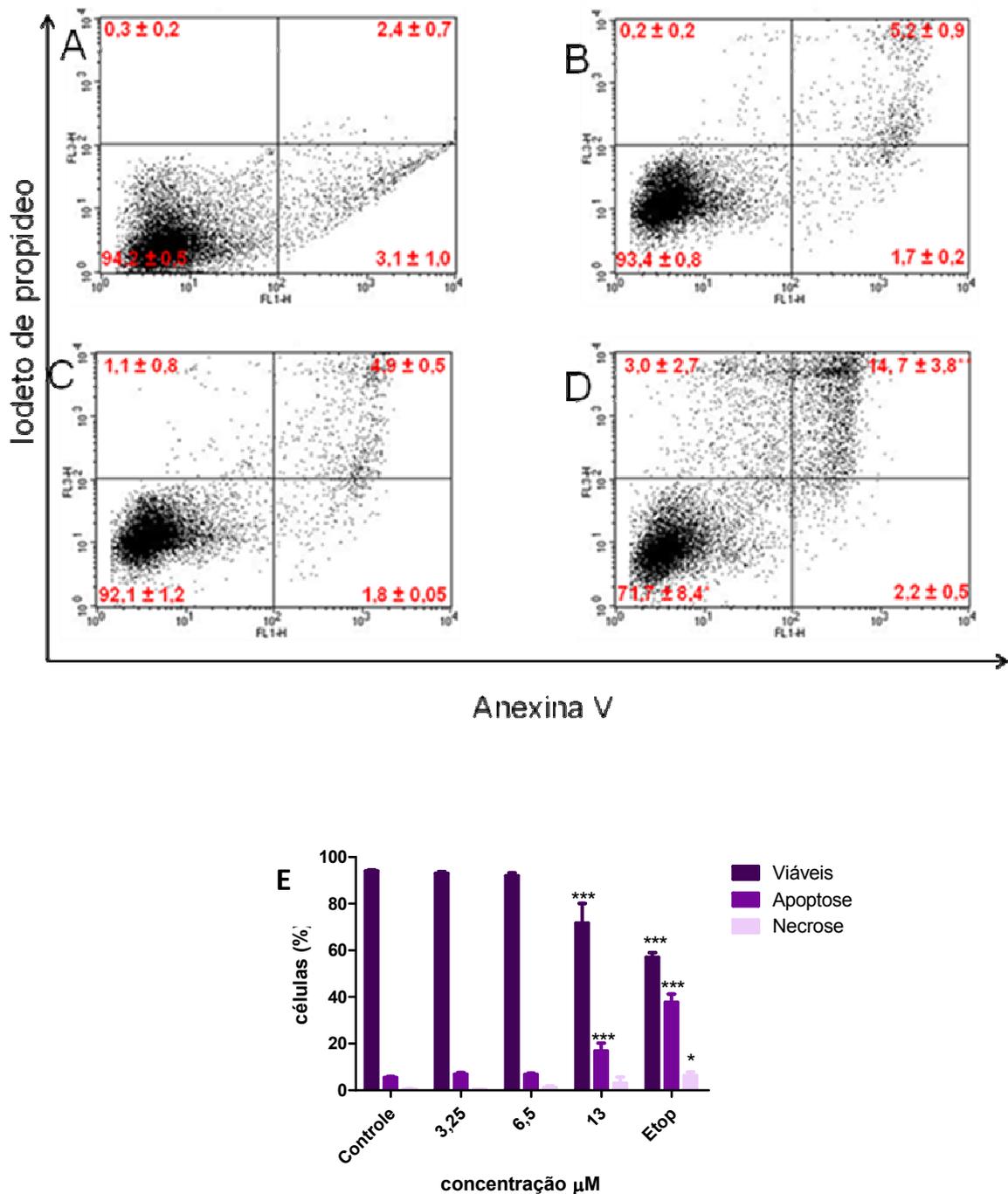


Figura 23: Efeito do composto 42b na linhagem HL-60 com dupla marcação Anexina/IP analisado por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento. Os gráficos representam o controle (A) e o resultado da exposição das células ao 42b por nas concentrações de 3,25 μM (B), 6,5 μM (C), 13 μM (D) e a análise estatística expressa no gráfico de barra (E). Os dados correspondem à média ± desvio padrão de dois experimentos em duplicata, analisados por ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls. *p<0,001; *p<0,01 em relação ao controle.**

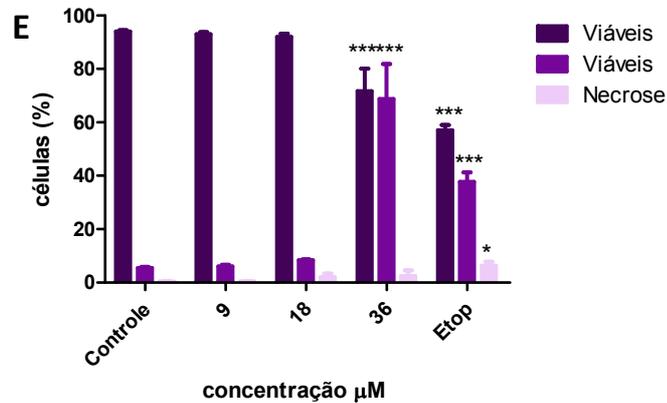
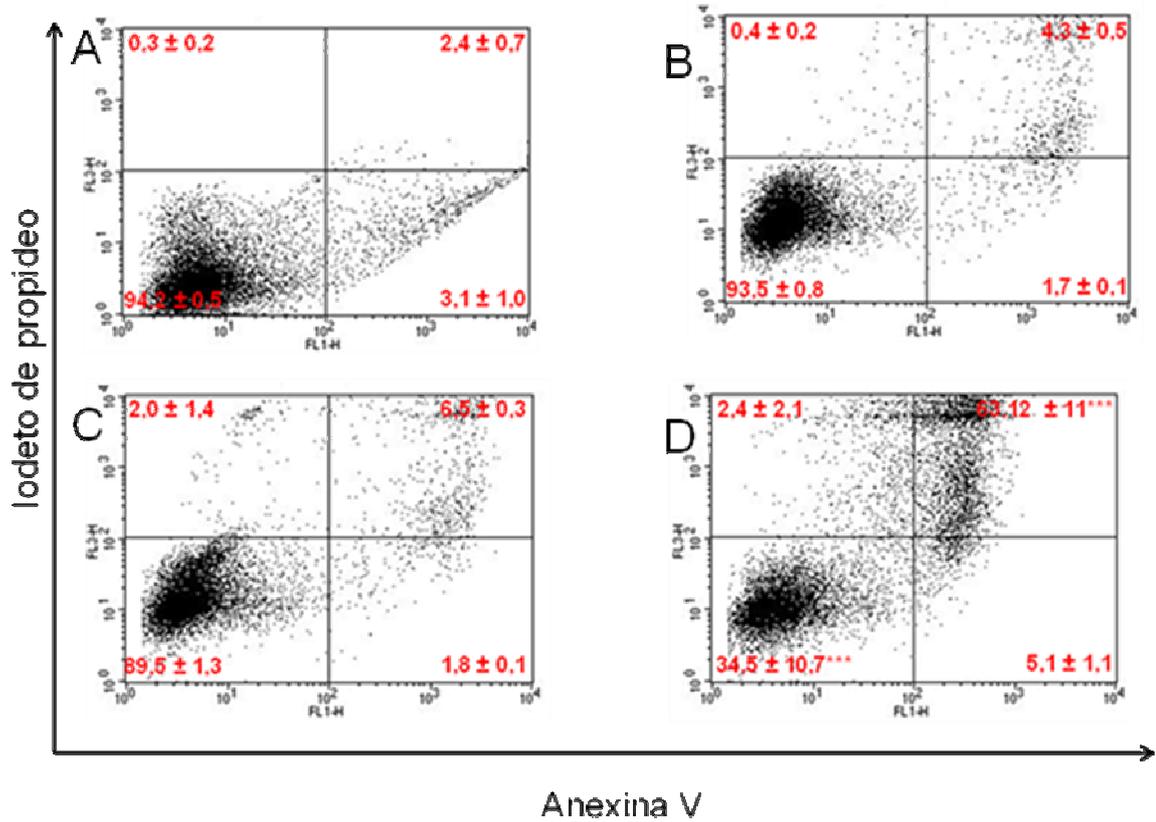


Figura 24: Efeito do composto 43c na linhagem HL-60 com dupla marcação Anexina/IP analisado por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento. Os gráficos representam o controle (A) e o resultado da exposição das células ao 43c por nas concentrações de 9 μM (B), 18 μM (C), 36 μM (D) e a análise estatística expressa no gráfico de barra (E). Os dados correspondem à média ± desvio padrão de dois experimentos em duplicata, analisados por ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls. *p<0,001; *p<0,01 em relação ao controle.**

Discussão

5. Discussão

As elevadas taxas de incidência e mortalidade por câncer é um grande problema de saúde pública, sendo assim necessário esforços na busca de terapias mais eficientes. As células cancerígenas são alvo de rápidas transformações que conduzem à seleção e crescimento de células com habilidades específicas e resistência a quimioterápicos, cujos usos terapêuticos são muitas vezes dificultados pelo desenvolvimento de mecanismo de resistência a múltiplas drogas e a mielossupressão, pelas células cancerígenas, assim como pela citotoxicidade em relação a células normais. Por isso, muitos esforços têm sido feitos para aumentar a seletividade terapêutica aos tecidos e células cancerígenas, e para o desenvolvimento de novos padrões estruturais, a fim de superar os problemas acima mencionados, melhorando a atividade anticâncer (AL-TEL, 2010; PEDRAM et al, 2008; CHARI, 2008).

Os produtos naturais podem ser vistos como estruturas complexas e biologicamente privilegiadas por exercer funções altamente especializadas (SAKLANI e KUTTY, 2008). No entanto, devido à sua complexidade estrutural, este pode levar a fontes comerciais limitados e dificultar o suprimento para estudos de mecanismo de ação e de desenvolvimento clínico (MAGEDOV et al, 2008; ICHIKAWA et al, 2007). Por esta razão, a síntese estereosseletiva de produtos naturais é uma ferramenta poderosa e altamente produtiva para o desenvolvimento de novas moléculas biologicamente ativas (AL-TEL, 2010; NEWMAN, 2008). Para identificar novas substâncias químicas para tratamentos mais eficazes, a química medicinal pode utilizar muitas estratégias, mas a decisão crucial é a seleção de um elo promissor tanto para a síntese quanto para o efeito biológico. Para a química, é interessante o uso de novas estratégias sintéticas econômicas que conduzam a uma maior diversidade estrutural, com bons rendimentos e alta seletividade (TAN, GYLLENHAAL e SOEJARTO, 2006).

As briostatinas são compostos derivados do anel tetraidropirano e de origem marinha, apresenta estrutura complexa e bastante escassa, sendo naturalmente isoladas em baixos rendimentos, mesmo assim, estão atualmente em ensaios clínicos para o tratamento do câncer. Em 2008, Wender e colaboradores descreveram a primeira série de 12 análogos da briostatina, onde vários dos análogos exibiram uma atividade superior à molécula original, briostatina.

Em 2006, Miranda e colaboradores relataram a síntese de análogos de produtos marinhos que continham o esqueleto estrutural comum de 4-clorotetraidropiranos. As

atividades biológicas destes compostos foram testadas contra linhagens de células cancerígenas (A2780, SW1573, e WiDr), demonstrando um amplo efeito antitumoral. Dessa forma, podemos destacar a importância dos anéis do tipo tetraidropirano, presentes em inúmeros produtos naturais e de seus análogos bioativos.

Neste estudo, foi realizado um “screening” para avaliar o efeito citotóxico de trinta e um compostos derivados do núcleo tetraidropirano na linhagem leucêmica humana K562, pelo ensaio de MTT. A experimentação *in vitro* com cultivo celular é extremamente útil para analisar a resposta celular a novas drogas (CASTRO et al, 2013). O MTT é um teste relativamente rápido e econômico que tem sido bastante utilizado para avaliar a citotoxicidade de novos compostos.

Observou-se que apenas as hidrazonas **42a-c** e as aminoguanidinas **43a-c** demonstraram um potente efeito citotóxico na linhagem K562, com CI_{50} de $14,9 \pm 4,5$; $42,8 \pm 4,8$; $8,9 \pm 4,0$; $58,8 \pm 4,1$; $7,6 \pm 4,9$; $15,5 \pm 5,1$, respectivamente para **42a**, **42b**, **42c**, **43a**, **43b** e **43c** (tabela 6). A hidrazona **42c** que possui grupo naftil, foi o tetraidropirano que apresentou maior atividade da série congênere. A concordância entre esses seis compostos na inibição da proliferação de células cancerosas pode ser correlacionada com um mecanismo semelhante, relacionado com as características estruturais. Diferente dos demais compostos, os seis compostos ativos possuem, em comum, uma cadeia nitrogenada, $NHNHCNH(NH_2)$, que parece ser determinante para o efeito citotóxico, enquanto a variação na potência está relacionada com a modificação dos substituintes nos anéis aromáticos e a presença da dupla ligação.

Para avaliar o potente efeito anticâncer dos compostos **42a-c** e **43a-c**, avaliou-se a atividade destes análogos em distintas linhagens cancerígenas humanas (K562, HL-60; HT-29 e MCF-7). Observando que estes análogos possuem um amplo espectro de ação anticâncer, com um potente efeito citotóxico para todas as linhagens avaliadas. Tem sido observado um efeito bem semelhante para a linhagem K562, HL-60 e HT-29, porém a linhagem MCF-7 demonstrou menor sensibilidade aos compostos (tabelas 7 e 8).

Pode-se observar que as hidrazonas **42a-c** mostraram-se mais ativas que as suas respectivas aminoguanidinas **43a-c**, logo se conclui que a redução da dupla ligação ($C=N$) implicou em uma diminuição da atividade biológica. Os compostos **42a-c** foram pelo menos duas vezes mais potente do que os compostos **43a-c**. Os análogos de **42b** e **43b** tornou-se mais citotóxicos do que os análogos **42a** e **43a**, devido à adição do átomo de flúor na posição 4, no anel aromático. Os compostos **42c** e **43c** são ainda mais

potentes do que os outros análogos, provavelmente devido à presença de dois anéis naftil, o qual altera as propriedades físico-químicas, como por exemplo, a lipofilicidade. WANG e colaboradores (2009) também descreveram a importância da adição de radicais eletrofílicos, como o flúor e o naftil, no aumento da citotoxicidade.

Muitos estudos têm demonstrado o efeito citotóxico de moléculas de origem natural, com o núcleo tetraidropirano e seus análogos. Essas moléculas parecem ter um potente efeito anticâncer, inibindo a proliferação de várias linhagens cancerígenas (SKM-1, HL-60, MCF-7, A2780AD, OVCAR) com concentrações na faixa de nanomolar (GHOHS et al, 2012; VINTONYAK et al, 2008).

Dentre os problemas apresentados pelas terapias anticâncer, os efeitos colaterais decorrentes da baixa seletividade para as células cancerígenas representam um grande obstáculo na busca de terapias mais adequadas (CHARI, 2008). A fim de demonstrar uma possível seletividade dos análogos **42a-c** e **43a-c** para as células cancerígenas, a citotoxicidade destes compostos foi avaliada em células não cancerígenas (L929 e PBMC), por meio do ensaio do MTT. Os resultados mostraram baixa ou nenhuma seletividade dos análogos em relação às células cancerígenas *in vitro*. O composto **42c** foi o análogo mais citotóxico, inclusive apresentou maior citotoxicidade para as células não cancerígenas (tabela 9).

O efeito citotóxico pode se manifestar pela alteração de diversas funções e/ou estruturas celulares, assim o uso de um único método pode ser inadequado ou pouco sensível para caracterizar o efeito de um novo composto (SCHRÖTEROVÁ et al., 2009).

Nesse contexto, avaliou-se o efeito citotóxico dos compostos **42b** e **43c**, considerados os mais promissores, pelo ensaio de captação de vermelho neutro (CVN) nas linhagens leucêmicas. Para a linhagem K562, os resultados foram semelhantes aos obtidos pelo ensaio de MTT, obteve-se CI_{50} bem semelhantes, indicando o rompimento de estruturas lisossomais. Enquanto para a linhagem HL-60, a integridade lisossomal não parece ser tão comprometida, resultando em CI_{50} apenas para o tempo de exposição de 72 horas, resultado distinto do que o observado no ensaio de MTT (tabela 10). Sabe-se que no processo apoptótico, as organelas tendem a se manter íntegras, característica inversa da morte celular por necrose.

O efeito citotóxico dos análogos **42b** e **43c** também foi avaliado em cultura primária de células de sangue periférico e de medula óssea de paciente com leucemia, pelo ensaio de MTT. Os compostos demonstraram um potente efeito citotóxico, com

concentrações de CI_{50} semelhantes às concentrações obtidas no ensaio com culturas imortalizadas do mesmo tecido (tabela 11), dando relevância clínica aos nossos resultados.

As leucemias constituem um dos principais tipos de câncer que afetam a população brasileira (figura 2) e pertencem a um grupo de neoplasias malignas caracterizado pela proliferação descontrolada de células hematopoiéticas na medula óssea e/ou nos tecidos linfóides, que, posteriormente, atingem a circulação periférica e podem se infiltrar em outros sistemas orgânicos (SWERDLOW et al., 2008). Este tipo de câncer pode ser classificado como leucemia linfóide aguda (LLA) e leucemia linfóide crônica (LLC), quando se origina de células linfóides em estágio inicial de desenvolvimento ou em células maduras, respectivamente. As leucemias também podem ser classificadas em leucemia mieloide aguda (LMA) e leucemia mieloide crônica (LMC), quando afeta as células granulocíticas indiferenciadas ou maduras, respectivamente. Dentre outras neoplasias sanguíneas mais raras (WHO, 2009).

Para investigar as características moleculares associadas ao mecanismo de morte celular, por meio de fluoróchromos e com o uso de citometria de fluxo, escolhemos a linhagem de leucemia mieloide crônica (K562), uma linhagem que expressa a bomba de efluxo capaz de mover fármacos do meio intracelular para o meio extracelular, sendo um tipo celular mais resistente e a linhagem de leucemia mieloide aguda (HL-60), que é mais sensível.

A LMC é um câncer de células-tronco potencialmente fatal, que compreende cerca de 14% de todas as leucemias, sendo estimada em cerca de 1 a 2 casos por 100.000 indivíduos (SESSIONS et al, 2007; TEFFERI et al, 2005). A leucemia mieloide crônica é uma neoplasia maligna caracterizada pela presença do cromossomo Philadelphia (Ph), que consiste no resultado da translocação t (9:22), unindo o protoncogene C-ABL presente no cromossomo 9 à região BCR do cromossomo 22. Pacientes com leucemia mielóide crônica são altamente refratários ao tratamento. Considerando-se que o gene resultante BCR-ABL tem atividade anormal de tirosina quinase, que estimula o crescimento celular e é responsável pelo fenótipo transformado de células LCM (BACCARANI et al, 2009; MOD et al, 2007).

A LMA é uma neoplasia caracterizada por um acúmulo excessivo de precursores mielóides na medula óssea que perderam a capacidade de se diferenciar normalmente e de responder a reguladores normais de proliferação. Sendo mundialmente reportada em cerca de 4 casos a cada 100 mil habitantes, correspondendo a aproximadamente 20 %

dos casos totais de leucemias na população em geral (HEAD, 2004). Citogeneticamente são caracterizadas pela translocação cromossômica t(15;17), onde a presença da proteína de fusão PML (*promyelocytic leukaemia*) - RARA (*retinoic acid receptor- α*) é a única anormalidade genômica detectada na leucemia promielocítica aguda, responsável pelo potencial replicativo ilimitado e inibição da diferenciação terminal destas células (CHEN et al., 2010; DE THÉ; CHEN, 2010).

Para a linhagem K562, os parâmetros avaliados não foram suficientes para a determinação de um tipo de morte celular, mesmo diante do potente efeito citotóxico para esta linhagem. Os compostos não alteraram o potencial transmembrânico mitocondrial e nem estimularam a produção de EROs. As únicas alterações desencadeadas pelo composto **42b** e também pelo análogo **43c**, foi o aparecimento do pico sub-G1, indicando a presença de fração hipodiplóide de DNA, e a parada no ciclo celular na fase G1 (figuras 13 e 14). O composto **43c** apresentou ainda um aumento na marcação de IP, quando submetido ao ensaio de dupla marcação anexina/IP (figura 18). Apesar de não ter sido esclarecido o mecanismo de morte dos compostos **42b** e **43c** para a linhagem K562, verificou-se que o composto **43c** é mais potente.

A progressão do ciclo celular é um processo complexo que envolve inúmeras proteínas regulatórias. Ciclinas são reguladoras positivas da progressão do ciclo celular e coordena a função das cinases dependentes de ciclinas (CDKs). Um aumento na expressão de CDKs é observado na maioria das células cancerígenas, resultando em aumento da proliferação e/ou na supressão da morte celular (MISHRA, 2011; LIU et al, 2010; WEINBERG, 2008; GERL, VAUX, 2005). Por esta razão, bloquear o ciclo celular é considerado uma atividade estratégica para eliminar células cancerígenas.

Os efeitos tóxicos são responsáveis por ativar vias de sinalização que reduzam a velocidade de progressão do ciclo celular, com o intuito de favorecer a reparação do material lesado (BARTEK, LUKAS, 2007; HOUTGRAAF et al, 2006). Este tipo de resposta é denominada citostática e usualmente reversível (FRESHNEY, 2001). Porém, estes danos também podem ativar vias de sinalização que desencadeiam um mecanismo irreversível, eliminando a célula danificada (HOUTGRAAF et al, 2006). Assim, é necessário mais estudos para esclarecer o mecanismo de ação dos análogos **42b** e **43c** na linhagem K562, tendo em vista não apresentarem resultados positivos para as características moleculares apoptóticas ensaiadas. Muitos tipos de câncer apresentam mecanismos de resistência a apoptose, portanto compostos que envolvam outros

mecanismos de morte celular podem ser promissores (KREUZALER e WATSON, 2012).

Para a linhagem HL-60, os análogos **42b** e **43c** também demonstraram atuar por mecanismos semelhantes. Constatou-se a capacidade destes análogos danificarem o DNA. Para reconhecer a especificidade de fase do ciclo celular, utilizou-se o ensaio com o corante de iodeto de propídio (IP). Os compostos **42b** e **43c** induziram o aumento do DNA hipodiplóide (pico sub-G1) (tabelas 19 e 20), que vem sendo descrito como um indicador quantitativo da apoptose (MISHRA, KHULLAR, BHATIA, 2011).

Mitocôndrias são organelas cruciais para a ativação da via apoptótica intrínseca. Por isso, também foi avaliado o potencial transmembrânico mitocondrial com o uso do fluorocromo TRMR, que se acumula no interior de mitocôndrias íntegras. Demonstrou-se que os análogos **42b** e **43c** despolarizaram a membrana mitocondrial nas maiores concentrações testadas. O composto **42b** induz $16,95 \pm 1,2\%$ de despolarização e o composto **43c** induzem $46,38 \pm 8,0\%$ de despolarização (figura 21). Sabe-se que a despolarização mitocondrial é resultante do aumento da permeabilização da membrana mitocondrial externa, o que conseqüentemente resulta na liberação de fatores pró-apoptóticos, desencadeando a morte celular (WANG E YOULE, 2009). Assim, constou-se que a despolarização da membrana mitocondrial foi um evento crucial para a morte celular induzida pelos compostos **42b** e **43c**.

Outra característica avaliada, foi à capacidade dos compostos **42b** e **43c** estimularem a produção de EROs, para isso foi usado a sonda H₂DCFA, que é hidrolizada para permanecer no interior da célula e na presença de EROs emite fluorescência. Desta forma, constatamos que o composto **42b** não estimulou a produção de EROs na linhagem HL-60, enquanto o composto **43c** estimula a produção de $32 \pm 6,7\%$ de EROs na mesma linhagem (figura 22). As EROs são moléculas sinalizadoras que em altas concentrações causam danos em macromoléculas celulares (DNA, lípidos e proteínas), podendo resultar em alterações irreversíveis da viabilidade celular, que são funções essenciais para manutenção da homeostasia (CASTRO et al, 2013).

O composto **43c** demonstra ser mais ativo que o composto **42b** para os parâmetros analisado, podendo ser explicado, pelo menos em partes, por sua capacidade de induzir produção de EROs, o que está associado a maior despolarização mitocondrial induzida pelo composto **43c**.

Para confirmar a morte célula por apoptose, analisou-se a externalização da fosfatidilserina pelo ensaio de dupla marcação com anexina e IP (SCHAPER e

REUTELINGSPERGER, 2013). Os compostos **42b** e **43c** induziram a externalização da fosfatidilserina, tendo sido observado um aumento na marcação com anexina e IP, característico de apoptose tardia (figuras 23 e 24). Neste contexto, podemos afirmar que os compostos **42b** e **43c** induzem morte celular por apoptose, na linhagem HL-60. Ainda podemos sugerir a ativação da via apoptótica intrínseca, não podendo eliminar o envolvimento da via apoptótica extrínseca, tendo em vista que não foram realizados estudos para esta conclusão.

Os compostos **42b** e **43c** parecem atuar por mecanismos semelhantes, porém de forma linhagem-específica, tendo apresentado um potente efeito citotóxico e atividade antileucêmica. Tendo o composto **43c** demonstrado efeitos mais pronunciados. Ainda assim, vale ressaltar a necessidade de modificações estruturais que aumentem ou mantenha o potente efeito anticâncer, e que também aumente a seletividade para as células cancerígenas, gerando assim um composto promissor para posteriores estudos clínicas.

Conclusão

6. Conclusão

- ✓ Foram feitos ensaios de viabilidade celular incubando 31 compostos derivados do núcleo tetraidropirano e seis destes derivados (**42a-c** e **43a-c**) apresentaram um potente efeito citotóxico para as células cancerígenas: K562, HL-60, HT-29, MCF-7, PBMC/LMC e BMBMC/LMC;
- ✓ Os compostos analisados, **42a-c** e **43a-c**, foram citotóxicos para as células não cancerígenas, porém apenas o composto **43b** apresentou uma maior citotoxicidade para as células não cancerígenas em relação às células cancerígenas;
- ✓ Os compostos **42b** e **43c**, considerados os mais promissores, aumentaram a concentração de DNA hipodiplóide e induziram parada na fase G1 do ciclo celular da linhagem K562 e aumentaram a concentração de DNA hipodiplóide para a linhagem HL-60;
- ✓ Os compostos **42b** e **43c** não causaram despolarização do mitocondrial na linhagem K562, porém induziram despolarização mitocondrial na linhagem HL-60;
- ✓ Os compostos **42b** e **43c** não induziram a produção de EROs na linhagem K562, e apenas o composto **43c** estimulou a produção de EROs na linhagem HL-60.
- ✓ A morte celular induzida pelos compostos **42b** e **43c** na linhagem K562 não está totalmente esclarecido, havendo necessidade de mais estudos. Enquanto na linhagem HL-60 os citados compostos induziram apoptose pela via intrínseca.

Referências

Referências

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- ADAMS, J.M.; CORY, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. **Oncogene**, v. 26, 1324–1337, 2007.
- ALISON, M.R. Cancer. **ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES / & 2001 Nature Publishing Group / www.els.net**
- AL-TEL, T.H. Design and synthesis of novel tetrahydro-2H-Pyrano[3,2-c]Pyridazin-3(6H)-one derivatives as potential anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 5724-5731, 2010.
- AL-TEL, T. Design and synthesis of and qualitative structure-activity evaluations of novel hexahydropyrano [3,2-c][1,2]diazepin-3(4H)-one and tetrahydropiran [3,2-b]pyrrol-2(1H)-one derivates as anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.
- ASHKENAZI, A., HERBST, R.S. To kill a tumor cell: the potential of proapoptotic receptor agonists. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, p. 979–1990, 2008.
- BACCARANI M, CORTES J, PANE F, NIEDERWIESER, D.; SAGLIO, G.J. CERVANTES, A.; DEININGER, F.M.; GRATWOHL, A. GUILHOT, F. HOCHHAUS, A. HOROWITZ, M. HUGHES, T. KANTARJIAN, H. LARSON, R. RADICH, J. SIMONSSON, B.; SILVER, R.T.; GOLDMAN, J.; HEHLMANN, R. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European Leukemia. **Net. J Clin Oncol.**, v.27, n.35, p.6041-6051, 2009.
- BAEHRECKE EH. Autophagy: dual roles in life and death? **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 6, p.505–510, 2005.
- BAEHRECKE EH. How death shapes life during development. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2002;3:779–787.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA C. A. M. **Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. 2^a edição. Artmed Editora, 2008.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. A questão da inovação em fármacos no Brasil: proposta de criação do programa nacional de fármacos (PORN FAR). **Revista Química Nova**, v.28, suplemento S56-S63, 2005.
- BARREIRO, E.J.; A química medicinal e o paradigma do composto-protótipo. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 1, p. 26-34, 2009.

BORENFREUND, E.; BABICH, H.; MARTIN-ALGUACIL, N. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays – the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. **Toxicology in Vitro**, v. 2, n.1, p. 1 - 6, 1988.

BARTEK, J. LUKAS, J. DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. **Curr Opin Cell Biol.**, v. 19, p. 238-245, 2007.

Brasil. **Ministério da Saúde**. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, 2009.

BRECKENRIDGE, D.G. XUE, D. Regulation of mitochondrial membrane permeabilization by BCL-2 family proteins and caspases. **Current Opinion in Cell Biology**, v.16, p. 647–652, 2004.

BLASCO, M.A. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. **Nat. Rev. Genet.**, v. 6, p. 611–622, 2005.

BOYA, P.; GONZALEZ-POLO, R.A.; CASARES, N.; PERFETTINI, J.L.; DESSEN, P.; LAROCLETTE, N.; MÉTIVIER, D.; MELEY, D.; SOUQUERE, S.; YOSHIMORI, T.; PIERRON, G.; CODOGNO, P.; KROEMER, G. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. **Mol Cell Biol**, v.25, p. 1025–1040, 2005.

BURKHART, D.L.; SAGE, J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. **Nat. Rev. Cancer**, v. 8, 671–682, 2008.

CASTEDO M, PERFETTINI JL, ROUMIER T, ANDREAU K, MEDEMA R, KROEMER G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. **Oncogene**, v. 23, p. 2825-837, 2004.

CASTRO, J.J.; MÉNDEZ, J.P.; CORAL-VÁZQUEZ, R.M.; SORIANO-URSÚA, M.A.; DAMIAN-MATSUMURA, P.; BENÍTEZ-GRANADOS, J.; ROSAS-VARGAS, H.; CANTO, P. In vitro and molecular modeling analysis of two mutant desert hedgehog proteins associated with 46,XY gonadal dysgenesis. **DNA Cell Biol.**, v. 32, n.9, p. 524-530, 2013.

CAMPSI, J. Aging, cellular senescence, and cancer. **Annu Rev Physiol.**, v.75, p. 685-705, 2013.

COHEN, G.M. Caspases: the executioners of apoptosis. **Biochemical Journal**. v. 326, p.1-16,1997.

CHARI, R. V.Targeted cancer therapy: conferring specificity to cytotoxic drugs. **Acc Chem Res.**,v. 41, n. 1, p. 98 - 107, 2008.

CHEN, J.; ODENIKE, O.; ROWLEY, J. D. Leukaemogenesis: more than mutant genes. **Nat Rev Cancer.**, v. 10, n. 1, p. 23 - 36, 2010.

CHENG, N.; CHYTIL, A.; SHYR, Y.; JOLY, A.; MOSES, H.L. Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in

mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. **Mol. Cancer Res.** 6, 1521–1533. (2008).

CHO, Y.; CHALLA, S.; MOQUIN, D.; GENGA, R.; RAY, T.D.; GUILDFORD, M.; CHAN, F.K. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. **Cell**, v. 137, p. 1112 - 1123, 2009.

CHU, I. Alternative methods to animal testing: a Canadian health protection branch perspective. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 23, p. 257 - 261, 1995.

CURTO, M.; COLE, B.K.; LALLEMAND, D.; LIU, C.H.; MCCLATCHEY, A.I. Contact-dependent inhibition of EGFR signaling by Nf2/Merlin. **J. Cell Biol.**, v. 177, p. 893–903, 2007.

CLARKE, P. TYLER, K.L. Apoptosis in animal models of virus-induced disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, p. 144-155, 2009.

DAGUANO, J.K.M.F.; SANTOS, C.; ROGERO, S.O. Avaliação da citotoxicidade de biocerâmicas desenvolvidas para uso em sistemas de implantes. **Rev. Matéria**, v. 12, n. 1, p. 134-139, 2007.

DE BACKER, I.C., VAN BREDA, E., VREUGDENHIL, A. highintensity strength training improves quality of life in cancer survivors. **Acta Oncol.**, v. 46, n.8, p. 1143-1155, 2007.

DE THÉ, H.; CHEN, Z. Acute promyelocytic leukaemia: novel insights into the mechanisms of cure. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 11, p. 775- 783, 2010.

DE ALMEIDA, V. L., LEITÃO, A., REINA, L. C. B., MONTANARI, C. A., DONNICI, C. L., LOPEZ, M. T. P., Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos e Ciclo-Celular Não Específicos Que Interagem Como DNA: Uma Introdução, **Química Nova**, v.28, p.118-129, 2005.

DRULLION, C.; TRÉGOAT, C.; LAGARDE, V.; TAN, S.; GIOIA, R.; PRIAULT, M.; DJAVAHERI-MERGNY, M.; BRISSON, A.; AUBERGER, P.; MAHON, F.X.; PASQUET, J.M. Apoptosis and autophagy have opposite roles on imatinib-induced K562 leukemia cell senescence. **Cell Death Dis.**, v. 16; n. 3, p. 373, 2012.

EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B. J.; BOOBIS, A.; CARERE, A.; KEVEKORDS, S.; LHUGUENOT, J. C.; PIETERS, R. Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**. v. 40, p. 193-236, 2002.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicology Pathology**. v. 35, p. 495-516, 2007.

EL-AZAB, A.S.; AL-OMAR, M.A.; ABDEL-AZIZ, A.M.; NAGLA, I.A.; MAGDA, A.A.E.; ALEISA, ABDULAZIZ, SAMI G.A. Design, synthesis and biological

evaluation of novel quinazoline derivatives as potential antitumor agents: molecular docking study. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.45, p. 4188-4199, 2010

ENARI, M.; SAKAHIRA, H.; YOKOYAMA, H.; OKAWA, K.; IWAMATSU, A.; NAGATA, S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. **Nature**. v. 391, p. 43-50, 1998.

ERIC, S.; KE, S.; BARATA, T.; SOLMAJER, T.; STANKOVIE, J.A.; JURANIC, Z.; SAVIC, V.; ZLOH. Target fishing and docking studies of the novel derivatives of aryl-aminopyridines with potential anticancer activity. **Biorganic e Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 5220-5228, 2012.

FAHINA-MARTINS, G.F.; DA SILVEIRA, A.L.; CAVALCANTI, B.C.; RAMOS, M.V.; MORAES, M.O.; PESSOA, C.; ARAÚJO, D.A. Antiproliferative effects of lectins from *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* in human leukemia cell lines. **Toxicol In Vitro**, v. 26, n. 7, p.1161-1169, 2012.

FREDÉRIC, L.W.V.J. S.; REUTELINGSPERGER, C.P. ^{99m}Tc-HYNIC-Annexin A5 in Oncology: Evaluating Efficacy of Anti-Cancer Therapies. **Cancers**, v. 5, p. 550-568, 2013.

FRESHNEY, I. Application of Cell Cultures to Toxicology. **Cell Biology and Toxicology**; v.17, p.213-230, 2001.

GALES, D.; CLARK, C.; MANNE, U.; SAMUEL, T. The Chemokine CXCL8 in Carcinogenesis and Drug Response. **Oncology**, v. 2013, 8 p., 2013.

GHAVANI, S.; HASEHMI, M.; ANDE S.R. et al. Apoptosis and cancer: mutations within caspase gene. **J. Med. Genet.**, v. 46, p. 497-510, 2009.

GERL, R.; VAUX, D.L. Apoptosis in the development and treatment of cancer. **Carconogenesis**. v. 26, p. 263-270, 2005.

GILLINGS, A.S., BALMANN, K., WIGGINS, C.M., JOHNSON, M., COOK, S.J., Apoptosis and autophagy: BIM as a mediator of tumour cell death in response to oncogenetargeted therapeutics. **The FEBS Journal**, n. 276, p. 6050–6062, 2009.

GHOSH, A.K. CHENG, X.; BAI, RUOLI HAMEL, E. Total Synthesis of Potent Antitumor Macrolide, (-)-Zampanolide: An Oxidative Intramolecular Cyclization-Based Strategy **European J Org Chem.**, v. 2012, n.22, p. 4130–4139, 2012.

GOLSTEIN, P.; KROEMER, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **Trends Biochem Sci.**, v. 32, p. 37–43. 2007

HANSCHKE, E., GENDORF, O., Zur Kenntnis der Prins schen Reaktion, III. Mitteil.1): Über die Reaktion von Allylcarbinol mit Aldehyden und Ketonen. **Chemische Berichte**. v. 88, p.1053 - 1061, 1955.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HEAD, D. R.; GREER, J. P.; FOERSTER, J.; LUKENS, J. N.; RODGERS, G. M.; PARASKEVAS, F.; GLADER, B.; Classification and Differentiation of the Acute Leukemias **Wintrobe's Clinical Hematology**, v. 11, p. 2063 - 2076, 2004.

HOLLER, N. ZARU, R.; MICHEAU, O.; THOME, M.; ATTINGER, A.; VALITUTTI, S.; BODMER, J.L.; SCHNEIDER, P.; SEED, B.; TSCHOPP, J. Fas triggers an alternative, caspase- 8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. **Nature Immunol.**,v 1, p. 489–495, 2000.

HOUTGRAAF, J.H. VERSMISSEN, J. VAN DER GIESSEN, W.J. a concise review of DNA damage checkpoints e repair in mammalian cells. **Cardiovasc Revasc Med.** v. 7, p.165-172. 2006.

ICHIKAWA H, NAKAMURA Y, KASHIWADA Y, AGGARWAL BB. Anticancer drugs designed by mother nature: ancient drugs but modern targets. **Curr Pharm Des.**, v.13, n. 33, p. 3400-16, 2007.

JAFARNAJADI, S.M.; LI, G. Regulation of p53 by ING family members in suppression of tumor initiation and progression. **Cancer metastasi rev.**, v. 31, p. 55-73, 2012.

JAIN, M.V.; PACZULLA, A.M. KLONISCH, T. DIMGBA, F.N.; RAO, S.B. ROBERG, K. SCHWEIZER, F. LENGERKE, C. DAVOODPOUR, P.; PALICHARLA, V.R. MADDIKA, S.; LOS, M. interconection between apoptotic, autophagic an necrotic pathways: implications for cancer therapy development. **J.cell Mol. Med.**, v. 17, n. 1, p. 12-29, 2012.

International standard: Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for Cytotoxicity: in vitro methods. ISO 10993-5, 1992.

JOZA, N.; SUSIN, .S.A.; DAUGAS, E.; STANFORD, W.L.; CHO, S.K.; LI, C.Y.; SASAKI, T.; ELIA, A.J.; CHENG, H.Y.; RAVAGNAN, L.; FERRI, K.F.; ZAMZAMI, N.; WAKEHAM, A.; HAKEM, R.; YOSHIDA, H.; KONG, Y.Y.; MAK, T.W.; ZUNIGAPFLUCKER, J.C.; KROMER, G.; PENNINGER, J.M. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. **Nature.** v. 410, p. 549-554, 2001.

KELLY, P.N.; STRASSER, A. The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumourigenesis and cancer therapy. **Cell Death Diff.**, v 18, p. 1414–1424, 2011.

KIM, J.; KUNDU, M.; VIOLLET, B.; GUAN, K.L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. **Nature Cell Biol.**, v.13, p. 132–141 2011.

KIM, H.; YOON, S. C.; LEE, T. Y.; JEONG, D.Discriminative cytotoxicity assessment based on various cellular damages.**Toxicol Lett.**, v. 184, n. 1, p.13 - 177, 2009.

KREUZALER,P.; WATSON, J. Killing a cancer: what are the alternatives? **Nature Reviews | Cancer**, v. 12, p. 411 - 424, 2012.

KROEMER,G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E.S.; BAEHRECKE,E.H.; BLAGOSKLONNY, M.V.; EL-DEIRY,W.S.; GOLSTEIN, P. GREEN, D.R.; HENGARTNER, M.; KNIGHT, R.A.; KUMAR, S.; LIPTON, S.A.; MALORNI,W.; NUÑEZ, G.; PETER, M.E.; TSCHOPP, J.; YUAN, J.; PIACENTINI, M.; ZHIVOTOVSKY, B. MELINO, G. Classification of cell death:recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death Differ.**, v. 16, n.11, p. 3–11, 2009.

KROEMER G, EL-DEIRY WS, GOLSTEIN P, PETER ME, VAUX D, VANDENABEELE P, Zhivotovsky, B.; Blagosklonny, M.V.; Malorni, W.; Knight, R.A. Piacentini, M.; Nagata, S. Melino, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell Death Differ**, v. 12, p. 1463–1467 2005.

LEVINE, B.; KROEMER, G. autophagy in the pathogenesis of disease . **Cell**, v.132, p. 27-42, 2008.

LEE, E. Y.; MULLER, W. J.; Oncogenes and tumor suppressor genes.**Cold Spring Harb Perspect Biol.**,v. 2, n. 10, p. 1 - 19, 2010.

LEE, J.W.; PARK, S.; TAKAHASHI, Y.; WANG, H.G. The association of AMPK with ULK1 regulates autophagy. **PLoS ONE**, v. 5, 153-94, 2010.

LI, L.Y.; LUO, X.; WANG, X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. **Nature**. v. 412, p. 95-99, 2001.

LIU, J.; LIN, M.; YU, J.; LIU, B.; BAO, J. Mini-review Targeting apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutics. **Cancer Letters**, v. 300, n. 2, p. 105-114, 2010.

LIU, Y.; PETERSON,D.A.; KIMURA, H.; SCHUVERT,D. Mechanism of cellular 3-(4,5-Dimethylazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **Journal of Neurochemistry**. v. 69, p 581-592, 1997.

LÓPEZ, J.; RUÍZ, G.; ORGANISTA-NAVA, J.; GARIGLIO, P.; GARCÍA-CARRANCA, A. Human papillomavirus infections and cancer stem cells of tumors from the uterine cervix. **Open Virol J.**, v. 6, p. 332-340, 2012.

LYNCH. B.M., CERIN, E., OWEN, N. HAWKES, A.L., AIRKEN, J.F. prospective relationships of physical activity with quality of life among colorectal cancer survivors. **J Clin Oncol**; v. 26, n. 27; p. 4480-4487, 2008.

MA, Y.; YANG, Y.; WANG, F.; ZHANG, P.; SHI, C.; ZOU, Y.; QIN, H. Obesity and risk of colorectal cancer: a systematic review of prospective studies. **PLoS One**, v. 8, n.1, p. e53916, 2013

MAGEDOV IV, MANPADI M, OGASAWARA MA, DHAWAN AS, ROGELJ S, VAN SLAMBROUCK S, STEELANT WF, EVDOKIMOV NM, UGLINSKII PY, ELIAS EM, KNEE EJ, TONGWA P, ANTIPIN MY, KORNIENKO A. Structural simplification of bioactive natural products with multicomponent synthesis. 2. antiproliferative and antitubulin activities of pyrano[3,2-c]pyridones and pyrano[3,2-c]quinolones. **J. Med. Chem.**, v. 51, p. 2561-2570, 2008.

MARSHALL, A.L.; CHRISTIANI, D.C. Genetic susceptibility to lung cancer--light at the end of the tunnel? **Carcinogenesis.**, v. 34, n. 3, p. 487-502.

MELO, P. S. et al. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. In Vitro Cell Dev. **Biol.-Animal**, v. 36, p. 539-543, 2000.

MELO, P.S.; CAVALCANTE, H.M.M.; BARBOSA-FILHO, J.M.; DINIZ, M.F.F.M.; MEDEIROS, I.A.; HAUN, M. Warifteine and milonine, alkaloids isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl: cytotoxicity on rat hepatocyte culture and in V79 cells. **Toxicology Letters**. v. 142, p. 143-151, 2003.

MESQUITA, L.M.; PAULA, J.L.; PESSOA,C.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFOC,L.V.; GROUGNET, R.; MICHELD, S. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 123, p. 439–445, Elsevier, 2009.

MINE, T.H. **Fundamentos de toxicologia**. Atheneu, 2 ed. São Paulo, 2003.

MIRANDA, P. O., LEÓN, L. G., MARTÍN, V. S., PADRÓN, J. I., PADRÓN, J. M., One-pot synthesis and SAR study of cis-2,6-dialkyl-4-chloro-tetrahydropyrans. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 16, p. 3135 – 3138, 2006.

MISHRA, T.; KHULLAR, M.; BHATIA, A. Anticancer Potential of Aqueous Ethanol Seed Extract of *Ziziphus mauritiana* against Cancer Cell Lines and Ehrlich Ascites Carcinoma. **Research Article**. v. 2011, p. 11, 2011.

MOD, H.; MCDONALD, T.; CHU, S.; YEE, J.; FORMAN, S.J.; BHATIA, R. Role of BCR/ABL gene-expression levels in determining the phenotype and imatinib sensitivity of transformed human hematopoietic cells **BLOOD**, :v. 109, n. 12, p. 5411 – 5421, 2007.

MOREIRA, R.R.; DE OLIVEIRA, R.B.; SAFFI, J.; BRAGA, A.L.; ROESLER, R. DAL-PIZZOL, F.; FONSECA, M.J.C.; BRENDEL, M.; PEGAS, H.J.A. Pro-oxidant action of diphenyl diselenide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ROS-generating conditions. **Life Sci**. v. 77, p. 2398-2411, 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v, 65, p.55–63. 1983.

MURTHY, K.N.C.; JAYAPRAKASHA, G.K.; PATIL, B.S. The natural alkaloid berberine targets multiple pathways to induce cell death in cultured human colon cancer cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 688 p. 14–21, 2012.

- NAGATA, S. Apoptotic DNA Fragmentation. **Experimental Cell Research**. v. 256, p.12-18, 2000.
- NUNEZ, R. DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. **Curr Issues Mol. Biol.** Ed. 3, p. 67-70, 2001.
- OKADA H.; MAK T.W.; Pathways of apoptotic and nonapoptotic death in tumour cells. **Nat Rev Cancer**., v. 4, p.592-603, 2004.
- OLIER, C., KAAFARANI, M., GASTALDI, S., BERTRAND, M. P., Synthesis of tetrahydropyrans and related heterocycles via Prins cyclization; extension to aza prins cyclization. **Tetrahedron**. v. 66, p. 413 – 445, 2010.
- RABINOVITCH, P.S. Practical considerations for DNA content and cell cycle analysis. **Clinical flow cytometry: principles and application**. Ed. Williams & Williams, p 117-143, 1993.
- RAI, N.K.; TRIPATHI, K.; SHAMA, D.; SHUKLA V.K. Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. **The International journal Lower Extremity Wounds**. v. 4, p.138-144, 2005.
- RANG, H.P. DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.
- REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K.D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 99, p. 1– 13, 2003.
- RENZI, D.; VALTONILA, M.; FOSTER, R. The evaluation of a multi-endpoint cytotoxicity assay system. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 21, p. 89 - 96; 1993.
- Robinson, S.N.; Zens, M.S.; Perry, A.E.; Spencer, S.K.; Duell ,E.J.; Karagas, M.R. Photosensitizing Agents and the Risk of Non-Melanoma Skin Cancer: A Population-Based Case-Control Study. **J Invest Dermatol.**, v. 133, n. 8, p. 1950-1955, 2013.
- ROGERO, S.O.; HIGA, O.Z.; SAIKI, M.; CORREA, O.V.; COSTA, I. **Toxicology in Vitro**, v. 14, n. 6, p. 497-504, 2000.
- ROGERO, S.O.; LUKÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.
- PEDRAM, B.; VAN OEVEREN, A.; MAIS, D.E.; MARSCHKE, K.B.; VERBOST, P.M.; GROEN, M.B ZHI, L. J. **Med. Chem.**, v. 51, p. 3696 - 3699, 2008.
- RIEDL, S. J.; SALVESEN, G. S. The apoptosome: signalling platform of cell death. **Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 8, p. 405–413, 2007.
- SAKLANI, A. KUTTY, S.K. Plant-derived compounds in clinical trials. **Drug Discov. Today**, v. 13, p. 161-171, 2008.

SANTARIUS, T.; SHIPLEY, J.; BREWER, D.; STRATTON, M. R.; COOPER, C. S.; A census of amplified and overexpressed human cancer genes. **Nat Rev Cancer.**, v. 10, n. 1, p. 59 - 64, 2010.

SESSIONS J. Chronic Myeloid Leukemia in 2007. Supplement to Journal of Managed Care Pharmacy. 2007, 13

SCHRÖTEROVÁ, L.; KRÁLOVÁ, V.; VORÁCOVÁ, A.; HAŠKOVÁ, P.; RUDOLF, E.; CERVINKA, M. Antiproliferative effects of selenium compounds in colon cancer cells: Comparison of different cytotoxicity assays. **Toxicol In Vitro**, n. 23, p. 1406 - 1411, 2009.

SCHNEIDER, C.M.; HSIEH, C.C.; SPROD, L.K.; CARTER, S.D.; HAYWAR, D. R. Effects of supervised exercise training on cardiopulmonary function and fatigue in breast cancer survivors during and after treatment. **Cancer**; v. 110, n. 4, p. 918-25, 2007.

SERRANO, M. C.; PAGANI, R.; VALLET-REGÍ, M.; PEÑA, J.; RÁMILA, A.; IZQUIERDO, I.; PORTOLÉS, M. T. In vitro biocompatibility assessment of poly (ε caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts. **Biomaterials**, v. 25, p. 5603 - 5611, 2004.

SILVA, F.P. Reação de ciclização de prins na síntese diastereosseletiva de 31 análogos meso-tetraidropirânicos: determinação de Estruturas cristalinas, estudos teóricos e avaliação in vitro da atividade antileucêmica. Tese (Doutorado) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

SHEN, H. LAIRD, P.W. Interplay between the cancer genome and epigenome. **Cell**, v. 153 p. 38 -55, 2013.

SRIVASTAVA,V.; NEGI A.S.; KUMAR,J.K.; GUPTA, M.M.; SUMAN P. S. Review Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 13, p. 5892-5908, 2005.

SWERDLOW, S. H.; CAMPO, E.; HARRIS, N. L.; JAFFE, E. S.; PILERI, S. A.; STEIN, H.; THIELE, J.; VARDIMAN, J. W. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4. Geneva: WHO Press, 2008.

SVENDSEN, C.; SPURGEON, D. J.; HANKARD, P. K.; WEEKS, J. M. A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 57, p. 20 - 29, 2004.

TALMADGE, J.E.; FIDLER, I.J. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. **Cancer Res.**, v. 70, p. 5649–5669, 2010.

TAIT, S.W., GREEN, D.R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, 621–632. 2010.

TAYLOR, J.M., NICOT, C. HTLV-1 and apoptosis: role in cellular transformation and recent advances in therapeutic approaches. **Apoptosis**, v.13, p. 733–747. 2008.

TARAYRAH, L.; CHEN, X. Epigenetic regulation in adult stem cells and cancers. **Cell e Bioscience**, v.3, p. 41, 2013.

TAN, G.; GYLLENHAAL, C.; SOEJARTO, D.D. Biodiversity as a source of anticancer drugs. **Curr Drug Targets.**, v. 7, n. 3, p. 265-77, 2006.

TEFFERI A, DEWALD GW, LITZOW ML, CORTES J, MAURO MJ, TALPAZ M, et al. Chronic myeloid leukemia: current application of cytogenetics and molecular testing for diagnosis and treatment. **Mayo Clin Proc**; v. 80, n. 3, p. 390-402, 2005.

THOMAS, G.; Química Mecinal: uma introdução. Guanabara Koogan S.A.; 2003.

THORNTON, D. E.; JONES, K. H.; JIANG, Z.; ZHANG, H.; LIU, G.; CORNWELL, D. G. Antioxidant and cytotoxic tocopheryl quinones in normal and cancer cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 18, n. 6, p. 963 - 976, 1995.

TRISTÃO, V. R. GONÇALVES, P.F.; DALBONI, M.A.; BATISTA, M.C.; DURÃO, M.S.JR, MONTE J.C. Nec-1 protects against nonapoptotic cell death in cisplatin-induced kidney injury. **Ren. Fail.**, v. 34, p. 373–377, 2012.

VASCONCELLOS, M. L. A. A., MIRANDA, L. S. M., A reação de ciclização de Prins: uma estratégia eficiente para síntese estereosseletiva de anéis tetraidropirânicos substituídos. *Química Nova*. v. 29 p. 834–839, 2006.

VANLANGENAKKER, N.; VANDEN BERGHE, T.; VANDENABEELE, P. Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview. **Cell Death Diff.**, v. 19, p. 75–86, 2011.

VERHAGEN, A.M.; EKERT, P.G.; PAKUSCH, M.; SILKE, J.; CONNOLLY, L.M.; REID, G.E.; MORITZ, R.L.; SIMPSON, R.J.; VAUX, D.L. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. **Cell**. v.102, p.43–53, 2000.

VERMES, I.; HAANEN, C. STEFFENS-NAKKEN, H. REUTELINGSPERGER, C. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine early apoptotic cells using fluorescein labeled expression on Annexin V. **Journal of Immunological Methods**, v. 184, p. 39-51, 1995.

VINTONYAK, V. V., KUNZE, B., SASSE, F., MAIER, M. E. Total Synthesis and Biological Activity of Neopeltolide and Analogues, **Chemistry - A European Journal**. v. 14, p. 11132 – 11140, 2008.

WANG, C.. YOULE, R. J. The role of mitochondria in apoptosis. **Annu. Rev. Genet.** V. 43, p. 95-118. 2009.

WENDER, P. A., VERMA, V. A., The Design, Synthesis, and Evaluation of C7 Diversified Bryostatins Analogs Reveals a Hot Spot for PKC Affinity. **Organic Letters**. v. 10, n. 15, p. 3331-3334, 2008.

WANG, W.; RAYBURN, E.R.; VELU, S.E.; NADKARNI, D.H.; MURUGESAN, S.; ZHANG, R. *In vitro* and *In vivo* Anticancer Activity of Novel Synthetic Makaluvamine Analogues **Clin Cancer Res**; v. 15, p. 3511-3518, 2009.

WEINBERG, R. A.; *A Biologia Do Câncer*. Rio de Janeiro: Artmed, 2008.

WERMUTH, C. G.; GANELLIN, C. R.; LINDBERG, P.; MITSCHER, L. A.; Glossary of terms used in medicinal chemistry, **Pure e Appl. Chem.**, v. 70, p. 1129, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer. Fact sheet N°297**. February 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>> Acessado em: 12 de março de 2013.

YADAV, J. S., REDDY, B. V. S., REDDY, M. S., NIRANJAN, N., PRASAD, A. R., Lewis Acidic Chloroaluminate Ionic Liquids: Novel Reaction Media for the Synthesis of 4-Chloropyrans. **European Journal of Organic Chemistry**. v.9, p. 1779 – 1783, 2003.

YOULE, R. J.; STRASSER, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. **Nature Rev. Mol. Cell Biol.**, v 9, p. 47–59 , 2008.

ZHANG, D.W. *et al.* RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. **Science** v. 325, 332–336, 2009.

ZHAO, X. L., LIU, L., CHEN, Y. J., WANG, D., Direct synthesis of tetrahydropyrans via one-pot Babier–Prins cyclization of allylbromide with carbonyl compounds promoted by RTILs BPyX/SnX₂ or BBIMBr/SnBr₂. **Tetrahedron**. v. 62, p. 7113 – 7120, 2006.

Anexo



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA - UFPB
 HOSPITAL UNIVERSITÁRIO LAURO WANDERLEY - HULW
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES
 HUMANOS - CEP**

CERTIDÃO

Com base na Resolução nº 196/96 do CNS/MS que regulamenta a ética da pesquisa em seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley - CEP/HULW, da Universidade Federal da Paraíba, em sua sessão realizada no dia 28/08/2012, após análise do parecer do relator, considerou **APROVADO** o projeto de pesquisa intitulado **AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA PRÉ-CLÍNICA E DO EFEITO ANTITUMORAL IN VIVO DO COMPOSTO A398, UM DERIVADO INÉDITO DA PODOFILOTOXINA**, da pesquisadora **ALETHÉIA LACERDA DA SILVEIRA**. Certificado de Apresentação para Apreciação Ética - CAAE: 05878712.7.0000.5183.

Qualquer alteração do Projeto e dificuldades deverão ser **comunicados a este Comitê de Ética em Pesquisa** através do Pesquisador responsável e/ou chefia do setor. A pesquisadora responsável fica, desde já, notificada da obrigatoriedade de no término da pesquisa entregar ao CEP/HULW, uma cópia desta certidão e da pesquisa, em CD, para emissão da certidão para publicação científica.

Comitê de Ética em Pesquisa
 Hospital Universitário Lauro Wanderley
 Universidade Federal da Paraíba

João Pessoa, 04 de dezembro de 2012.

Profª Drª Iaponira Cortez Costa de Oliveira
 Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-HULW

Iaponira Cortez Costa de Oliveira
 Coordenadora do Comitê de Ética

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley-HULW - 4º andar. Campus I - Cidade Universitária.
 Bairro: Castelo Branco - João Pessoa - PB. CEP: 58051-900 CNPJ: 24098477/007-05
 Fone: (83) 32167964 — Fone/fax: (083)32167522 E-mail - comitedeetica@hulw.ufpb.br

D192a Dantas, Bruna Braga.

Avaliação do efeito anticâncer de compostos sintéticos derivados do núcleo tetraidropirano / Bruna Braga Dantas.-- João Pessoa, 2014.

99f. : il.

Orientador: Demetrius Antonio Machado de Araújo
Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS

1. Farmacologia. 2. Química medicinal. 3. Tetraidropirano.
4. Câncer - eficácia. 5. Citotoxicidade. 6. Morte celular.

UFPB/BC

CDU: 615(043)