



**UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ**

**ISABEL DAUFENBACK MACHADO**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE BROMETOS DE FENACILA,  
NORFLOXACIN E ADUTOS DESTES SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE  
CÉLULAS MONONUCLEARES HUMANAS *IN VITRO***

Itajaí

2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ**  
**PROGRAMA DE MESTRADO ACADÊMICO EM FARMACÊUTICAS**  
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E**  
**SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS BIOATIVAS**

**ISABEL DAUFENBACK MACHADO**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE BROMETOS DE FENACILA,  
NORFLOXACIN E ADUTOS DESTES SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE  
CÉLULAS MONONUCLEARES HUMANAS *IN VITRO***

Dissertação submetida ao Programa de Mestrado Acadêmico em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ednéia Casagrande Bueno  
Co-orientação: Prof Dr Rogério Corrêa

Itajaí, Maio de 2010

FICHA CATALOGRÁFICA

M18c Machado, Isabel Daufenback, 1983-  
Avaliação do efeito de brometos de fenacila, norfloxacin e adutos destes sobre a proliferação de células mononucleares humanas *in vitro* [manuscrito] / Isabel Daufenback Machado. – Itajaí, 2010.  
92 f. : il. (fig.).

Inclui anexos.  
Referências: p. 82-91.  
Cópia de computador (Printout(s)).  
Dissertação (mestrado) – Universidade do Vale do Itajaí, Programa de Mestrado Acadêmico em Farmacêuticas, área de concentração em produtos naturais e substâncias sintéticas bioativas, 2010.  
“Orientadora: Prof.<sup>a</sup> D.<sup>a</sup> Ednéia Casagranda Bueno; Co-orientação: Prof. Dr. Rogério Corrêa”.

1. Farmácia – Pesquisa. 2. Células. 3. Norfloxacin. I. Bueno, Ednéia Casagranda; II. Corrêa, Rogério. III. Título.

CDU: 615.27

**“AVALIAÇÃO DO EFEITO DE BROMETOS DE FENACILA, NORFLOXACIN E ADUTOS DESTES SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES HUMANAS *IN VITRO*”**

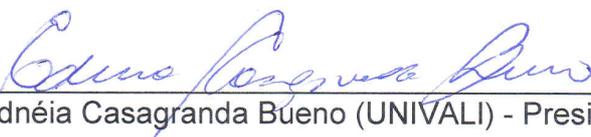
ISABEL DAUFENBACK MACHADO

Esta Dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Produtos Naturais e Substâncias Bioativas e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí.

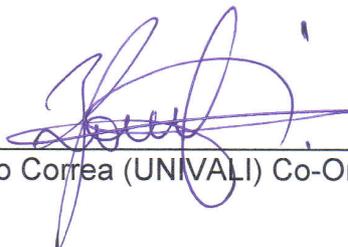


Professora Tania Mari Bellé Bresolin, Doutora  
Coordenadora PMCF

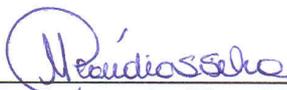
Apresentada perante a Banca Examinadora composta pelos Professores:



Doutora Ednéia Casagrande Bueno (UNIVALI) - Presidente e Orientadora



Doutor Rogério Correa (UNIVALI) Co-Orientador



Doutora Maria Cláudia Santos da Silva (UFSC) – Membro Externo



Doutor Alexandre Bella Cruz (UNIVALI) – Membro Interno

Itajaí, 26 de fevereiro de 2010.

## **DEDICATÓRIA**

*Aos meus pais, que me ensinaram o valor do trabalho, do respeito e da dignidade e que tudo fizeram para que eu realizasse os meus sonhos*

## AGRADECIMENTOS

Quando comecei a pensar nos agradecimentos, veio imediatamente em meu pensamento o Adilson José Rodrigues. Era sensacional o modo como, ao término de cada luta disputada, Maguila se dirigia aos repórteres a fim de fazer uma extensa lista de agradecimentos a todos aqueles que o ajudaram na vida. Agradecia aos pais, aos amigos, ao Zezinho do açougue da esquina, ao Luciano do Valle por narrar suas lutas, aos patrocinadores como o Genaro da Olivetti, e muito mais ainda agradeceria, se os repórteres não fossem praticamente obrigados a tirar o microfone de suas mãos. E da mesma forma, hoje, após mais uma luta disputada agradeço a Deus por ter me concedido inúmeras pessoas fantásticas nas esquinas da vida.

Agradeço aos meus pais, Adécio e Iracema, que com um amor incondicional me apoiaram durante toda a minha vida. Onde nos meus erros me puniram, nos meus tropeços me ergueram e nos meus acertos me aplaudiram. Não tenho palavras pra agradecer a ajuda de vocês;

Durante muitos anos a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ednéia participou do meu desenvolvimento acadêmico, desde os primórdios textos do TCC a este trabalho. É grande meu apreço por essa Mulher, Professora, e Orientadora, pois me instruiu como ser humano, lecionou disciplinas e passou seu saber científico para eu estar preparada para esse universo. Sempre me instigando a buscar mais e mais;

Ao Co-orientador Prof Dr Rogério Corrêa, agradeço pela colaboração na síntese dos compostos empregados neste estudo e a sua experiência na avaliação química dos mesmos;

Ao Prof Dr Rilton Alves de Freitas fica minha gratidão pela disposição para esclarecer minhas dúvidas, que resultavam em mais questionamentos, e que na verdade estava me ensinando o que é pesquisa;

Ao Prof Dr Alexandre Bella Cruz agradeço por desenrolar meus nós da Topoisomerase e colaborar diretamente com minha pesquisa, garantindo sempre uma boa gargalhada. Agradecendo ao Prof, me remete obviamente a Prof<sup>a</sup> Rosana Cé Bella Cruz com seus conselhos e histórias... Amados;

Agradeço à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Cláudia Santos da Silva e suas alunas Karina, Carol, Marley e Michele, que me receberam com muito apoio e conhecimento na UFSC. Em especial agradeço a Juliana pela colaboração com as horas despendidas para o ensaio do *western blotting*;

Ao pessoal da Farmaco, Maggie, Talita, Nara, Márcia e Cris que sempre lembrarei o apoio com uma conversa, um cafezinho ou no shake...;

Aos meus amigos do mestrado Zeca, Carla, Maria Cláudia, Ana, Juliana, Marivane, Rosana, Gislaíne, Talita, Vanessa, Carla, Thaís, Luiz, Philipe, Alessandro e Jaqueline coloco uma frase: “O prazer dos banquetes não está nos pratos, mas sim nas pessoas que acompanham a mesa” (Rachel Araújo). Ou seja, todo esse período da minha vida não teria o mesmo sabor, se não fosse a companhia de vocês;

Aos meus amigos Anna Cristina, Alessandro, Fernanda, Janine, Layla, Karina e Gian, Carol B., Ana Paula, Galera do Shake e Vivian, mesmo estando ausente nestes últimos tempos, sempre me apoiaram e demonstraram enorme carinho;

As minhas colegas de pesquisa Fran, que me ensinou os primeiros passos nos experimentos, e Erika bolsista ProBIC;

A minha ex-chefe, amiga, mãe-de-balneário, Janéth Medeiros, que me passou seus conhecimentos de análises clínicas, onde a Bioquímica que sou dedico a ela. Educou-me como educa seus filhos, sendo dura quando errava e amável nas minhas conquistas, com o intuito de me formar uma pessoa melhor. Sempre me incentivou a buscar a área acadêmica, e hoje aqui estou. Essa é pra você também. Muito obrigada;

E agradeço a CAPES pelo financiamento desta etapa;

A todos muito obrigada.

*“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios.  
Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente,  
antes que a cortina se feche e a peça termine sem  
aplausos.”*

*(Charles Chaplin)*

# AVALIAÇÃO DO EFEITO DE BROMETOS DE FENACILA, NORFLOXACIN E ADUTOS DESTES SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES HUMANAS *IN VITRO*

**Isabel Daufenback Machado**

Maio/2010

Orientadora: Ednéia Casagrande Bueno, Dr<sup>a</sup>.

Co-orientador: Rogério Corrêa, Dr.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Substâncias Sintéticas Bioativas

Número de Páginas: 92

A pesquisa por novos agentes antibacterianos e dos respectivos mecanismos de ação tem se mantido como alvo de estudo devido à crescente presença de multi-resistência bacteriana. Os antibacterianos fluoroquinolônicos têm despertado maior interesse no estudo por seu amplo espectro de ação, potência e propriedades farmacocinéticas. Além da procura de novos compostos com atividade antibacteriana, também tem sido alvo a identificação de compostos com atividade imunomoduladora e citotóxica. O presente estudo objetivou avaliar a atividade imunomodulatória e/ou citotóxica de seis brometos de fenacila, norfloxacin e seis adutos destes sobre células mononucleares humanas obtidas do sangue periférico de doadores saudáveis. As células mononucleares humanas ( $1 \times 10^5$  células/poço) foram tratadas com os compostos (1 a 50  $\mu\text{g/mL}$ ), na presença e na ausência de mitógeno (PHA, 5  $\mu\text{g/mL}$ ), durante 72 h a 37°C e com 5% de  $\text{CO}_2$ . A atividade dos compostos sobre a proliferação celular foi determinada pelo ensaio de redução do azul de tetrazólio (MTT) e os resultados foram expressos em percentagem de proliferação celular. Os compostos com atividade imunoestimuladora foram avaliados quanto a expressão da proteína KI-67 por imunocitoquímica, enquanto que os compostos com atividade citotóxica foram avaliados quanto ao aumento da atividade da lactato desidrogenase (LDH) por reação enzimática, indução da expressão de caspase-3 por imunocitoquímica e *western blotting* e também pela avaliação da morfologia e da coloração celular com brometo de etídio. Os seis brometos de fenacila avaliados causam efeito citotóxico sobre células mononucleares humanas cultivadas *in vitro*, com indução da expressão de caspase-3 revelada pela imunocitoquímica e *western blotting*. A adição de cloro, flúor ou metoxi na posição 4 do brometo de fenacila induziu o aumento da atividade da lactato desidrogenase (LDH), enquanto que a adição de cloro, metil e metoxi induziram a apresentação de características apoptóticas nas células tratadas. O aduto do brometo de fenacila com norfloxacin promoveu estímulo da proliferação celular, enquanto que o aduto do brometo de fenacila contendo metoxi na posição 4 com norfloxacin intensificou o potencial mitogênico da PHA, ambos induzindo discreta expressão de KI-67 nas células tratadas. Os adutos formados com os demais brometos de fenacila e norfloxacin não mostraram citotoxicidade e tampouco interferiram na atividade celular frente ao mitógeno. Desta forma, a síntese dos adutos do brometo de fenacila com norfloxacin inibiu a elevada citotoxicidade apresentada pelos brometos de fenacila isoladamente.

**Palavras-chave:** Atividade proliferativa, células mononucleares, norfloxacin, fitohemaglutinina.

# EVALUATION OF THE EFFECT PHENACYL BROMIDE, NORFLOXACIN AND THEIR ADDUCTS ON *IN VITRO* HUMAN MONONUCLEAR CELL PROLIFERATION

Isabel Daufenback Machado

May/2010

Supervisor: Ednéia Casagrande Bueno, Dr<sup>a</sup>

Co-supervisor: Rogério Corrêa, Dr.

Area of Concentration: Natural Products and Bioactive Synthetic Substances

Number of pages: 92

The search for new antibacterial agents and their mechanisms of action have remained a target for study, due to the increasing presence of multi-resistant bacteria. Fluoroquinolone antibacterials have generated great interest in study due to their broad spectrum of action, potency, and pharmacokinetic properties. Besides the search for new compounds with antibacterial activity, they have also been the target of studies to identify compounds with cytotoxic and immunomodulatory activity. This study evaluates the immunomodulatory and/or cytotoxic activity of six phenacyl bromides, norfloxacin, and six of their adducts on human mononuclear cells obtained from the peripheral blood of healthy donors. Human mononuclear cells ( $1 \times 10^5$  cells/well) were treated with compounds (1 to 50  $\mu\text{g/mL}$ ) in the presence and absence of mitogen (PHA, 5  $\mu\text{g/mL}$ ) for 72 h at 37° C and 5%  $\text{CO}_2$ . The activity of compounds on cell proliferation was determined by the reduction of blue tetrazolium (MTT) assay, and the results were expressed as the percentage of cell proliferation. The compounds with immunostimulating activity were evaluated for KI-67 protein expression by immunocytochemistry, while the compounds with cytotoxic activity were evaluated for the increased activity of lactate dehydrogenase (LDH) by enzymatic reaction, induction of caspase-3 expression by immunocytochemistry, and western blotting, and also by the evaluation of the cell morphology and the ethidium bromide cell staining. The six phenacyl bromides evaluated showed high cytotoxicity on human mononuclear cells *in vitro*, by inducing caspase-3 expression, as revealed by immunocytochemistry and western blotting. The addition of chlorine, fluorine or methoxy in position 4 of the phenacyl bromide induced increased activity of lactate dehydrogenase (LDH), while the addition of chloride, methyl and methoxy induced the presence of apoptotic characteristics on the treated cells. The phenacyl bromide adduct with norfloxacin promoted stimulation of cell proliferation, while the phenacyl bromide adduct containing methoxy in position 4 increased the mitogenic potential of PHA, with both inducing mild expression of KI-67 in the treated cells. Adducts formed with other phenacyl bromides and norfloxacin showed no cytotoxicity and no interference on the cellular activity against the mitogen. Thus, the synthesis of adducts with phenacyl bromides with norfloxacin inhibited the high cytotoxicity activity displayed by phenacyl bromides alone.

**Key words:** Proliferative activity, mononuclear cells, norfloxacin, phytohemagglutinin.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01</b>	Esquema representativo das fases do ciclo celular.....	23
<b>Figura 02</b>	Processos de morte celular por apoptose, autofagia, necrose e piroptose.....	29
<b>Figura 03</b>	Representação da sinalização por via extrínseca (A) e intrínseca (B) do processo de morte por apoptose.....	31
<b>Figura 04</b>	Estrutura química das quinolonas: ácido nalidíxico (1 <sup>a</sup> geração), norfloxacin (2 <sup>a</sup> geração) e levofloxacin (3 <sup>a</sup> geração).....	37
<b>Figura 05</b>	Reações de formação da estrutura helicoidal do DNA catalisadas pelas topoisomerases II.....	39
<b>Figura 06</b>	Estrutura base das fluorquinolonas.....	41
<b>Figura 07</b>	Estrutura molecular dos brometos de fenacila.....	45
<b>Figura 08</b>	Estruturas moleculares e nomenclaturas dos derivados fenacílicos testados.....	46
<b>Figura 09</b>	Ilustração representativa do princípio da imunocitoquímica indireta.....	50
<b>Figura 10</b>	Fluxograma da técnica de <i>western blotting</i> .....	53
<b>Figura 11</b>	Células mononucleares humanas incubadas isoladas (A, CONTROLE) ou simultaneamente com dimetilformamida 1% (B, DMF), dimetilsulfóxido 10% (C, DMSO) ou fitohemaglutinina 5 µg/mL (D, PHA) por 72 h a 37°C com 5% de CO <sub>2</sub> . .....	57
<b>Figura 12</b>	Proliferação celular revelada pelo ensaio de redução do MTT. Cultivo de células mononucleares humanas incubadas isoladamente em meio de cultivo (CONTROLE) ou simultaneamente com dimetilformamida 1% (DMF), fitohemaglutinina 5 µg/mL (PHA), ou dimetilsulfóxido 10% (DMSO) por 72 h a 37°C com 5% de CO <sub>2</sub> .....	58
<b>Figura 13</b>	Proliferação de células mononucleares humanas <i>in vitro</i> frente ao brometo de fenacila (BF 01, A), brometo de 4-clorofenacila (BF 02, B) e brometo de 4-fluorfenacila (BF 03, C) nas concentrações de 1, 5, 25 e 50 µg/mL incubadas isoladas ou simultaneamente com fitohemaglutinina (5 µg/mL) por 72 h a 37°C com 5% de CO <sub>2</sub> .....	61
<b>Figura 14</b>	Proliferação de células mononucleares humanas <i>in vitro</i> frente ao brometo de 4-metilfenacila (BF 04, A), brometo 4-metoxifenacila (BF 05, B) e brometo de 3,4-diclorofenacila (BF 06, C) nas concentrações de 1, 5, 25 e 50 µg/mL incubadas isoladas ou simultaneamente com fitohemaglutinina (5 µg/mL) por 72 h a 37°C com 5% de CO <sub>2</sub> .....	63
<b>Figura 15</b>	Proliferação de células mononucleares humanas <i>in vitro</i> frente ao norfloxacin (NOR 00) nas concentrações de 1, 5, 25 e 50 µg/mL incubadas isoladas ou simultaneamente com fitohemaglutinina (5 µg/mL) por 72 h a 37°C com 5% de CO <sub>2</sub> .....	65
<b>Figura 16</b>	Proliferação de células mononucleares humanas <i>in vitro</i> frente ao aduto do brometo de fenacila com norfloxacin (NOR 01, A), aduto	

	do brometo de 4-clorofenacila com norfloxacin (NOR 02, B) e aduto do brometo de 4-fluorfenacila com norfloxacin (NOR 03, C) nas concentrações de 1, 5, 25 e 50 µg/mL incubadas isoladas ou simultaneamente com fitohemaglutinina (5 µg/mL) por 72 h a 37°C com 5% de CO <sub>2</sub> .....	67
<b>Figura 17</b>	Proliferação de células mononucleares humanas <i>in vitro</i> frente ao aduto do brometo de 4-metilfenacila com norfloxacin (NOR 04, A), aduto do brometo de 4-metoxifenacila com norfloxacin (NOR 05, B) e aduto do brometo de 3,4-diclorofenacila com norfloxacin (NOR 06, C) nas concentrações de 1, 5, 25 e 50 µg/mL incubadas isoladas ou simultaneamente com fitohemaglutinina (5 µg/mL) por 72 h a 37°C com 5% de CO <sub>2</sub> .....	69
<b>Figura 18</b>	Fotomicrografia representativa de imunocitoquímica (1000x) para a detecção da expressão de KI-67 por células mononucleares humanas incubadas isoladamente em meio de cultura (CONTROLE, A) e na presença de fitohemaglutinina 5 µg/mL (PHA, B), aduto do brometo de fenacila com norfloxacin isoladamente (NOR 01, C) e na presença de fitohemaglutinina (NOR 01 + PHA, D), aduto do brometo de 4-metoxifenacila com norfloxacin isoladamente (NOR 05, E) e na presença de fitohemaglutinina 5 µg/mL (NOR 05 + PHA, F) na concentração de 50 µg/mL por 72 h a 37°C com 5% de CO <sub>2</sub> .....	72
<b>Figura 19</b>	Atividade de Lactato desidrogenase (U/L) formada pela exposição <i>in vitro</i> das células mononucleares humanas ao brometo de fenacila (BF 01), brometo de 4-clorofenacila (BF 02), brometo de 4-fluorfenacila (BF 03), brometo de 4-metilfenacila (BF 04), brometo de 4-metoxifenacila (BF 05) e brometo de 3,4-diclorofenacila (BF 06) na concentração de 50 µg/mL durante 72 h a 37°C com 5% de CO <sub>2</sub> .....	75
<b>Figura 20</b>	Fotomicrografia representativa da imunocitoquímica (1000x) para a detecção da expressão de caspase-3 por células mononucleares humanas incubadas em meio de cultura (CONTROLE, A), na presença de Taxol <sup>®</sup> (TAXOL, B), brometo de fenacila (BF 01, C), brometo de 4-clorofenacila (BF 02, D), brometo de 4-fluorfenacila (BF 03, E), brometo de 4-metilfenacila (BF 04, F), brometo de 4-metoxifenacila (BF 05, G) e brometo de 3,4-diclorofenacila (BF 06, H) na concentração de 50 µg/mL por 9 h a 37°C com 5% de CO <sub>2</sub> .....	77
<b>Figura 21</b>	Expressão de caspase-3 por células mononucleares humanas incubadas em meio de cultura (CONTROLE), na presença de Taxol <sup>®</sup> a 30 µM, brometo de fenacila (BF 01), brometo de 4-clorofenacila (BF 02), brometo de 4-fluorfenacila (BF 03), brometo de 4-metilfenacila (BF 04), brometo de 4-metoxifenacila (BF 05) e brometo de 3,4-diclorofenacila (BF 06) na concentração de 50 µg/mL por 9 h a 37°C com 5% de CO <sub>2</sub> , detectada por <i>western blotting</i> em gel de poliacrilamida a 12%.....	78

**Figura 22** Efeito do brometo de fenacila (BF 01, C), brometo de 4-clorofenacila (BF 02, D), brometo de 4-fluorfenacila (BF 03, E), brometo de 4-metilfenacila (BF 04, F), brometo de 4-metoxifenacila (BF 05, G) e brometo de 3,4-diclorofenacila (BF 06, H) na concentração de 50 µg/mL por 24 h a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, na viabilidade de células mononucleares humanas; (A) Controle negativo (células incubadas isoladamente em meio de cultura –CONTROLE); (B) Controle positivo (células na presença de Taxol<sup>®</sup> a 30 µM – TAXOL)..... 80

## LISTA DE ABREVIATURAS

APC	- Célula apresentadora de antígeno
ATP	- Adenosina tri-fosfato
BCR	- Receptor de linfócito B
CDKs	- Quinases Ciclina-Dependentes
DAB	- 3,3'-diaminobenzidina
DMEM	- Dulbeccos's Modified Eagles Medium
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
DO	- Densidade óptica
IL-1	- Interleucina-1
IL-2	- Interleucina-2
LB	- Linfócito B
LDH	- Lactato desidrogenase
LT	- Linfócito T
LTCD4+	- Linfócito T auxiliar
LTCD8+	- Linfócito T citotóxico
MHC	- Complexo principal de hiscompatibilidade
MTT	- Azul de tetrazólio
NK	- Célula <i>Natural Killer</i>
PHA	- Fitohemaglutinina
PCNA	- Antígeno nuclear de proliferação celular
RNA	- Ácido ribonucléico
TCR	- Receptor de linfócito T

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
2.1	Objetivo Geral.....	17
2.2	Objetivo Específicos.....	17
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
3.1	Sistema Imune.....	18
3.2	Proliferação Celular e Citotoxicidade.....	22
3.3	Antimicrobianos.....	36
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>44</b>
4.1	Local do Estudo.....	44
4.2	Norfloxacin e Derivados Sintéticos.....	44
4.3	Amostragem e Aspectos Éticos.....	47
4.4	Cultivo Celular.....	47
4.5	Determinação da Proliferação Celular.....	49
4.6	Detecção de KI-67 e Caspase-3 por Imunocitoquímica.....	50
4.7	Detecção da Caspase-3 por <i>Western Blotting</i> .....	52
4.8	Determinação da Atividade da Lactato Desidrogenase.....	55
4.9	Análise Morfológica por Microscopia de Fluorescência.....	55
4.10	Análise dos Resultados.....	56
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
5.1	Determinação da Proliferação Celular.....	57
5.1.1	<i>Brometos de fenacila.....</i>	<i>58</i>
5.1.2	<i>Norfloxacin e adutos.....</i>	<i>64</i>
5.2	Avaliação da Atividade Proliferativa dos Adutos dos Brometos de Fenacila com Norfloxacin.....	71
5.3	Avaliação da Atividade Citotóxica dos Brometos de Fenacila.....	73
5.3.1	<i>Determinação da atividade da lactato desidrogenase (LDH).....</i>	<i>74</i>
5.3.2	<i>Detecção da caspase-3 por imunocitoquímica.....</i>	<i>76</i>

<b>5.3.3 Detecção da caspase-3 por western blotting.....</b>	<b>77</b>
<b>5.3.4 Análise morfológica por microscopia de fluorescência.....</b>	<b>78</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>81</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>82</b>
<b>ANEXO 1.....</b>	<b>92</b>

# 1 INTRODUÇÃO

A atividade do sistema imune pode ser estimulada ou suprimida no processo conhecido como imunomodulação (PATWARDHAN et al., 1990; MAKARE; BODHANKAR; RANGARI, 2001). O teste de linfoproliferação é uma das metodologias *in vitro* que permite verificar a imunossupressão dos linfócitos estimulados com mitógenos como a fitohemaglutinina (PHA) frente aos compostos em estudo, bem como a imunoestimulação ou a citotoxicidade destes compostos quando adicionados nos cultivo celular (PANDIMA DEVI et al., 2003; ROCHA; GORESCU; BELTRAME, 2007). Uma ferramenta adicional na avaliação da atividade imunoestimuladora da proliferação celular é a identificação da expressão da proteína KI-67. Esta proteína se faz presente em todas as fases do ciclo celular, exceto na fase de repouso ( $G_0$ ), (BROWN; GATTER, 2002; WIESNER et al., 2009).

Por outro lado, a atividade citotóxica pré-dispõe a existência de morte celular, tendo como principais vias necrose e apoptose (LABBÉ; SALEH, 2008). Na necrose ocorre perda da integridade da membrana e extravasamento do conteúdo celular para o meio extracelular (DUPREZ et al., 2009). A morte celular pela via apoptótica é essencial para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos. A caspase-3 representa a principal proteína efetora da maquinaria apoptótica e justamente por isso é uma das caspases mais pesquisadas quando o objetivo é identificar a apoptose como a via de morte celular envolvida (ALAM et al., 1999; RASTOGI; RICHA; SINHA, 2009).

As células envolvidas na resposta imune possuem função reguladora, promovendo ou suprimindo a resposta de defesa. Como consequência do que acontece *in vivo* para a manutenção da integridade do organismo, a descoberta de substâncias imunomoduladoras tornou possível a manipulação do sistema imune a favor de um estado saudável, seja por meio da imunoestimulação ou da imunossupressão (NUNES-PINHEIRO et al., 2003). Os fármacos imunomoduladores podem provocar alterações em diversas funções do sistema imune, como a produção de citocinas específicas, alteração na fagocitose, quimiotaxia e proliferação celular (NUNES-PINHEIRO et al., 2003, LIMA, 2007). O efeito destes compostos sobre a proliferação de linfócitos *in vitro* está diretamente relacionado

com a defesa específica do organismo frente a agentes estranhos (SPRENT, 1994; AHMED; SPRENT, 1999; BAUHOFER et al., 2008).

Estudos reportados pelo grupo de pesquisadores da Universidade do vale do Itajaí (UNIVALI) indicaram atividade antimicrobiana para alguns brometos de fenacila e adutos com o norfloxacin (MARTINS, 2009), bem como dados preliminares sugeriram a ação de alguns destes compostos sobre a resposta de células mononucleares humanas *in vitro* frente ao mitógeno PHA (SOUZA et al., 2007). O maior interesse no estudo da classe dos antibacterianos fluoroquinolônicos está relacionado com o seu amplo espectro, potência e propriedades farmacocinéticas. Considerando que a resposta imune apresenta papel fundamental na defesa contra agentes infecciosos (MACHADO et al., 2004), a possibilidade de identificar compostos com ação imunomodulatória e que também possuam atividade antibacteriana representa uma grande expectativa na melhora do prognóstico clínico frente às diversas infecções bacterianas.

Desde a descoberta do ácido nalidíxico por Lesher em 1962, uma série de análogos foram sintetizados, em especial os derivados fluorquinolônicos como norfloxacin e ciprofloxacina (FANG et al., 2000). As fluorquinolonas pertencem a um grupo de agentes sintéticos antibacterianos de excelente potência e amplo espectro contra uma variedade de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e micoplasmas. Atualmente são utilizados amplamente na medicina humana e veterinária para o tratamento de doenças infecciosas (DIZMAN; ELASRI; MATHIAS, 2005). A presença de várias cadeias laterais nas fluorquinolonas favorece diversas possibilidades de alterações químicas. A maior parte destes análogos sintetizados apresenta substituição na posição 7 por um nitrogênio heterocíclico. O norfloxacin é caracterizado por um grupo piperazina em C-7, sítio este sensível a modificações e de significativo impacto na potência, espectro de ação, solubilidade e farmacocinética (PANDEYA et al., 2000; CHEN et al., 2001).

Desta forma, o presente trabalho se apresenta como ferramenta auxiliar na identificação de novos compostos com atividade imunomodulatória ou citotóxica, que se acrescidos de comprovada atividade antibacteriana configura uma abordagem muito mais efetiva no combate aos agentes microbianos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito de brometos de fenacila, norfloxacin e adutos destes sobre a proliferação de células mononucleares humanas *in vitro*

### 2.2 Objetivos Específicos

- Analisar o efeito de seis brometos de fenacila, norfloxacin e seis adutos destes sobre a proliferação de células mononucleares humanas *in vitro*, na presença e na ausência do estímulo mitogênico da PHA;
- Determinar, por imunocitoquímica e *western blotting*, a expressão da proteína caspase-3 em células mononucleares humanas cultivadas com os compostos que foram citotóxicos;
- Complementar a análise da viabilidade celular induzida por estes compostos pela determinação da atividade da LDH no sobrenadante do cultivo celular;
- Verificar se esses compostos causam morte celular ou por necrose;
- Investigar se o mecanismo de morte celular envolve a ativação da caspase-3;
- Verificar, por imunocitoquímica, a presença do marcador de proliferação celular KI-67 (gene MKI-67) em células cultivadas com compostos que apresentaram imunoestimulação;
- Constatar a influência do grupamento substituinte no C-7 do norfloxacin sobre a proliferação de células mononucleares humanas;

## 3 REVISÃO DA LITERATURA

### 3.1 Sistema Imune

O sistema imune representa a principal barreira do hospedeiro contra as infecções, e tem a capacidade de realizar uma resposta rápida e efetiva contra os patógenos invasores. Além disso, pode elaborar outro tipo de resposta igualmente eficaz, porém mais lenta e duradoura. Estes dois tipos de respostas são efetuadas pelos sistemas imune inato e adaptativo, respectivamente (JANEWAY et al., 2006). As respostas de defesa do organismo contra os agentes agressores incluem vários mecanismos celulares e humorais, desde a entrada do agente até o reconhecimento pelas células de defesa específicas, os linfócitos T (LT) e os linfócitos B (LB), e a fase efetora com a eliminação do agente agressor (MORAES, 2007).

Dentre os mecanismos efetores de defesa do sistema imune inato encontram-se as barreiras mecânicas (pele, muco, micção, secreções), químicas (pH vaginal e estomacal, lisozima nas secreções) e microbianas (microbiota normal) que dificultam a instalação dos agentes agressores no organismo hospedeiro, bem como promovem a competição biológica com os patógenos. A resposta do sistema imune inato é a primeira linha defensiva contra patógenos, por isso é ativada imediatamente após a infecção. Os produtos solúveis secretados pelas células (citocinas e quimiocinas) e as proteínas séricas (sistema complemento, cininas, proteínas de fase aguda, sistema de coagulação) consistem em outros mecanismos de defesa levando a eliminação do microrganismo e ativação do processo inflamatório (ROCHA; GORESCU; BELTRAME, 2007; BORGHETTI et al., 2009). A inibição direta da ação do agente agressor, e também o desencadeamento e modulação da resposta do sistema imunológico, são realizados pelas células inflamatórias (mastócito, basófilo, monócito e neutrófilo) através da liberação de produtos solúveis (JANEWAY et al., 2006).

As células efetoras do sistema imune inato podem ser classificadas como células fagocíticas (macrófagos e granulócitos) e citotóxicas (*natural killer* - NK e eosinófilos), as quais estão imediatamente disponíveis para o combate contra uma

ampla variedade de patógenos sem exigir prévia exposição aos mesmos. O macrófago possui a habilidade de apresentar antígenos a outras células, sendo denominado de célula apresentadora de antígeno (APC – *antigen presenting cells*). Os granulócitos, ou leucócitos polimorfonucleares, constituem um grupo de células com núcleos multilobulados e grânulos citoplasmáticos contendo elementos químicos (enzimas). Os neutrófilos são os elementos celulares mais numerosos e importantes da resposta imune inata, e têm a capacidade de fagocitar os patógenos. Os eosinófilos e as células NK promovem morte da célula alvo que alberga o agente agressor no seu interior (JANEWAY et al., 2006; ROCHA; GORESCU; BELTRAME, 2007; BORGHETTI et al., 2009).

Os linfócitos são células que participam da resposta imune adaptativa, sendo responsáveis por reconhecer e eliminar os agentes patogênicos. Esta resposta imune é específica e tem como característica o desenvolvimento da memória imunológica, ou seja, o reconhecimento do estímulo antigênico caso ele entre novamente em contato com o organismo. Os dois tipos principais de linfócitos, os LB e LT, expressam em suas superfícies receptores de antígenos altamente específicos para um dado determinante antigênico. A grande maioria dos linfócitos encontra-se em estado inativo, e desenvolverá atividade quando houver algum tipo de interação com um estímulo antigênico, etapa necessária para a ativação e proliferação linfocitária. A interação, ou o reconhecimento imunológico, se baseia na complementaridade entre a região do receptor e uma porção do antígeno chamada epítopo (SPRENT, 1994; AHMED; SPRENT, 1999).

Os LB reconhecem um antígeno estranho por meio do receptor do LB (BCR – *B cell receptor*), que é um anticorpo ligado à membrana e que será secretado quando a célula for ativada. Estas células ativadas por um agente antigênico se dividem e se diferenciam em plasmócitos. As principais funções do LB incluem a produção e secreção de anticorpos como resposta aos agentes patogênicos. Cada LB produz um tipo específico de anticorpo, capaz de reconhecer e se ligar a um determinado epítopo. A secreção e ligação de anticorpos aos antígenos constituem formas de sinalizar às outras células para que estas fagocitem, processem e/ou removam a substância ligada, impedindo a interação com o tecido do hospedeiro. A produção de anticorpos pelos LB contra um determinado agente infeccioso permite determinar que a sua presença em um indivíduo reflete as infecções às quais o mesmo já foi exposto (CASTRO, 2001; MACHADO et al., 2004).

O LT, assim chamado pela maturação no timo, tem como funções a regulação das ações de outras células e o ataque direto às células infectadas do organismo hospedeiro. Os LT podem ser divididos em dois grandes grupos: LT auxiliares (LTCD4+ – Linfócito T *helper*) e LT citotóxico (LTCD8+ – Linfócito T *killer*). A população de células LTCD4+ é heterogênea, sendo constituída de quatro subpopulações: as células Th1, Th2, Th3 e Tr1. A resposta Th1 está relacionada com a defesa de protozoários, bactérias intracelulares e vírus, enquanto a resposta Th2 é mais efetiva contra os helmintos e bactérias extracelulares. As células Th3 e Tr1 são células regulatórias e estão envolvidas na modulação da resposta imune, impedindo ou diminuindo as conseqüências das reações de hipersensibilidade e das doenças auto-imunes (MOSMANN; SAD, 1996; MACHADO et al., 2004)

Diferentemente do BCR, que pode interagir com moléculas antigênicas livres em solução, o receptor de antígeno do LT (TCR – *T cell receptor*) reconhece apenas os antígenos processados ou ligados a uma molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHC – *major histocompatibility complex*), presente na superfície celular (MOSMANN; COFFMAN, 1989; DREHER, 1995; MACHADO et al., 2004). As moléculas de MHC são classificadas como classe I (MHC-I) e classe II (MHC-II) e encontradas, respectivamente, em todas as células nucleadas ou somente nas APCs, como por exemplo, os LB, os macrófagos e as células dendríticas. Os LTCD8+ reconhecem antígenos de origem intracelular ligados ao MHC-I, permitindo a detecção e destruição de células infectadas por vírus. Por outro lado, os LTCD4+ interagem com antígenos ligados ao MHC-II a partir de um processo de fagocitose. As APCs capturam uma proteína antigênica do ambiente e a processam de forma a fracioná-la e ligá-la ao MHC-II. O complexo MHC-II/partícula antigênica é transportado para a superfície da APC, onde pode interagir com o LTCD4+ (GERMAIN, 1994; GERMAIN, 1995; BANCHEREAU; STEINMAN, 1998).

Um dos efeitos mais importantes da comunicação entre linfócitos e APCs é a secreção de interleucina-1 (IL-1) pela APC ativada. Primeiramente, a IL-1 age de forma autócrina, aumentando a expressão de moléculas do MHC de classe II e de várias moléculas de adesão na superfície da APC, o que aumenta o contato célula-célula e aumenta a apresentação do antígeno. Simultaneamente, a IL-1 age de forma parácrina no LTCD4+, induzindo a secreção de interleucina-2 (IL-2) e a expressão do receptor de IL-2. O principal efeito da IL-2 é autócrino, uma potente ação mitogênica para o LT e essencial para sua resposta proliferativa. A proliferação

de linfócitos é requerida pelo sistema imune para assegurar sua expansão clonal frente aos antígenos em velocidade suficiente para atuar de forma eficiente no combate às infecções (MORAES, 2007).

As células envolvidas na resposta imune possuem função reguladora, claramente promovendo ou suprimindo a resposta de defesa. A liberação de substâncias imunomoduladoras pelas células é responsável pelo mecanismo de autoregulação para que a resposta de defesa seja apropriada, tanto qualitativamente quanto quantitativamente. Assim, a imunomodulação é um procedimento que altera o sistema imune e interfere nas funções, apresentando como resultado a imunossupressão ou a imunoestimulação (MILLER; GONÇALVES, 1998; PATWARDHAN et al., 1990; MAKARE et al., 2001). A imunomodulação que acontece *in vivo* para a manutenção da integridade do organismo propiciou a descoberta de substâncias imunomoduladoras e tornou possível a manipulação do sistema imune a favor de um estado saudável, seja por meio da imunoestimulação ou então da imunossupressão (SPRENT, 1994; NUNES-PINHEIRO et al., 2003).

Os fármacos que modulam a ativação do sistema imune eram conhecidos até recentemente como imunossupressores e tiveram o uso e o desenvolvimento ampliado devido ao avanço da Imunologia Clínica (LIMA, 2007). Atualmente a terapia imunológica envolve o uso de imunomoduladores de origem vegetal, microbiana e sintética, além das proteínas derivadas da ativação do próprio sistema imune (NUNES-PINHEIRO et al., 2003). Os imunomoduladores podem provocar alterações em diversas funções do sistema imune, como a produção de citocinas específicas, alteração na fagocitose, quimiotaxia e proliferação celular (NUNES-PINHEIRO et al., 2003, LIMA, 2007). Desta forma, a identificação de compostos com atividade imunomoduladora na eliminação e controle das doenças tem sido área crescente de estudo.

O efeito dos compostos imunomoduladores sobre a proliferação de linfócitos *in vitro* tem sido diretamente relacionado com a defesa específica do organismo frente a agentes estranhos (SPRENT, 1994; AHMED; SPRENT, 1999; BAUHOFER et al., 2008). A linfoblastogênese, ou teste de linfoproliferação, é utilizado para avaliar o efeito imunomodulador de vários compostos naturais e sintéticos. O teste se baseia na incubação de linfócitos e mitógenos como PHA, concanavalina A e *pokeweed mitogen*, bem como antígenos específicos obtidos a partir de diversos agentes agressores (MILLER; GONÇALVES, 1998; PATWARDHAN et al., 1990;

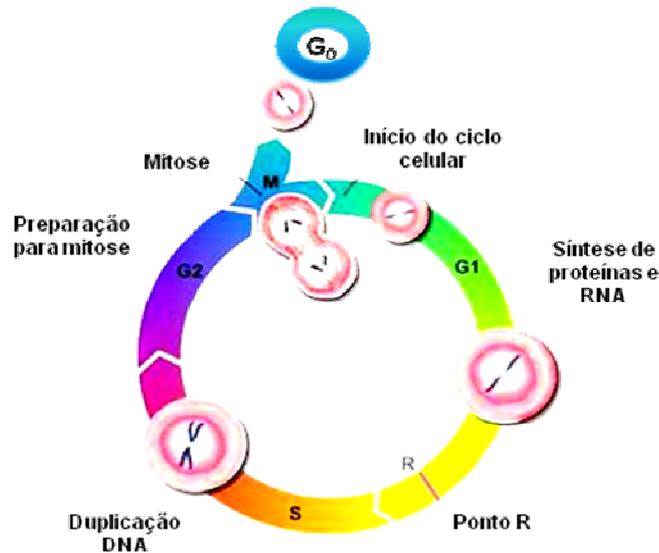
MAKARE et al., 2001). A concanavalina A e PHA são mitógenos seletivos para os LT, enquanto que o *pokeweed mitogen* é um mitógeno de LT e LB. Esta relativa seletividade mitogênica depende da heterogeneidade no grupo de carboidratos expressos nas glicoproteínas das células, enquanto que o efeito mitogênico está condicionado a habilidade de ligação e reação cruzada com os receptores envolvidos na ativação do LT (PAUL, 2001).

Os mitógenos utilizados no teste de linfoproliferação induzem a mitose da célula ao ligar-se às inúmeras glicoproteínas expressas na membrana plasmática. A partir desta ligação do mitógeno às glicoproteínas de superfície celular relacionadas ao reconhecimento antigênico, ocorre a ativação de proteínas tirosina quinase e, por meio desta, a fosforilação de uma gama de proteínas intracelulares que culmina com o aumento de  $Ca^{++}$  intracelular. Este último juntamente com proteína quinase são dois importantes mediadores dos eventos subseqüentes que resultam na produção de IL-2 e, retirada da célula da fase de repouso ( $G_0$ ) e por fim, a mitose (STITES; TER; PARSLOW, 1994; PAUL, 2001). Em resumo, a interação dos LT com antígenos ou mitógenos inicia uma cascata de eventos bioquímicos que induz os LT a iniciarem o ciclo celular, que se segue com proliferação e diferenciação celular (AJCHENBAUM et al., 1993; CHEN et al., 2009).

### **3.2 Proliferação Celular e Citotoxicidade**

O ciclo celular compreende todo o período entre duas divisões mitóticas, e é controlado por uma série de moléculas presentes no núcleo celular, que determinam se a célula entrará em mitose, diferenciação, repouso ou morte. Este evento consiste em uma sequência de dois processos básicos: a divisão nuclear (mitose) e divisão citoplasmática (citocinese) (STITES; TER; PARSLOW, 1994; PAUL, 2001; PELÚZIO et al., 2006). Para a evolução dos processos a célula realiza a síntese de proteínas e ácido ribonucléico (RNA) (fase  $G_1$ ). Nesta fase há um ponto crítico, denominado de ponto de restrição (Ponto R), a partir do qual a célula pode seguir o ciclo para a divisão ou sair e entrar em repouso. Logo após, ocorre a duplicação do DNA (fase S) e a célula duplica precisamente seus cromossomos, tornando-se tetraplóide ( $4n$ ). Com o DNA duplicado, a célula prepara-se para a mitose (fase  $G_2$ ). O próximo estágio é a mitose e a citocinese (fase M), nesta fase ocorre a divisão celular em

duas células filhas diplóides ( $2n$ ). Realizada a mitose, as células filhas imediatamente entram em repouso ou se preparam para reiniciar outro ciclo (fase  $G_0$ ) (Figura 01) (RIVOIRE et al., 2006; WOLKWEIS, 2006).



**Figura 01.** Esquema representativo das fases do ciclo celular.

Fonte: Adaptado de GAGE (2007).

O controle do ciclo celular é efetuado por uma família de proteínas conhecidas como quinases ciclina-dependentes ou CDKs (*cyclin-dependent kinases*), cuja atividade varia conforme a célula progride no seu ciclo celular. As alterações na atividade dessas proteínas levam a mudanças cíclicas na fosforilação de proteínas intracelulares que iniciam ou regulam os principais eventos do ciclo celular, a replicação do DNA, a mitose e a citocinese. Por sua vez, as mudanças cíclicas que ocorrem na atividade das CDKs são controladas por outras proteínas, as ciclinas. Diferentemente dos níveis constantes das CDKs, as ciclinas apresentam ciclos de síntese e degradação que alteram o nível intracelular, resultando no estabelecimento e ativação cíclicos dos complexos ciclina-CDKs. Esta ativação, por sua vez, aciona os eventos do ciclo celular (ALBERTS et al., 2002).

O estímulo sobre a proliferação celular pode ser estudado através de diversas metodologias, como: incorporação de timidina marcada com o isótopo radioativo trítio (timidina tritiada) ao DNA celular (GILLIS et al., 1978); redução do azul de

tetrazólio [MTT, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MOSMANN, 1983); incorporação lisossomal do vermelho neutro (BORENFREUND, 1992); expressão da enzima ornitina descarboxilase (GAREWAL et al., 1988); expressão de receptores de membrana, como os receptores para IL-2 e marcador precoce de ativação celular CD69 (CENTNER; WECK, 1995; BUENO et al., 1999); dosagem de citocinas, como a IL-2 (VARGA et al., 1999); e mensuração de antígenos nucleares, como o KI-67 e o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) (GRAY et al., 1992).

A incorporação de timidina triciada é uma técnica amplamente usada, mas decorrem limitações técnicas e éticas, principalmente em relação ao destino do resíduo radioativo gerado pelo ensaio. A timidina, um nucleosídeo que é formado quando uma timina é ligada a um anel de desoxirribose, se ofertada às células em divisão, pode ser agregada ao DNA durante a fase S do ciclo celular. Esta técnica revela-se como marcadora de divisão celular e, conseqüentemente, está relacionada à proliferação celular (GILLIS et al., 1978; BUTTKE; MCCUBREY; OWEN, 1993; MURIGANDE et al., 2009).

A redução do MTT é um método de avaliação da viabilidade celular. O princípio deste teste está relacionado à atividade da succinato desidrogenase mitocondrial das células vivas e metabolicamente ativas, que reduz o MTT e o converte em sal formazan, formando cristais de coloração azulada que, após dissolução, permite a quantificação da coloração formada em espectrofotômetro a 540-590 nm. Desta forma, a coloração gerada está diretamente ligada com a viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

O vermelho neutro é um corante solúvel em água que atravessa a membrana celular e se concentra nos lisossomas das células vivas, fixando-se por ligações eletrostáticas hidrofóbicas nos sítios aniônicos da matriz lisossomal. Considerando que o dano nas membranas celulares e lisossomais resultam no decréscimo de captura e ligação do vermelho neutro, é possível distinguir entre células vivas e mortas pela medida da intensidade de cor final no espectrofotômetro a 570 nm (BORENFREUND, 1992; ROGERO et al., 2003; DAGUANO; SANTOS; ROGERO, 2007).

A expressão da ornitina descarboxilase é outra ferramenta laboratorial para avaliar a proliferação celular (GAREWAL et al., 1988). Esta enzima catalisa a descarboxilação do aminoácido ornitina, o principal precursor das poliaminas endógenas envolvidas nos processos de ativação da síntese de RNA e da síntese

protéica (CARTER, 1994; SEILER et al., 1996; THOMAS; THOMAS, 2001; ZHAO et al., 2009). Os níveis intracelulares de poliaminas são mantidos dentro de um limiar muito estreito, e a diminuição nos níveis de poliaminas interfere no crescimento celular, enquanto o excesso pode ser tóxico (DAVIS, 1990; ZHAO et al., 2009).

A detecção da expressão de proteínas de membrana relacionados com a ativação celular, como o receptor para IL-2 (r-IL2) e o CD69, também permite avaliar o estímulo promovido sobre a proliferação celular. A expressão do rIL-2 está relacionada com a atividade da própria citocina, enquanto que proteína CD69 é expressa precocemente na membrana do LT estimulado principalmente pela IL-2 e interleucina-12 (IL-12). Estas duas proteínas presentes na superfície dos LT ativados usualmente são pesquisadas por citometria de fluxo, enquanto que para a dosagem da IL-2 geralmente se utiliza ensaios imunoenzimáticos, como o ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) (CENTNER; WECK, 1995; SIMMS; ELLIS, 1996; BUENO et al., 1999; KETHEESAN et al., 2002). Na citometria de fluxo as células previamente marcadas com anticorpos específicos marcados com fluorocromos contra o epítipo pesquisado são submetidas a um feixe de luz que intercepta cada célula isoladamente. A dispersão de luz é detectada frontalmente (*forward scattering*) e lateralmente (*side scattering*), revelando informações importantes, tais como dimensão celular, complexidade, morfologia e componentes celulares. Simultaneamente o laser incide nos fluorocromos presentes no anticorpo que está ligado ao antígeno da membrana celular devido a reação antígeno-anticorpo e estes emitem uma luz que é detectada pelos detectores de fluorescência, identificando a presença do epítipo pesquisado (RIESEBERG, 2001; RAHMAN, 2006).

A presença do PCNA e KI-67 permite estimar uma relação com o desenvolvimento celular. O PCNA expressa a progressão da transição da fase G<sub>1</sub> para fase S, mas pode ocorrer em situações não-proliferativas, como no reparo do DNA, determinando resultado falso-positivo (GRAY et al., 1992). O antígeno nuclear KI-67 está intimamente associado com proliferação celular, presente em quase todas as fases do ciclo celular com concentração máxima na fase M e praticamente ausente na fase G<sub>0</sub>, se concentrando na periferia dos cromossomos durante a dissociação nuclear da mitose (BROWN; GATTER, 2002; WIESNER et al., 2009). Embora a função precisa do KI-67 no ambiente celular não seja reconhecida até o momento, existem especulações de que ele se ligue aos cromossomos na divisão celular e participe da dissolução nuclear, uma vez que a fosforilação e

desfosforilação desta proteína coincidem com o trânsito de células pela mitose (BROWN; GATTER, 2002; BRUEY et al., 2009). Os tecidos que apresentam regeneração constante (intestino, pele, testículo) costumam apresentar maior marcação nos compartimentos proliferativos, ao passo que tecidos não proliferativos não apresentam marcação ou o fazem de forma escassa. Ainda, o processo de reparo do DNA pela célula não parece associar-se com a expressão do KI-67, o que lhe confere vantagem em relação ao PCNA (WOLKWEIS, 2006).

O locus gênico do KI-67 está localizado no cromossomo 10 e é composto por aproximadamente 30.000 pares de bases organizados em 15 éxons com tamanhos de 67 a 6845 pares de base e 14 íntrons com tamanhos de 87 a 3569 pares de base. Este gene transcreve duas formas predominantes do KI-67, uma de 320 e outra de 359 kilodaltons (kDa) (GRAY et al., 1992; ENDL; GERDES, 2000). A expressão do KI-67 é claramente evidenciada por imunocitoquímica, metodologia que tem se destacado entre os outros métodos devido à elevada acurácia e maior facilidade técnica. Deste modo, a determinação da percentagem de células marcadas positivamente para KI-67 tem sido utilizada para quantificar a atividade proliferativa de determinado tecido ou tumor e avaliar o fator prognóstico. (WOLKWEIS, 2006; WIESNER et al., 2009).

A técnica de imunocitoquímica surgiu em 1941 e tem como princípio a imunodeteção, isto é, a ligação específica de um anticorpo ao antígeno expresso em células fixadas em lâminas, mostrando a localização citológica deste antígeno. A imunocitoquímica tem definido um espectro de possibilidades inovadoras na detecção de proteínas celulares e que são determinadas pelas características de sensibilidade e especificidade da interação antígeno-anticorpo. Os avanços técnicos na sensibilidade foram centrados em torno da capacidade de detecção de antígenos em pequena quantidade, enquanto que na especificidade as melhorias foram evidenciadas na natureza e meios de triagem e na produção de anticorpos (ORCHARD, 2006).

Os ensaios realizados por imunocitoquímica também norteiam a identificação do mecanismo de morte celular envolvido em um processo de citotoxicidade a partir da pesquisa de proteínas relacionados às vias de morte celular, como as caspases. O processo de morte celular depende de múltiplos fatores, como o sítio de infecção, a natureza e inóculo do agente agressor. Por exemplo, em células epiteliais e linfócitos infectados, a morte se dá por apoptose, enquanto os macrófagos e células

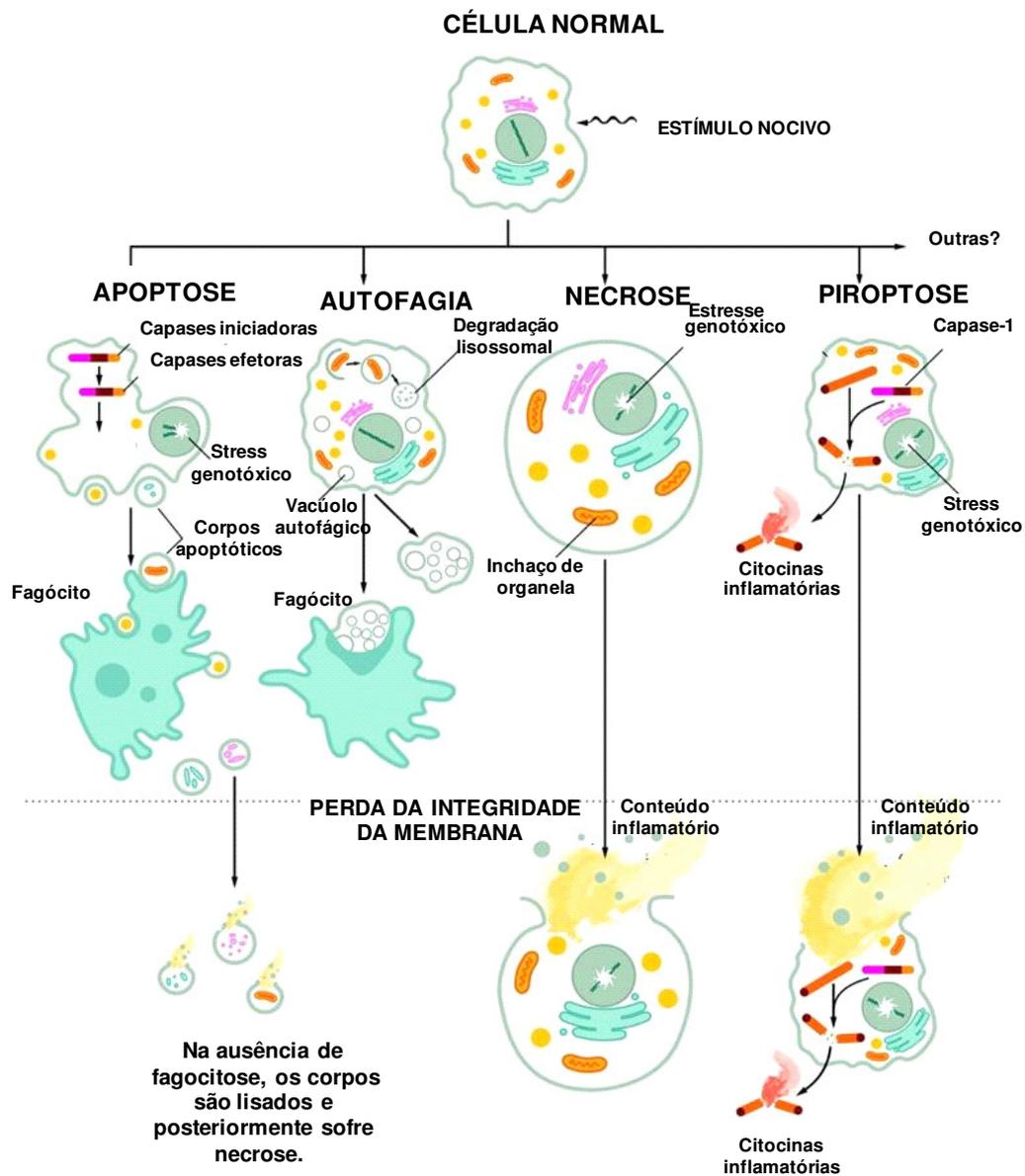
dendríticas morrem preferencialmente por piroptose e em alguns casos por apoptose. Vários processos de morte celular têm sido descritos, conhecidos como necrose, piroptose, autofagia e apoptose (Figura 02), e que se distinguem quanto às moléculas indutoras, eventos bioquímicos e características morfológicas. Na apoptose e autofagia não há exposição do conteúdo citoplasmático e liberação de citocinas e, portanto, não há favorecimento do processo inflamatório. Em contrapartida, os eventos da piroptose e necrose são potentes indutores do inflamatório (LABBÉ; SALEH, 2008). Quanto aos eventos bioquímicos, a LDH, uma enzima da classe das oxirredutases que cataliza a redução reversível do piruvato a lactato em presença da coenzima NAD<sup>+</sup> (nicotinamida adenina dinucleotídeo), que atua como doador e aceptor de hidrogênio. Esta enzima está presente em todas as células do organismo, sendo mais abundante no músculo esquelético, miocárdio, fígado, eritrócitos, rins, ossos e pulmões. (CABAUD; WRÓBLEWSKI, 1981). A LDH auxilia na pesquisa de viabilidade celular, pois faz parte da membrana celular, organelas e conteúdos citosólicos, os quais sofrem alterações durante todas as vias de morte celular (SOARES et al., 2002).

A necrose é frequentemente associada com condições patológicas sendo observada durante isquemia/reperfusão, que pode conduzir a injúria em órgãos, como coração, fígado, rim e intestino. A morte celular por necrose também pode contribuir para a excitotoxicidade, que pode estar envolvida no acidente vascular cerebral, traumatismo crânio-encefálico e distúrbios neurodegenerativos. Durante a infecção de alguns patógenos, como os vírus HIV-1 e Coxsackie do grupo B, pode ocorrer a morte celular necrótica (DUPREZ et al., 2009).

Em geral, a necrose é considerada como um evento acidental descontrolado de morte celular caracterizada pelo intumescimento das organelas e citoplasma, agregação da cromatina, perda da integridade da membrana e extravasamento do conteúdo celular para o meio extracelular. Esta via de morte devido à ativação de fator nuclear  $\kappa$  (NF- $\kappa$ B) e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) secreta citocinas inflamatórias (DUPREZ et al., 2009). Estes eventos de sinalização bioquímica do processo necrótico possibilitam sua identificação através da detecção de inúmeros marcadores e morfologia celular (CABAUD; WRÓBLEWSKI, 1981; SOARES et al., 2002).

A piroptose é uma via de morte celular que foi delineada a partir de diversas pesquisas sobre a diferente forma da indução de morte celular pelos patógenos

*Salmonella* e *Shigella*, inerentemente pró-inflamatória. Esta via de morte celular é unicamente vinculada com a caspase-1 e não ativa as caspases-3, -6 ou -7, indicando a independência da via apoptótica. A caspase-1 promove a produção das citocinas inflamatórias pró-IL-1 e pró-IL-18, para suas posteriores ativações. A dependência e/ou ativação da caspase-1 foi observada durante a morte celular nos sistemas imune, nervoso central e cardiovascular. A célula piroptótica tem sua morfologia pouco definida, no entanto estudos descrevem que as células em piroptose apresentam uma distinta combinação de características físicas compartilhadas com os processos de apoptose e necrose. As células em piroptose apresentam deficiência no potencial de membrana mitocondrial, fragmentação do DNA e condensação nuclear, assim como as células apoptóticas. Como no processo de necrose, na piroptose ocorre a ruptura da membrana plasmática com extravasamento do conteúdo intracitoplasmático desenvolvendo um potente evento inflamatório (Figura 02) (LABBÉ; SALEH, 2008; DUPREZ et al., 2009).



**Figura 02.** Processos de morte celular por apoptose, autofagia, necrose e piroptose.

Fonte: Adaptado de FINK; COOKSON (2005).

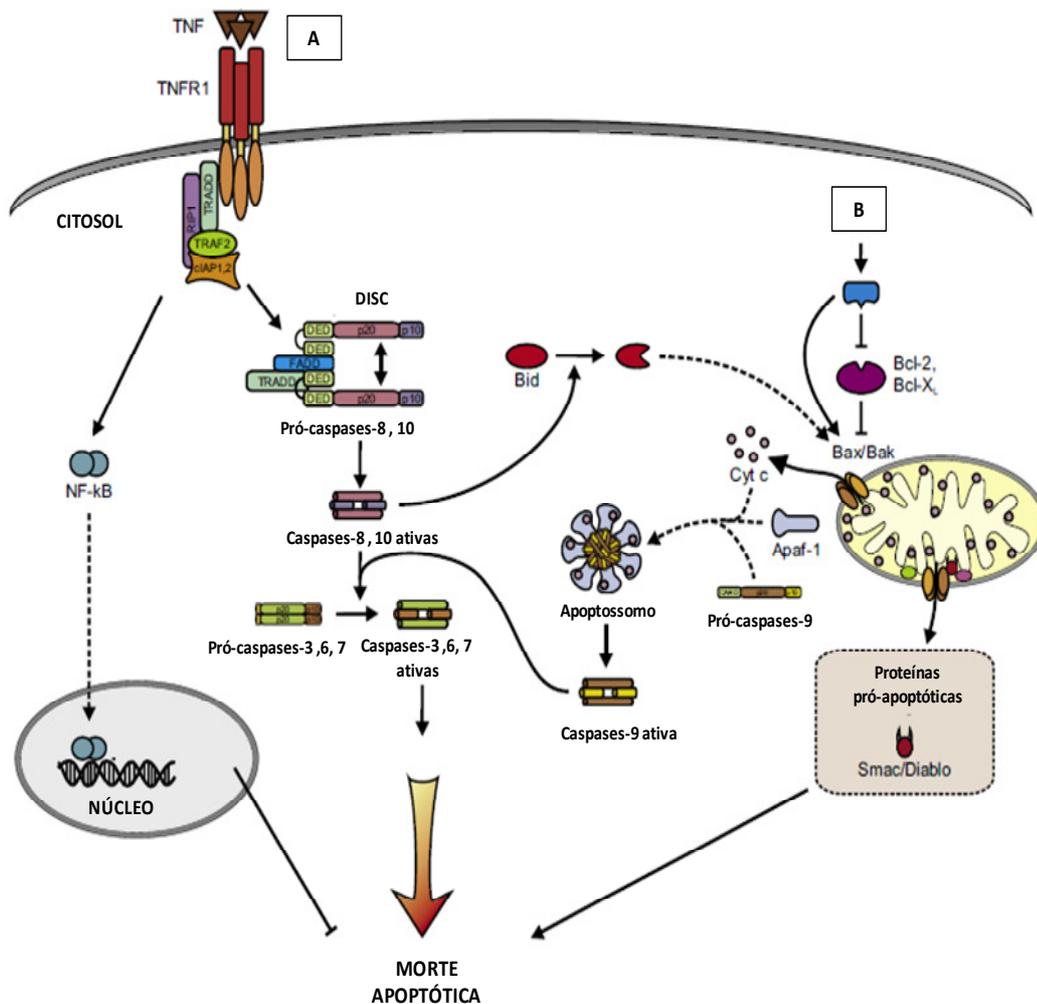
A autofagia é um processo de morte programada rigorosamente regulado, no qual ocorre uma resposta a um estresse metabólico resultando na degradação de componentes intracelulares, os quais são capturados por membranas originando os autofagossomos (Figura 02). Após a fusão dos autofagossomos as lisossomos ocorre o deslocamento do conteúdo autofágico para o lúmen lisossomal e a degradação pelas hidrolases (FINK; COOKSON, 2005; LABBÉ; SALEH, 2008; DUPREZ et al., 2009). As características morfológicas da morte autofágica incluem

vacuolização, degradação do conteúdo citoplasmático e condensação da cromatina. Recentemente, a autofagia mostrou-se envolvida no processamento de antígeno pelas APCs devido à síntese de proteínas citosólicas e apresentação destas pelo MHC-II, ligando esta via de morte celular à imunidade inata e adaptativa. Portanto, o desencadeamento de autofagia de células infectadas pode levar à estimulação de LTCD4+ específicos para o patógeno, indicando um mecanismo a ser explorado na investigação por novas terapias (LABBÉ; SALEH, 2008).

A indução da morte celular por apoptose é um processo essencial para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, tendo importância na eliminação de células senescentes ou defeituosas (Figura 02). Esta é a via de morte programada melhor descrita na literatura, mediada por diferentes moléculas envolvidas na transdução de sinais bioquímicos chamadas caspases. As caspases pertencem a uma família de aspartato-cisteína proteases específicas. Em humanos há cerca de dezoito caspases organizadas em duas subfamílias, sendo uma delas responsável por morte apoptótica e outra por processo inflamatório. As caspases que intercedem os eventos da apoptose podem ser divididas em dois subgrupos: caspases iniciadoras (caspases-2, -8, -9 e -10) e caspases efetoras (caspases-3, -6 e -7). As caspases-1, -4, -5 e -12 são conhecidas como caspases inflamatórias por razões estruturais, mas somente a caspase-1 está diretamente envolvida na maturação de citocinas. As caspases sintetizadas como pró-enzimas são ativadas quando clivadas por caspases maduras, ou por mudança conformacional e indução de autocatálise (PETER; KRAMMER, 2003; ECKHART et al., 2008; LABBÉ; SALEH, 2008; DUPREZ et al., 2009).

A ativação das caspases pode ocorrer por via intrínseca ou extrínseca (Figura 03). A via intrínseca é ativada por estresse intracelular ou extracelular, como a privação de fatores de crescimento, dano ao DNA, hipóxia e ativação de oncogenes. A mitocôndria é a principal organela mediadora de morte celular pela via da apoptose, que é controlada pela família de proteínas Bcl-2. Os membros antiapoptóticos desta família de proteínas, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 e A<sub>1</sub>, mantêm a integridade mitocondrial impedindo a ação dos membros proteínas pró-apoptóticas da mesma família de proteínas, Bax, Bad, Bak e Bcl-5, que após um estímulo induzem a formação de um canal na mitocôndria liberando o citocromo c (cyc c) para o citosol. O cyc c se associa com o fator de ativação de proteases associadas à apoptose 1 (APAF-1) e ATP, formando a plataforma de recrutamento e ativação da

pró-caspase-9, estrutura é conhecida como apoptossomo. Uma vez que a caspase-9 foi ativada, toda a cascata das caspases é acionada para a execução da morte celular apoptótica. Também são liberadas pela mitocôndria o AIF (fator de indução de apoptose) e a SMAC/Diablo que neutralizam vários inibidores de caspase, como as proteínas anti-apoptóticas (IAPs) (HAMACHER et al., 2008; DUPREZ et al., 2009; RASTOGI; RICHA; SINHA, 2009).



**Figura 03.** Representação da sinalização por via extrínseca (A) e intrínseca (B) do processo de morte por apoptose.

Fonte: Adaptado de DUPREZ et al. (2009).

A via extrínseca da apoptose é iniciada pela estimulação dos receptores da morte, pertencentes à família de receptores de necrose tumoral, como o receptor do fator de necrose tumoral do 1 (TNFR1) e o receptor Fas (CD95) (Figura 03). A

apoptose é desencadeada pela formação do complexo de sinalização de morte (DISC). Neste complexo, algumas proteínas Fas unem-se após serem ativadas, formando um local de ligação para a proteína FADD (Fas associado com o domínio de morte) que, por sua vez, possuem um domínio da morte ativador das caspases-8 e -10 (caspases iniciadoras). As caspases iniciadoras ativam as caspases-3 e -7, as quais são efetoras do processo apoptótico. O receptor da morte também pode induzir a permeabilidade da mitocôndria e ativação da caspase-9 através da sinalização com Fas, que aciona a proteína Bid (família Bcl-2) (LABBÉ; SALEH, 2008; DUPREZ et al., 2009; RASTOGI; RICHA; SINHA, 2009).

A ativação das caspases pelas vias intrínseca e extrínseca inicia o processo de desnaturação das proteínas do citoesqueleto e da matriz nuclear. Morfologicamente, a apoptose está associada com a retração nuclear, fragmentação do DNA, condensação da cromatina, projeções citoplasmáticas e formação de corpos apoptóticos (Figura 02). Estes corpos apoptóticos são fagocitados e, diferentemente da necrose e piroptose, não ocorre processo inflamatório, sendo considerada silenciosa imunologicamente (LABBÉ; SALEH, 2008; RASTOGI; RICHA; SINHA, 2009). Entre as caspases, a caspase-3 representa a principal efetora da maquinaria apoptótica. A síntese desta protease ocorre na forma de uma pró-caspase inativa de 35 kDa, que uma vez ativada gera duas subunidades (14-21 kDa e 10-13 kDa) utilizadas na clivagem seletiva de substratos vitais da morte apoptótica (ALAM et al., 1999; RASTOGI; RICHA; SINHA, 2009).

A pró-caspase (35 kDa) e a maior subunidade (14-21 kDa) podem ser detectadas pela técnica de *western blotting*, método de alta especificidade e sensibilidade referida como “padrão ouro” na detecção de proteínas. Nesta técnica, as proteínas extraídas de células ou tecidos e separadas por eletroforese são transferidas para uma membrana de nitrocelulose, nylon ou fluoreto de polivinilideno (PVDF). A detecção da proteína ocorre por meio de um anticorpo específico para o epítipo de interesse, sendo este revelado por um anticorpo secundário marcado geralmente com enzimas. A degradação enzimática por métodos colorimétricos ou quimioluminescente permite a visualização da proteína pesquisada no material analisado (BONSING et al., 1997; CLAUSEN, 1997; OTSUKI; LI; SHIBATA, 2003; AMBROZ, 2006).

A caspase-3 é expressa em diferentes tipos celulares, inclusive nas células de origem linfocítica, nas quais desempenham um importante papel na homeostase dos

LT. Diferentes estudos reportaram a existência de apoptose prejudicada em LT de pacientes com doenças auto-imunes, como anemia hemolítica e trombocitopenia (VENDRAME et al., 2006). Mukae e colaboradores (1995), Kawakami e colaboradores (1997) e Kadota e colaboradores (2005) evidenciaram o envolvimento da apoptose na redução do número de linfócitos em lavado bronco-alveolar de pacientes com bronquite difusa em tratamento com antibacterianos da classe dos macrolídeos, incluindo claritomicina, azitromicina e josamicina. Neste contexto, leucócitos de sangue periférico de pacientes com asma brônquica estimulados *in vitro* com *Dermatophagoides farinae* apresentaram apoptose induzida por roxitromicina, enquanto a cefazolina e ampicilina não mostraram o mesmo efeito (OGAWA et al., 2003). Jun, Kim e Song (2003) também comprovaram a atividade apoptótica da roxitromicina, além de demonstrar que o ciprofloxacina induz apoptose em células Jurkat.

Diversos antibacterianos como as penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos, cloranfenicol, sulfametaxazol, trimetropim, ácido nalidíxico e 5-fluorocitosina apresentaram efeito inibitório sobre a proliferação de linfócitos humanos *in vitro*, alguns destes prejudicando inclusive o desenvolvimento da resposta imune *in vivo* (FORSGREN; BANCK, 1978; BANCK; FORSGREN, 1979; FORSGREN, 1991). Entretanto, as fluorquinolonas tem apresentado diferentes alterações sobre o sistema imune. Alguns estudos descrevem um efeito de imunoproliferação nas diferentes funções do sistema imune, como a produção de citocinas específicas, alteração na fagocitose, quimiotaxia e proliferação celular, mas outros mostram um efeito imunossupressor e mesmo citotóxico (DALHOFF; SHALIT, 2003; KLIMPEL et al., 2008).

Além da procura por novos compostos com ótima atividade antibacteriana, também é de interesse a ação destes compostos sobre o sistema imune. Isto é justificado pela possibilidade de interação entre o agente antibacteriano e a bactéria, assim como entre a bactéria e sistema imune e ainda entre o agente antibacteriano e o sistema imune. A atividade imunomodulatória do agente antibacteriano pode ser exercida sobre diversos eventos celulares e humorais, causando inibição ou ativação do sistema imune e, desta forma, facilitando o estabelecimento da bactéria ou auxiliando na eliminação da mesma (LABRO, 1997; LABRO, 1998; LABRO, 2000; SHALIT et al., 2001; JUN et al., 2003). O efeito imunomodulatório de antimicrobianos inclui alterações na fagocitose, quimiotaxia, liberação de endotoxinas,

restabelecimento hematopoiético após imunossupressão, proliferação celular, produção de citocinas específicas e efeito antitumoral em certas linhagens celulares (CHOI et al., 2003).

Forsgren e colaboradores (1986) evidenciaram, por meio da incorporação de timidina triciada, a proliferação de linfócitos humanos induzida pelo norfloxacin, ciprofloxacina, ofloxacina, difloxacina e sarafloxacina nas concentrações de 0,2 µg/mL a 50 µg/mL quando incubados na presença de PHA, sendo que o norfloxacin na concentração de 50 µg/mL induziu menor crescimento celular em relação às demais concentrações testadas. Um ano depois, Forsgren, Schlossman e Tedder (1987), testaram dez diferentes quinolonas (1,56 µg/mL, 6,25 µg/mL e 25 µg/mL) no cultivo de linfócitos humanos estimulados com PHA, tendo oito delas, inclusive o norfloxacin, apresentado atividade imunoproliferativa. Em 2003, Eriksson, Forsgren e Riesbeck descreveram que a imunoproliferação celular e humoral de linfócitos humanos estimulados com PHA e tratados com ciprofloxacina (5 e 80 µg/mL) apresentavam aumento das expressões gênicas de citocinas, receptores, sinais de transdução, moléculas de adesão, reguladores de ciclo celular, moléculas relacionadas a apoptose e a família de TNF. Outro estudo realizado por Schmid (2004), também evidenciou a resposta proliferativa de células mononucleares ao norfloxacin e a outras sete quinolonas, mas na ausência de estímulo mitogênico.

Estudos com ciprofloxacina realizados por Bailly e colaboradores (1990), Bailly e colaboradores (1991), Shalit (1991), Stunkel, Hewlett e Zeiler (1991) e Riesbeck e Forsgren (1994), relataram que o antimicrobiano nas concentrações de 1 a 30 µg/mL estimulou a produção de IL-1 e IL-2, bem como o crescimento de células esplênicas murinas e de linfócitos humanos quando incubados simultaneamente à PHA. Devido ao reconhecimento do ciprofloxacina como agente imunomodulador, Huang e colaboradores (2008), demonstraram *in vivo* a relação existente entre a propriedade imunomodulatória do ciprofloxacina e o efeito imunoprotetor em ratos com lesões pulmonares induzidas por lipopolissacarídeo (LPS). A produção de anticorpos e indução da imunidade *in vivo* por levofloxacina, outro representante da classe das quinolonas, foi relatada após a infecção por *Francisella tularensis* via intra-nasal (KLIMPEL et al., 2008).

Ao contrário dos relatos de imunoestimulação promovido pelos antimicrobianos, Gollapudi e colaboradores (1986) relataram que alguns representantes das fluorquinolonas, como difloxacina e sarafloxacina nas

concentrações de 1 a 25 µg/mL inibiram da proliferação de células mononucleares humanas estimuladas pelos mitógenos concanavalina A e OKT3. Igualmente, ciprofloxacina nas concentrações de 5 a 125 µg/mL não interferiu no crescimento *in vitro* de células mononucleares humanas estimuladas com concanavalina A e PHA. Na mesma pesquisa, as células esplênicas obtidas de ratos tratados com ciprofloxacina a 7 µg/mL apresentaram uma discreta supressão da proliferação celular frente aos mitógenos concanavalina A e PHA. Outro representante das fluorquinolonas, o moxifloxacina (1 a 10 µg/mL) promoveu imunomodulação humoral sobre células mononucleares humanas estimuladas com LPS, inibindo a secreção de IL-1, IL-8 e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (ARAUJO; SLIFER; REMINGTON, 2000).

Choi e colaboradores (2003) avaliaram células mononucleares estimuladas com lipopolissacarídeo, ácido lipoteicoico, *Streptococcus pneumoniae* e *E. coli* na presença e ausência dos antibacterianos moxifloxacina, levofloxacina e ceftriaxona, revelando não haver interferência destas na produção de TNF- $\alpha$  e IL-6 e tampouco morte celular. Outros estudos *in vitro* com norfloxacina, ofloxacina, pefloxacina, ciprofloxacina e fleroxacin em concentrações terapêuticas também indicaram não haver efeito significativo sobre as funções imunológicas de quimiotaxia, metabolismo oxidativo ou mesmo fagocitose (BOOGAERTS et al., 1986; PUIVERER; PETERS, 1986; LOMBARD; DESCOTES; EVREUX, 1987; VAN DER-AUWERA; HUSSON; FRUHLING, 1987; FANTONI et al., 1988; VAN DER-AUWERA; HUSSON, 1989; LABRO, 1993).

O efeito dos agentes antibacterianos sobre a proliferação de linfócitos *in vitro* propicia determinar a ação destes agentes na resposta imune adaptativa, resposta está diretamente relacionada com a defesa específica do organismo aos agentes agressores, como as bactérias (SPRENT, 1994; AHMED; SPRENT, 1999; BAUHOFER et al., 2008). Logo, é de grande valia identificação de um agente antibacteriano com amplo espectro e que ainda estimule e favoreça o desenvolvimento da resposta imune (BALDACCI, 1997; BAUHOFER et al., 2008).

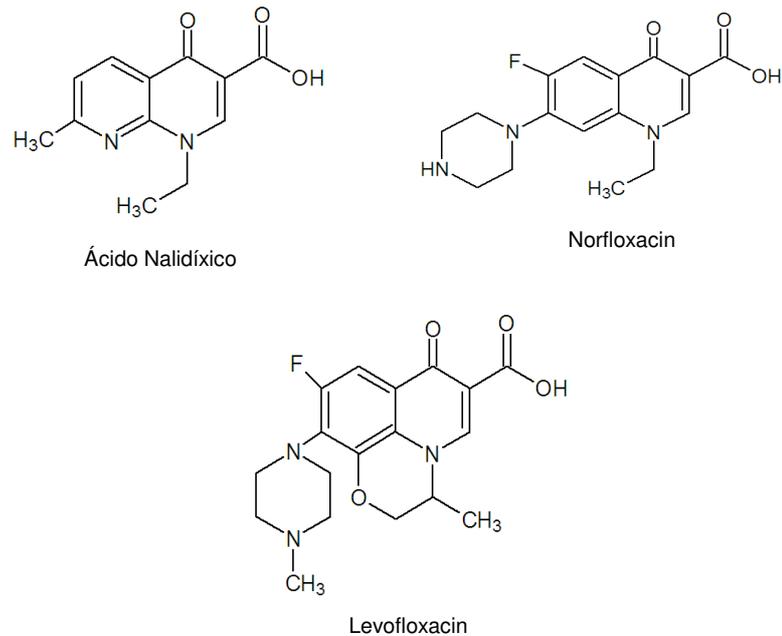
O método de análise morfológica evidenciada pelo laranja de acridina/brometo de etídeo permite diferenciar células viáveis daquelas em processo de morte por necrose ou apoptose através da contagem diferencial por fluorescência com base em alterações morfológicas nucleares e citoplasmáticas (McGAHON et al., 1995). Este método baseia-se na revelação das células com a coloração por brometo de etídeo e laranja de acridina no núcleo. O laranja de acridina intercala-se ao DNA, conferindo aparência verde ao núcleo celular, sendo capaz de atravessar membranas intactas. O brometo de etídeo é incorporado majoritariamente por células não viáveis (com instabilidade de membrana), intercalando-se ao DNA corando-o de laranja; ligando-se fracamente ao RNA, que se mostrará com uma coloração vermelha. As células viáveis com membrana intacta apresentam núcleo uniformemente corado de verde pelo laranja de acridina. O Brometo de etídeo marca muito fracamente e às vezes não marca, pois não atravessa a membrana íntegra. As células em apoptose inicial (membrana ainda intacta) apresentam manchas verdes brilhantes no núcleo (condensação de cromatina) e não são marcadas por brometo de etídeo. Podem ser observadas alterações de membrana em decorrência da dormação de corpos apoptóticos. As células em necrose (lesão na membrana) apresentam um padrão de coloração uniforme laranja-avermelhada.

### 3.3 Antimicrobianos

O aumento da resistência aos medicamentos antibacterianos tem impulsionado a busca por novos agentes, assim como a compreensão dos mecanismos de ação envolvidos tem sido alvo de pesquisa por inúmeros pesquisadores. As quinolonas são uma classe de moléculas que possuem amplo espectro antibacteriano e eficácia quimioterápica *in vivo* e, justamente por isso, são foco constante de pesquisas com vistas ao desenvolvimento de novas quinolonas para uso clínico (FOROUMADI et al., 2003).

A terapêutica com agentes antibacterianos definidos como quinolonas teve início com a patente do ácido nalidíxico (Figura 04) em 1962 e a introdução deste na clínica a partir do ano de 1965. O ácido nalidíxico apresenta estrutura não halogenada e se caracteriza por exibir exclusivamente atividade antibacteriana

frente a Gram-negativos. Do ponto de vista farmacocinético, o ácido nalidíxico apresenta baixa distribuição sistêmica e alta concentração na urina, fatores que determinaram seu emprego nas infecções do trato urinário (ROTHLIN, 1999; FANG et al., 2000).



**Figura 04.** Estrutura química das quinolonas: ácido nalidíxico (1<sup>a</sup> geração), norfloxacin (2<sup>a</sup> geração) e levofloxacin (3<sup>a</sup> geração).

O ácido nalidíxico, o cinoxacin e o ácido oxolínico são os agentes representativos das quinolonas de primeira geração e desde 1980 servem como protótipos na síntese de novos derivados. Inúmeras moléculas com estrutura de quinolonas foram sintetizadas e avaliadas, como por exemplo, norfloxacin (Figura 04) (Kyorin Pharmaceutical Co., Tochigi, Japão), ofloxacin (Daiichi Seiyaku Co., Tóquio, Japão), pefloxacin (Laboratório Roger Bellon, Paris, França), ciprofloxacina (Bayer, Wuppertal, Alemanha), entre outras. Estes produtos são estruturalmente relacionados com as quinolonas de primeira geração, mas com maior espectro antibacteriano e potência. A síntese da molécula de norfloxacin incorporou ao arsenal terapêutico a primeira fluorquinolona. Do ponto de vista estrutural, o norfloxacin tem como precursor a flumequina em relação à presença do átomo de

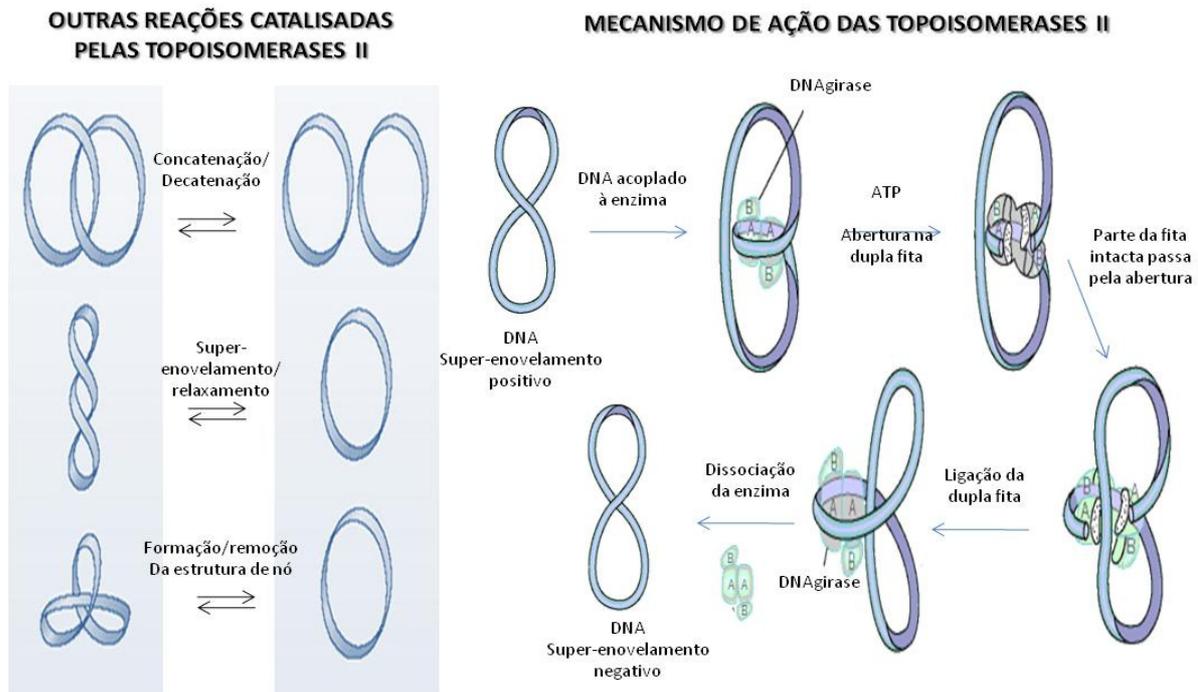
flúor na posição C-6 e o ácido pipemídico pela presença do grupo piperazina no C-7 (CAEKENBERGHE; PATTYN, 1984; ROTHLIN, 1999).

Os derivados fluorquinolônicos, como norfloxacin, pefloxacin, enoxacin, ofloxacin, lemfloxacin, fleroxacin e ciprofloxacina, foram as quinolonas de segunda geração mais relevantes (ROTHLIN, 1999). As fluorquinolonas demonstraram inibição específica da DNA girase e topoisomerase IV, ambas topoisomerasas bacterianas do tipo II pertencentes ao grupo das DNA topoisomerasas (FANG et al., 2000; DIZMAN; ELASRI; MATHIAS, 2005). As DNA topoisomerasas constituem uma classe de enzimas que catalisam mudanças na topologia da molécula do DNA, alterando o número de vezes que as fitas de DNA entrelaçam entre si e no espaço. A molécula de DNA *in vivo* apresenta-se geralmente como uma estrutura fechada, tal como as moléculas de DNA circulares (plasmídeos e genomas de alguns vírus) ou como no genoma de bactérias e organismos eucarióticos, onde assume forma de grandes alças cujas extremidades são fixadas por macromoléculas e, portanto, impedidas de girar sobre o eixo da própria hélice. Essa organização é importante porque permite o aparecimento de uma nova estrutura conformacional na molécula de DNA, o super-enovelamento (WANG, 1996; SIKORAV et al., 1998; FORTERRE et al., 2007).

As DNA topoisomerasas catalisam a isomerização topológica do DNA através da quebra transitória de uma ou ambas as fitas da molécula. A partir desta distinção, surgem respectivamente duas categorias de DNA topoisomerasas, as do tipo I e as do tipo II (WANG, 1996). Vários tipos de reações são catalisadas por estas enzimas, entre elas a conversão de moléculas de DNA relaxadas em moléculas de DNA super-enoveladas – reação executada somente pelas topoisomerasas tipo II bacterianas, e o relaxamento das moléculas super-enoveladas – reação catalisada pelas topoisomerasas I e II, tanto bacterianas quanto eucarióticas (CHAMPOUX, 2001; LOURENÇO, 2005; FORTERRE et al., 2007).

As topoisomerasas II separam as extremidades do corte no DNA na mudança conformacional, criando uma abertura ou intervalo pelo qual outro segmento de DNA de fita dupla (da mesma molécula ou de moléculas de DNA distintas) atravessa o intervalo criado, podendo gerar de acordo com o movimento da dupla fita, o super-enovelamento, o relaxamento, a catenação ou a decatenação destas moléculas. Este processo se repete inúmeras vezes para reduzir o tamanho do DNA e para que o mesmo sirva no compartimento nuclear (ROCA; WANG, 1994; LOURENÇO, 2005;

FORTERRE et al., 2007). Entre todas as topoisomerases II, a DNA girase é a única capaz de usar a energia obtida de hidrólise de adenosina tri-fosfato (ATP) para introduzir o super-enovelamento negativo do DNA (Figura 05) (RUTHENBURG et al., 2005; FORTERRE et al., 2007).



**Figura 05.** Reações de formação da estrutura helicoidal do DNA catalisadas pelas topoisomerases II.

Fonte: Adaptado de KORNBERG; BAKER (1992); BAKSHI; SHAPIRO (2003).

Os antimicrobianos fluorquinolônicos são os únicos inibidores diretos da síntese de DNA através da ligação com o complexo enzima-DNA. As topoisomerases II bacterianas também possuem um papel fundamental na remoção do superenovelamento frente a maquinaria de replicação do DNA. Da mesma forma, as topoisomerases II podem agir atrás da forquilha de replicação removendo o entrelaçamento das duplas fitas recém sintetizadas (GELLERT et al., 1977; SUGINO et al., 1977; KHODURSKY; ZECHIEDRICH; COZZARELLI, 1995; RUIZ, 2003; LOURENÇO, 2005; FORTERRE et al., 2007).

As fluorquinolonas exibem uma excelente potência e amplo espectro bacteriano, com atividade contra uma variedade de bactérias Gram-positivas e

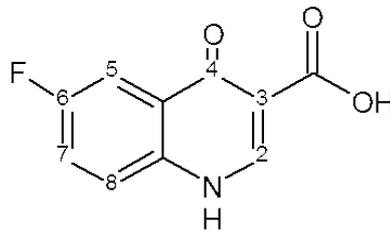
Gram-negativas, bem como micoplasmas. Estes agentes antimicrobianos também possuem uma potente ação contra bactérias intracelulares, pois se acumulam dentro de células com atividade fagocitária, sendo amplamente utilizadas na medicina humana e veterinária para tratamento de doenças infecciosas (FANG et al., 2000; DIZMAN; ELASRI; MATHIAS, 2005).

Nos últimos anos as fluoroquinolonas apresentaram um grande desenvolvimento, com mais de 10.000 diferentes análogos sintetizados. Estes análogos apresentam grande diversidade, devido às possibilidades de alterações nas cadeias laterais (PANDEYA et al., 2000; FOROUMADI et al., 2003; ZHANG; ZHOU; YU, 2004; FOROUMADI et al., 2009). O norfloxacin, caracterizado pelo grupo piperazina em C-7, demonstrou atividade frente às bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (ROTHLIN, 1999; PANDEYA et al., 2000), comprovando ser extremamente ativo com concentrações inibitórias mínimas (CIMs) abaixo de 1 µg/mL contra enterobactérias, como *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Proteus* spp. Além disso, inclui no seu espectro espécies que são resistentes ao ácido nalidíxico, como por exemplo *Pseudomonas* spp. e enterococos (NORBY; JONSSON, 1983).

A partir da molécula de norfloxacin, outras modificações originaram derivados de relevância terapêutica, como ofloxacin e ciprofloxacina. O ofloxacin possui maior atividade antibacteriana e distribuição sistêmica. Em função destas propriedades, o ofloxacin é indicado em infecções cutâneas, do trato respiratório inferior e urinário, em doenças sexualmente transmissíveis e prostatites. O ciprofloxacina apresenta uma maior atividade frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, com melhor absorção por via oral e maior distribuição sistêmica, indicando aplicação terapêutica em infecções cutâneas, articulares, dos ossos, do trato respiratório inferior e urinário. Assim, as novas fluorquinolonas tem sido reconhecidas como um grupo de agentes antibacterianos de relevantes propriedades terapêuticas por possuírem amplo espectro antibacteriano, elevada biodisponibilidade oral e boa distribuição tecidual atingindo níveis significativos nos líquidos intersticiais (ROTHLIN, 1999).

A atividade antibacteriana das fluorquinolonas não depende somente do anel bicíclico heteroaromático em sua estrutura base (Figura 06), mas também da natureza dos substituintes periféricos e suas relações espaciais. Estes substituintes exercem influência sobre a atividade antibacteriana, aumentando a afinidade com as enzimas bacterianas, a penetração celular ou alterando a farmacocinética. A relação

estrutura-atividade desta classe de antibacterianos tem sido muito estudada. Em geral, os substituintes carboxila (C-3) e carbonila no C-4, são moléculas necessárias para interação por pontes de hidrogênio com as bases de DNA. As moléculas em N-1 e C-8 devem ser relativamente pequenas e lipofílicas para melhor interação. A melhora da atividade antibacteriana tem sido relacionada à presença de substituintes amino e flúor nas posições C-5 e C-6 (FANG et al., 2000; CHEN et al., 2001; DIZMAN; ELASRI; MATHIAS, 2005).



**Figura 06.** Estrutura base das fluorquinolonas.

Embora a relação estrutura-atividade antibacteriana das fluorquinolonas venha sendo extensivamente investigada, a otimização do substituinte na posição C-7 ainda não está completamente definida. Este local de substituição tem mostrado grande impacto na potência, espectro, farmacocinética, solubilidade e representa um local de fácil alteração (PANDEYA et al., 2000; CHEN et al., 2001). A introdução de grupos como piperazina, aminopirrolidina e derivados com distintas substituições no C-7 geraram as quinolonas de terceira geração. Entre estas quinolonas se destacam: levofloxacin (Figura 04), clinafloxacin, sparfloxacin, grepafloxacin, DU-6859a e trovafloxacin (ROTHLIN, 1999). A maior parte destes compostos demonstrou uma série de propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas que, comparativamente às quinolonas de primeira geração, constituem vantagens significativas como agentes antimicrobianos. Nesta geração pode ser observada maior atividade contra *Staphylococcus aureus* meticilina resistente que o norfloxacin, provando ainda possuir citotoxicidade seletiva contra células de câncer renal (CHEN et al., 2001).

A inibição da DNA girase e a permeabilidade celular das quinolonas é influenciada diretamente pela natureza do substituinte em C-7 da estrutura básica do

ácido 4-quinolona-3-carboxílico, sendo permitidas substituições com grupos funcionais volumosos nesta posição. Nos últimos anos, um grande número de novas quinolonas com substituição no anel piperazina na posição do C-7 da estrutura básica das quinolonas foram sintetizadas e avaliadas quanto atividade antibacteriana (FOROUMADI et al., 2003).

Fang e seus colaboradores (2000) sintetizaram e avaliaram a citotoxicidade de derivados do norfloxacin com substituição no C-7, revelando melhor atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* metilina resistente que o norfloxacin para a maioria dos compostos testados. No mesmo estudo, os derivados 7-[4-(2-hidroxiiminoetil)piperazina-1-il] na avaliação de citotoxicidade *in vitro* utilizando linhagens de células cancerosas renais (CAK-1, RXF 393 e UO- 31) apresentaram perfis distintos de citotoxicidade, com excelente atividade contra as células de câncer renal quando comparados com seus análogos com grupamento  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -butirolactona.

Em 2001, Chen e colaboradores avaliaram a ação antibacteriana de derivados quinolônicos com substituição semelhante a estudada por Fang e colaboradores (2000), tendo o ácido 1-(4-amino-2-fluorofenil)-6-fluoro-1,4diidro-7-{4-[2-(4-methoxifenil)-2-hidroxiiminoetil]-1-piperazinil}-4-oxo-3quinolonacarboxílico e sua cetona precursora significativa atividade contra *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* metilina resistente, *Streptococcus pneumoniae* eritromicina e ampicilina resistente e *Enterococcus faecalis* vancomicina resistente.

Em outro estudo, uma série de quinolonas em C-7 substituídas com um grupamento aminometil demonstrou alta atividade antibacteriana *in vitro* contra bacilos Gram-negativos, comparável ao lomefloxacin, enquanto que os derivados que em C-7 substituídos com um grupo [(fenil substituído)]aminometil demonstraram boa atividade contra organismos Gram-positivos, com potência equivalente ao lomefloxacin e a vancomicina (ZHANG; ZHOU; YU, 2004).

Seguindo esse preceito na síntese de compostos para a identificação de novos agentes antibacterianos, Martins (2009), reportou a atividade antimicrobiana de seis brometos de fenacila contra *Enterobacter aerogenes* de isolado clínico, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Escherichia coli* de isolado clínico, *Klebsiella oxytoca* de isolado clínico, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Pseudomonas aeruginosa* de isolado clínico, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Staphylococcus aureus* de isolado clínico, tendo dois compostos concentração

inibitória mínima de até 64 µg/mL, e que os adutos formados a partir destes precursores com o norfloxacin apresentaram uma significativa redução no potencial antimicrobiano. Um estudo preliminar com alguns destes compostos sugeriu a possibilidade de interferência na resposta de células mononucleares humanas *in vitro* frente ao mitógeno PHA, indicando a necessidade de estudos complementares com estes compostos (SOUZA et al., 2007). Neste contexto, a identificação de um agente antibacteriano com amplo espectro de ação e com propriedade imunomodulatória assume um grande avanço no aprimoramento do tratamento para as infecções bacterianas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

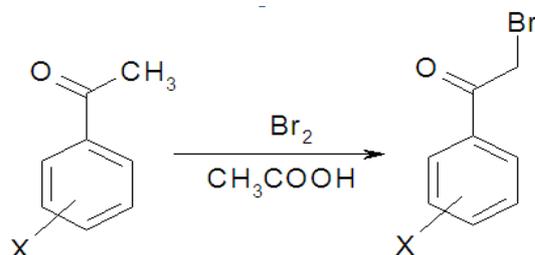
### 4.1 Local do Estudo

Os procedimentos experimentais para avaliação da atividade proliferativa, dosagem de LDH e imunocitoquímica foram executados no Laboratório de Farmacologia *in vitro* do Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, sala 314, Bloco 27, campus Itajaí, UNIVALI. Os procedimentos e leitura da imunocitoquímica foram realizados no Laboratório de Hematologia, Urinálise e Citologia do Curso de Farmácia, sala 208, Bloco 17, campus Itajaí, UNIVALI. Os experimentos de *western blotting* foram realizados no Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LAQUAS) do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), em colaboração com a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cláudia Santos da Silva e a mestrandia Juliana Costa Curta.

### 4.2 Norfloxacin e Derivados Sintéticos

Os 12 compostos foram previamente sintetizados e caracterizados por Karine Cordeiro de Souza, sob orientação do Professor Rogério Corrêa, no Laboratório de Síntese Orgânica do Curso de Farmácia da UNIVALI. Os compostos estudados no presente trabalho incluem seis brometos de fenacila: brometo de fenacila (BF 01, PM 199,05 g/mol, 2-bromo-1-feniletanona), brometo de 4-clorofenacila (BF 02, PM 233,49 g/mol, 2-bromo-1-(4-clorofenil)etanona), brometo de 4-fluorfenacila (BF 03, PM 217,04 g/mol, 2-bromo-1-(4-fluorfenil)etanona), brometo de 4-metilfenacila (BF 04, PM 213,08 g/mol, 2-bromo-1-(4-metilfenil)etanona), brometo de 4-metoxifenacila (BF 05, PM 229,08 g/mol, 2-bromo-1-(4-metoxifenil)etanona) e brometo 3,4-diclorofenacila (BF 06, PM = 267,93 g/mol, 2-bromo-1-(3,4-diclorofenil)etanona) (Figura 07). Em resumo, a síntese dos brometos de fenacila utilizou acetofenonas substituídas com a adição do reagente bromo, utilizando-se o ácido acético como solvente. As reações evoluíram até a formação do precipitado, com duração de 30 h

em média. Os produtos foram filtrados e pesados após a secagem no dessecador (SOUZA, 2009).

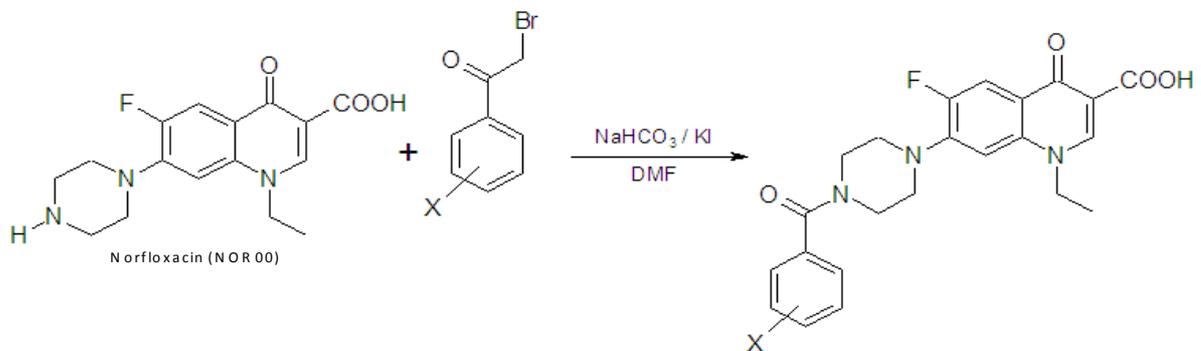


Composto	X	Nomenclatura
BF 01	H	brometo de fenacila
BF 02	4-Cl	brometo de 4-clorofenacila
BF 03	4-F	brometo de 4-fluorfenacila
BF 04	4-CH <sub>3</sub>	brometo de 4-metilfenacila
BF 05	4-OCH <sub>3</sub>	brometo de 4-metoxifenacila
BF 06	3,4-Cl <sub>2</sub>	brometo 3,4-diclorofenacila

**Figura 07.** Estrutura molecular dos brometos de fenacila.

O norfloxacin (NOR 00, PM 319,33 g/mol, ácido 1-etil-6-fluoro-4-oxo-7-piperazin-1-il-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico) foi avaliado nos ensaios de atividade biológica e empregado na síntese de seis adutos com os brometos de fenacila: aduto do brometo de fenacila com norfloxacin (NOR 01, PM 437,47 g/mol, 1-etil-6-fluor-4-oxo-7-piperazinil-4(4-fenacil)-1,4-di-hidroquinolina-3-ácido carboxílico), aduto do brometo de 4-clorofenacila com norfloxacin (NOR 02, PM 471,9 g/mol, 1-etil-6-fluor-4-oxo-7-piperazinil-4(4-clorofenacil)-1,4-di-hidroquinolina-3-ácido carboxílico), aduto do brometo de 4-fluorfenacila com norfloxacin (NOR 03, PM 455,47 g/mol, 1-etil-6-fluor-4-oxo-7-piperazinil-4(4-fluorfenacil)-1,4-di-hidroquinolina-3-ácido carboxílico), aduto do brometo de 4-metilfenacila com norfloxacin (NOR 04, PM 451,49 g/mol, 1-etil-6-fluor-4-oxo-7-piperazinil-4(4-metilfenacil)-1,4-di-hidroquinolina-3-ácido carboxílico), aduto do brometo de 4-metoxifenacila com norfloxacin (NOR 05, PM 467,49 g/mol, 1-etil-6-fluor-4-oxo-7-piperazinil-4(4-metoxifenacil)-1,4-di-hidroquinolina-3-ácido carboxílico) e aduto do brometo de 3,4-diclorofenacila com norfloxacin (NOR 06, PM 506,35 g/mol, 1-etil-6-fluor-4-oxo-7-piperazinil-4(3,4-diclorofenacil)-1,4-di-hidroquinolina-3-ácido carboxílico) (Figura 08).

Resumidamente, a síntese destes adutos foi realizada após o tratamento do norfloxacina com bicarbonato de sódio e bromometilacetofenonas substituídas em quantidades equimolares, utilizando *N, N* dimetilformamida (DMF) como solvente na obtenção dos *N*-(2-oxo-2-(4-fenil substituído) etil derivados. Após o término das reações os derivados foram monitorados por cromatografia de camada delgada e as misturas reacionais filtradas e vertidas em banho gelo. As soluções obtidas foram extraídas com diclorometano, com posterior evaporação do solvente para o isolamento dos produtos reacionais (SOUZA, 2009).



Composto	X	Nomenclatura
NOR 01	H	Aduto do brometo de fenacila com norfloxacina
NOR 02	4-Cl	Aduto do brometo de 4-clorofenacila com norfloxacina
NOR 03	4-F	Aduto do brometo de 4-fluorofenacila com norfloxacina
NOR 04	4-CH <sub>3</sub>	Aduto do brometo de 4-metilfenacila com norfloxacina
NOR 05	4-OCH <sub>3</sub>	Aduto do brometo de 4-metoxifenacila com norfloxacina
NOR 06	3,4-Cl <sub>2</sub>	Aduto do brometo de 3,4-diclorofenacila com norfloxacina

**Figura 08.** Estruturas moleculares e nomenclaturas dos derivados fenacílicos testados.

Os 13 compostos foram solubilizados em 1% de DMF (Nuclear, São Paulo, SP, BRASIL) com concentração final do composto a 1 mg/mL em meio de cultura DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco, Sigma Inc., St. Louis, MO, EUA). Os compostos solubilizados foram alíquotados e mantidos a -20 °C ao abrigo da luz até o momento do uso no cultivo celular. Os compostos foram avaliados quanto à atividade biológica nas concentrações de 1, 5, 25 e 50 µg/mL.

### 4.3 Amostragem e Aspectos Éticos

Foram estudados 100 indivíduos saudáveis atendidos pelo Laboratório Escola de Análises Clínicas (LEAC) da UNIVALI, todos doadores voluntários e possuindo como prescrição médica exames de rotina. As amostras de sangue periférico foram colhidas com anti-coagulante heparina no mesmo momento da coleta de sangue para a execução dos exames laboratoriais prescritos pelo clínico. A pesquisa foi realizada conforme as normas éticas para pesquisa envolvendo seres humanos, a qual está fundamentada com a Resolução nº 196/96 (BRASIL, 1996). O projeto foi previamente submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNIVALI, obtendo parecer favorável sob número 97/06, de 23/06/2006 (Anexo 1).

### 4.4 Cultivo Celular

Os experimentos foram conduzidos conforme Duarte e Vieira (2007), Silva e colaboradores (2007) e Philippi (2008). Para evitar contaminações os procedimentos foram realizados em condições assépticas e em câmara de fluxo laminar (Veco, modelo VLFS-12, Campinas, SP, BRASIL). Foi utilizado como meio de cultivo celular DMEM (Sigma Inc.) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Cultilab, Campinas, SP, BRASIL), L-glutamina 200 mM (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), HEPES 10 mM (Sigma Inc.), piruvato de sódio 110 mg/mL (Vetec Química fina LTDA, Duque de Caxias, RJ, BRASIL) e sendo esterilizado por filtração com filtro de éster de celulose 0,22 µm (Millipore Co., Billerica, CA, EUA).

As células mononucleares foram obtidas por separação em gradiente de densidade pelo método descrito por Boyum (1968) e modificado por Boyum (1976). O sangue venoso de voluntários saudáveis foi coletado assepticamente à vácuo em tubos estéreis contendo heparina sódica (Bencton and Dickinson Co., Franklin Lakes, NJ, EUA). Os tubos foram centrifugados a 200 x g durante 5 minutos à temperatura ambiente (Fanem, modelo 206-R Exelsa Baby II, São Paulo, SP, BRASIL). A interface entre os eritrócitos e o plasma e que continha os leucócitos foi colhida e diluída a 1:2 com tampão salina fosfato estéril (PBS, NaCl 137 mM, KCl 2 mM e tampão fosfato 10 mM, pH 7,2-7,4, Laborclin, Vargem Grande, PR, BRASIL).

Esta suspensão celular foi depositada lentamente sobre o gradiente de densidade Ficcoll Paque™ (densidade de 1,076, Amersham Biosciences, Uppsala, SUÉCIA). Após centrifugação a 800 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente, foi removido o anel de células mononucleares formado sobre o Ficcoll Paque™ com auxílio de uma pipeta. As células foram lavadas com PBS por duas vezes, com centrifugação a 200 x g por 5 minutos, para retirada do Ficcoll Paque™. A suspensão foi centrifugada a 80 x g por 5 minutos para retirada das plaquetas. O precipitado celular resultante foi ressuspenso em 1 mL de meio de cultura DMEM suplementado. A contagem de células foi realizada em câmara de Neubauer, sendo avaliada simultaneamente a viabilidade celular pela exclusão com azul de Tripán a 0,4% (Sigma Inc.). Somente foram utilizadas as suspensões celulares com viabilidade superior a 90%.

O cultivo celular foi realizado em microplacas de 96 poços, de fundo chato, estéreis e com tampa (Techno Plastic Products, Trasadingen, SUÍÇA). A curva de crescimento demonstrou as concentrações de  $1 \times 10^6$  células/mL e 5 µg/mL de PHA (Sigma Inc.) como as concentrações ótimas de uso no cultivo celular (dados não apresentados). O norfloxacin e os 12 compostos sintéticos previamente solubilizados foram diluídos em DMEM suplementado a 1, 5, 25 e 50 µg/mL, de acordo com dados da literatura (FORSGREN et al., 1986; PALLAVICINI et al., 1989; MATSUMOTO et al., 1992; RIESBECK; FORSGREN, 1994), e adicionados ao cultivo com  $1 \times 10^6$  células/mL na presença e na ausência da PHA a 5 µg/mL. O cultivo celular foi mantido a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> (Heal Force, modelo HF 212 UV, Xangai, CHINA). As células foram cultivadas nestas condições durante 72 h para a proliferação celular, para a detecção de KI-67 por imunocitoquímica e para a dosagem de LDH por reação enzimática, enquanto que o cultivo celular durante 9 h foi realizado para a detecção de caspase-3 por imunocitoquímica e por *western blotting*.

A averiguação dos elementos envolvidos nos experimentos foi realizada por meio de controles, como: meio de cultura, mitógeno, células mononucleares, norfloxacin e derivados sintéticos. As células mononucleares incubadas sozinhas em meio de cultura permitiram identificar a atividade celular basal independente do estímulo mitogênico ou dos compostos estudados (CONTROLE). Enquanto que o norfloxacin e compostos sintéticos incubados sozinhos no meio de cultura permitiram verificar a coloração do próprio composto, sendo utilizado como branco nos casos de

leitura em densidade óptica (DO) superior à leitura do controle na determinação da proliferação celular. O controle de proliferação (PHA) celular empregou PHA a 5 µg/mL no cultivo, enquanto que o controle de citotoxicidade (DMSO) utilizou dimetilsulfóxido a 10% (DMSO, Vetec Química fina LTDA).

#### 4.5 Determinação da Proliferação Celular

A proliferação celular após o cultivo das células por 72 h foi revelada pelo ensaio de redução do MTT (Sigma Inc.). Neste ensaio, o MTT sofre redução pela atividade da succinato desidrogenase mitocondrial das células vivas e é convertido em sal formazan, formando cristais de coloração azulada que, após dissolução com DMSO, permite a quantificação da coloração formada em espectrofotômetro (MOSMANN, 1983). Para este procedimento foi adicionado 3 h antes do término do experimento 10 µL MTT (5 mg/mL em NaCl 0,9%) em cada poço. Após o término do período de incubação foi adicionado 100 µL de DMSO (P.A.) para a dissolução dos cristais formados. A DO de cada poço foi determinada em espectrofotômetro de microplacas em 570 nm (Asxys Expert Plus, Microplate Reader G020 150, Eugendorf, Salzburg, ÁUSTRIA) (DENIZOT; LANG, 1986; BABICH; BORENFREUND, 1992).

Os resultados em DO obtidos em quatro experimentos independentes realizados em quadruplicata foram analisados após eliminação do *background* de proliferação das células de cada experimento, empregando como indicador a percentagem de proliferação (Equação 1), de acordo com Florão e colaboradores (2007):

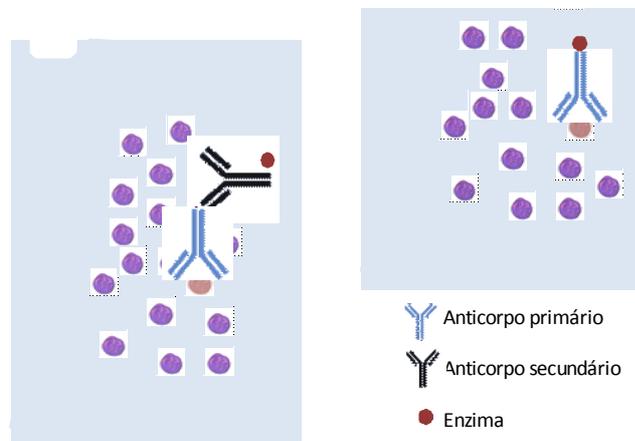
$$\% \text{ proliferação celular} = \frac{100 \times \text{DO teste}}{\text{DO controle basal}} \quad (\text{Eq. 1})$$

A intensidade de cor formada é proporcional à atividade enzimática mitocondrial e indica a viabilidade celular. Assim, a percentagem de crescimento obtida corresponde ao número de células presentes no cultivo celular e indica o efeito induzido pelo composto adicionado ao cultivo celular (XU et al., 1999; ESTEVES-SOUZA et al., 2002; RISCO et al., 2003; SUNILA; KUTTAN, 2004;

MANOSROI; SARAPHANCHOTIWITTHAYA; MANOSROI, 2005). Os resultados obtidos neste modelo conduziram os experimentos na determinação da atividade da LDH, imunocitoquímica e *western blotting* na detecção de caspase-3 para os compostos que induziram citotoxicidade e detecção da proteína KI-67 por imunocitoquímica para os compostos que apresentaram proliferação celular.

#### 4.6 Detecção de KI-67 e Caspase-3 por Imunocitoquímica

A imunocitoquímica foi realizada pelo método indireto, no qual um anticorpo primário se liga ao antígeno, sendo reconhecido por um anticorpo secundário conjugado a um sistema revelador (Figura 09). O sistema de revelação desta técnica empregou peroxidase, uma enzima que utiliza  $H_2O_2$  para oxidar os seus substratos. A oxidação do substrato pelo 3,3'-diaminobenzidina (DAB) pode ser detectada pela formação de um precipitado colorido, isto porque o DAB, na presença de  $H_2O_2$  e peroxidase, forma um polímero de cor marrom, precipitando no local no qual se encontra a peroxidase.



**Figura 09.** Ilustração representativa do princípio da imunocitoquímica indireta.

A seleção dos compostos submetidos à imunocitoquímica foi realizada a partir dos resultados obtidos na proliferação celular. Os compostos que apresentaram efeito citotóxico (BF 01, BF 02, BF 03, BF 04, BF 05 e BF 06, 50  $\mu\text{g/mL}$ ) foram avaliados quanto à indução da expressão de caspase-3 nas células mononucleares humanas ( $1 \times 10^6$  células/mL) em incubação de 9 h a  $37^\circ\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$ , na ausência e presença do mitógeno PHA. Os compostos que mostraram atividade

proliferativa (NOR 02 e NOR 06, 50 µg/mL) foram avaliados quanto à indução da expressão KI-67 nas células mononucleares humanas ( $1 \times 10^6$  células/mL) em tratamento por 72 h a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, na ausência e presença do mitógeno PHA.

A imunocitoquímica foi realizada em lâminas contendo citocentrifugado proveniente da suspensão de células obtida do cultivo celular. Os citocentrifugados foram confeccionados sobre lâminas preparadas com solução de APTS 5% (3-aminopropyltriethoxysilene, Sigma Aldrich) em acetona PA, com centrifugação de  $1,6 \times 10^6$  células a 150 x g por 10 min (Fanem, São Paulo, SP, BRASIL). As lâminas contendo as células foram imersas em solução de etanol 95% (25°C/1h) para fixação destas. Após esta fixação, as lâminas foram imersas em uma solução de peróxido de hidrogênio a 1,5% em metanol absoluto (v/v) por 20 min, seguido de lavagem através de duas passagens em água destilada. Esta etapa teve como objetivo bloquear a peroxidase endógena das células, eliminando o desenvolvimento de reações inespecíficas falso-positivas.

As lâminas foram imersas em solução de Triton 0,2% em PBS durante 30 min para a permeabilização celular, com a finalidade de permitir a passagem do anticorpo primário através da membrana plasmática celular e o conseqüente reconhecimento dos sítios antigênicos de interesse. Os anticorpos primários utilizados foram: anticorpo monoclonal de camundongo anti-caspase-3 (3G2, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, EUA) e anticorpo monoclonal de camundongo anti-KI67 (clone MIB-1, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), diluídos respectivamente a 1:50 e 1:200 em solução comercial apropriada à diluição de anticorpos (Tris Base 0,139 g/mL, Tris-HCl 0,61 g/mL, NaCl 0,88 g/mL, pH 7,6, EnVision™ FLEX Antibody Diluent, Dako, Carpinteria, CA, EUA). A solução contendo os anticorpos foi adicionada sobre os citocentrifugados e as lâminas mantidas em câmara úmida a 2-8°C *overnight*, seguido de 2 lavagens com tampão PBS por 5 min e em temperatura ambiente. O anticorpo secundário anti-IgG/IgM de camundongo conjugado com peroxidase (Millipore) diluído a 1:500 na solução comercial diluente (Dako) foi adicionado sobre o citocentrifugado e mantido em câmara úmida durante 1h e 30min à temperatura ambiente. Após a incubação com o anticorpo secundário as lâminas foram lavadas 2 vezes com PBS por 5 min e à temperatura ambiente. As amostras foram reveladas com uma solução cromógena contendo 0,03% de DAB em tampão imidazol pH 7,2 e peróxido de hidrogênio a

0,3% (Dako Liquid DAB + Substrate Chromogen System, Dako). Após a revelação colorimétrica foi realizada a contra-coloração das lâminas com solução de hematoxilina de Harris e a montagem em ENTELLAN<sup>®</sup> (MERCK, São Paulo, SP, BRASIL) para a melhor visualização das reações positivas e conservação do citocentrifugado.

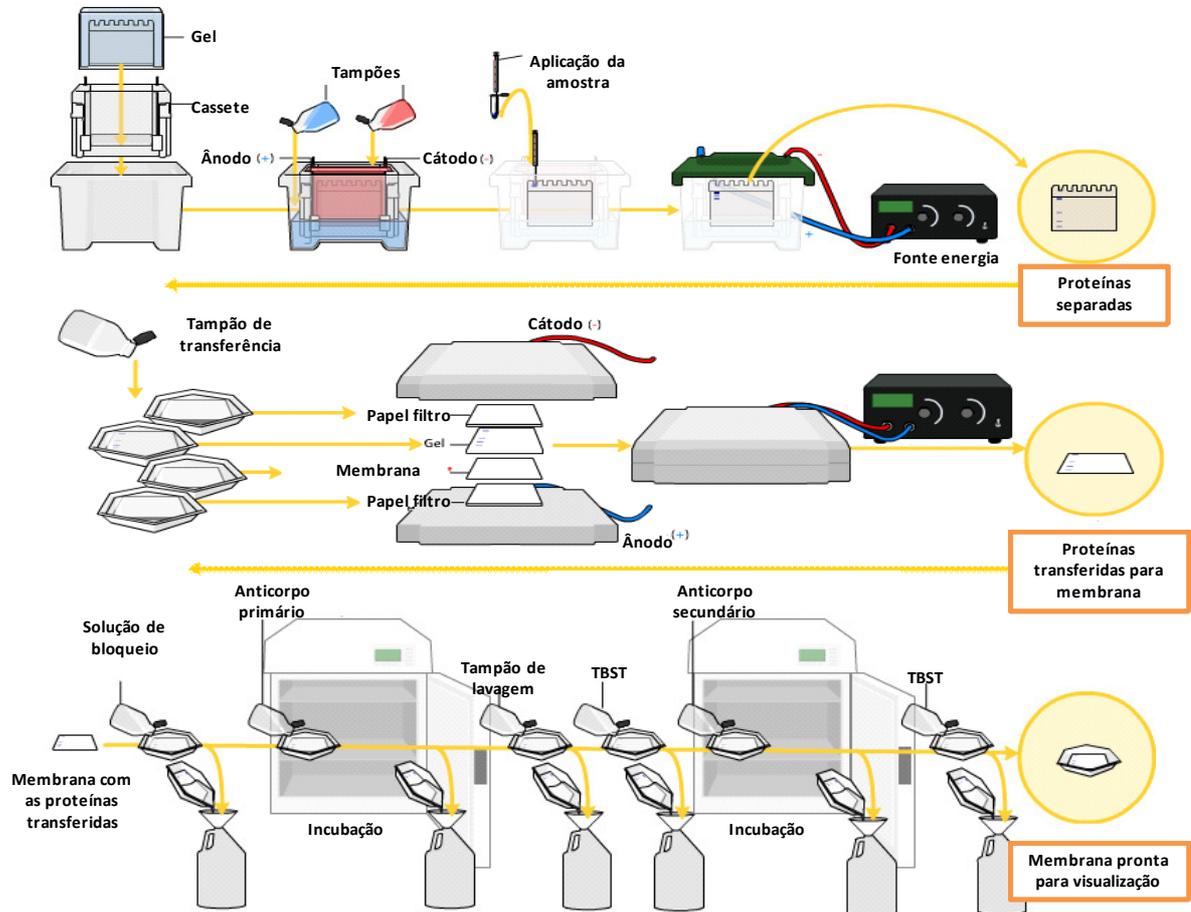
O controle positivo da reação para detecção de caspase-3 utilizou células mononucleares humanas tratadas com 30  $\mu$ M de Taxol<sup>®</sup> (paclitaxel, Bristol-Myers Squibb, Nova Iorque, NY, EUA) durante 9 h a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> (BUFALO et al., 2002; OFIR et al., 2002; EBERDING et al., 2007). Para o controle positivo na detecção de KI-67 as células mononucleares humanas permaneceram em contato com PHA a 5  $\mu$ g/mL por 72 h a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. O controle basal (CONTROLE) na imunocitoquímica utilizou células mononucleares humanas incubadas isoladamente em meio de cultura para a determinação da expressão basal de KI-67 e caspase-3. Por fim, o controle negativo interno da reação foi realizado com a abolição do anticorpo primário no procedimento técnico, com o objetivo de verificar a presença de reação inespecífica. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico comum (OLYMPUS, São Paulo, SP, Brasil), em aumento de 400X e 1000X, sendo analisados todos os campos da lâmina.

Os resultados da pesquisa de caspase-3 e KI-67 foram expressos em cruzes, classificados de acordo com a porcentagem de células marcadas em 1000 células avaliadas: marcação superior a 75% (++++), entre 75-50% (+++), entre 50-25% (++) , entre 25-1% (+) e ausência de marcação (-). Um campo observado em microscopia e representativo do cultivo de cada um dos compostos foi digitalizado e as imagens utilizadas na apresentação dos resultados.

#### **4.7 Detecção de Caspase-3 por *Western blotting***

Resumidamente, nesta metodologia as proteínas extraídas das células são desnaturadas e separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e transferidas para uma membrana de PVDF que, após bloqueio, é incubada com o anticorpo primário para a detecção das proteínas de interesse. A detecção do anticorpo primário utiliza um anticorpo secundário ligada a biotina e depois avidina ligada à peroxidase, enzima esta que na presença de substrato quimioluminescente (ECL)

permite a visualização da proteína pesquisada no material de estudo (Figura 10) (CLAUSEN, 1997; OTSUKI; LI; SHIBATA, 2003; AMBROZ, 2006).



**Figura 10.** Fluxograma da técnica de *western blotting*.

Fonte: Adaptado de WIKIPEDIA (2009).

Inicialmente as células mononucleares humanas ( $1 \times 10^6$  células/mL) foram cultivadas com BF 01, BF 02, BF 03, BF 04, BF 05 ou BF 06 ( $50 \mu\text{g/mL}$ ) por 9 h a  $37^\circ\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$ . O Taxol<sup>®</sup> ( $30 \mu\text{M}$ ) foi utilizado como controle positivo (BUFALO et al., 2002; OFIR et al., 2002; EBERDING et al., 2007) e as células mononucleares humanas cultivadas isoladamente em meio de cultura empregadas como controle basal (CONTROLE). Após este cultivo celular, as células ( $4 \times 10^6$  células) retiradas das microplacas foram lavadas e ressuspensas em 100  $\mu\text{L}$  tampão de lise (NaCl 150 mM, NP-40 1%, Triton-X 1%, dodecil sulfato de sódio 0,1% e 50 mM Tris, pH 8,0) na presença dos inibidores de proteases aprotinina ( $2 \mu\text{g/mL}$ , Sigma Inc.), leupeptina ( $5 \mu\text{g/mL}$ , Sigma Inc.), pepstatina ( $7 \mu\text{g/mL}$ , Sigma Inc.) e o inibidor de tripsina de semente de soja  $5 \mu\text{g/mL}$  (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). As

amostras foram centrifugadas a 3000 x g durante 20 min a 4°C. Os extratos citosólicos presentes nos sobrenadantes foram usados para a execução do *western blotting* na detecção de caspase-3 após a determinação da concentração de proteínas (BRADFORD, 1976).

Os lisados celulares foram desnaturados no tampão de amostra descrito por Laemmli (1970) (Tris-HCl 50 mM pH 6,8, dodecil sulfato de sódio 1%, 2-mercaptoetanol 5%, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,001%) e fervidos durante 5 min. As amostras desnaturadas (30 µg de proteína/dente) foram separadas no gel de poliacrilamida a 12% (130 V, 50 A) e depois transferidas para uma membrana de PVDF (Hybond™ ECL™, Amersham Biosciences) (16 V, 75 A) pelo método *semi-dry* por 2h e 30 min.

A membrana foi bloqueada com solução tampão de tris-salina (TBS, Tris 20 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5) contendo 0,1% de Tween 20 e 5% de leite em pó desnatado por 1 hora à temperatura ambiente, seguida de três lavagens, de 5 min cada, com solução de TBS-Tween (Tris 20 mM, NaCl 100 mM, Tween 20 0,1%, pH 7,5). O anticorpo monoclonal de camundongo anti-caspase-3 (3G2, Cell Signaling Technology) diluído a 1:1000 em solução comercial diluente (Dako) foi incubado *overnight* com a membrana, seguido novamente de 3 lavagens com TBS-Tween para retirar o excesso de anticorpo primário. A membrana foi então incubada com anticorpo secundário anti-IgG/IgM de camundongo conjugado com peroxidase (Millipore) diluído a 1:500 em solução comercial diluente (Dako) durante 2 h em temperatura ambiente. A presença da proteína na membrana foi revelada pela adição de uma solução de substrato quimioluminescente específico para peroxidase (ECL™, Amersham Biosciences), com visualização das bandas em filme de raio-X (Kodak, Xiamen, CHINA).

A presença de banda de 32 kDa indica expressão de pró-caspase-3 inativa pelas células, enquanto que a expressão do fragmento com 14-21 kDa indica caspase-3 na sua forma ativada. As reações foram então digitalizadas e as imagens utilizadas na apresentação dos resultados.

#### 4.8 Determinação da Atividade da Lactato Desidrogenase

As células mononucleares ( $1 \times 10^6$  células/mL) foram cultivadas com os compostos BF 01, BF 02, BF 03, BF 04, BF 05 e BF 06 a  $50 \mu\text{g/mL}$ , por 72 h a  $37^\circ\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$ . As células cultivadas com DMSO foram utilizadas como controle positivo de citotoxicidade e as células cultivadas apenas em meio de cultura foram empregadas como controle basal (CONTROLE). O sobrenadante obtido do cultivo celular por centrifugação durante 10 min a  $200 \times g$  foi utilizado na determinação quantitativa da LDH, empregando o reagente comercial Desidrogenase Láctica (UV) (Katal Biotecnológica, Belo Horizonte, MG, BRASIL). O kit comercial utiliza o método cinético *in vitro* ultravioleta com o sistema Piruvato/ $\text{NADH}_2$ . Nesta metodologia o piruvato é convertido pela LDH em L-lactato, transformando o  $\text{NADH}_2$  em NAD (Equação 2).



A velocidade de diminuição da absorbância (Abs) em 340 nm e a  $37^\circ\text{C}$  é proporcional a atividade enzimática, tendo sido utilizado o analisador automatizado Cobas Mira (Roche Chemistry Analyser, Ramsey, MN, EUA) na análise das amostras. Os resultados foram expressos em U/L, conforme descrito pelo fabricante (Equação 3).

$$\text{LDH (U/L)} = \Delta\text{Abs média} \times 8090 \quad (\text{Eq. 3})$$

#### 4.9 Análise Morfológica por Microscopia de Fluorescência

As células apoptóticas são visualizadas usando dois corantes fluorescentes: o laranja de acridina, que é permeável à membrana, e o brometo de etídio, que é impermeável (GENG et al., 1998). As células mononucleares ( $1 \times 10^6$  células/mL) foram cultivadas com os compostos BF 01, BF 02, BF 03, BF 04, BF 05 e BF 06 a  $50 \mu\text{g/mL}$ , por 24 h a  $37^\circ\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$ . O Taxol<sup>®</sup> ( $30 \mu\text{M}$ ) foi utilizado como controle positivo para apoptose (BUFALO et al., 2002; OFIR et al., 2002; EBERDING et al., 2007) e as células mononucleares humanas cultivadas isoladamente em meio

de cultura empregadas como controle basal (CONTROLE). Após este cultivo celular, as células ( $1,2 \times 10^6$  células) foram retiradas cuidadosamente das microplacas, transferindo-as para um tubo de eppendorf e com posterior centrifugação (1500 rpm, 10 min). O sobrenadante foi desprezado e adicionado 20  $\mu$ l de uma mistura dos reagentes fluorescentes, brometo de etídeo (5  $\mu$ g/ml, Sigma Inc.) e laranja de acridina (10  $\mu$ g/ml, Sigma Inc.) (v/v). Com esta solução de células e corantes foram confeccionadas as lâminas. Após incubação das lâminas por 10 min à temperatura ambiente, estas foram observadas em microscópio de fluorescência, usando objetiva de 40x.

Os resultados do teste de morfologia celular foram analisados de acordo com a presença da marcação pelos corantes fluorescentes. Neste ensaio, as células viáveis exibem coloração verde (proveniente do laranja de acridina), e as apoptóticas exibem coloração alaranjada (proveniente do brometo de etídeo). Um campo observado em microscopia e representativo do cultivo de cada um dos compostos foi digitalizado, e as imagens utilizadas na apresentação dos resultados.

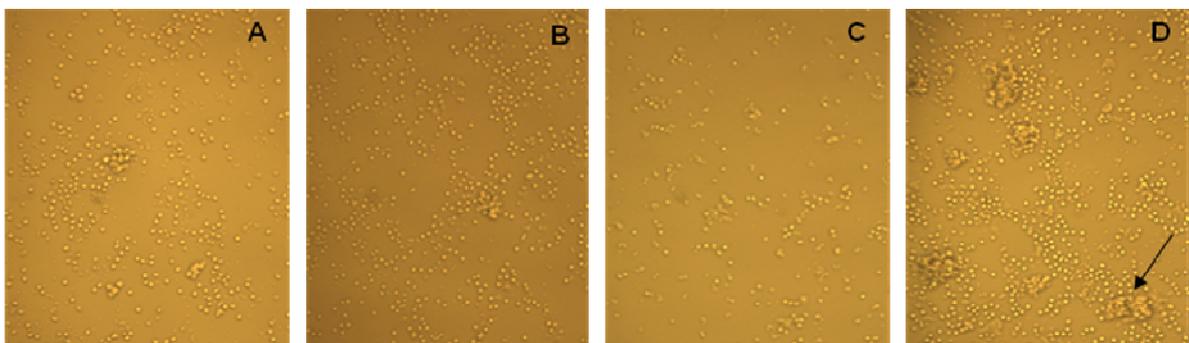
#### **4.10 Análise dos Resultados**

Os resultados obtidos do ensaio de proliferação celular e dosagem da formação de LDH foram expressos por média  $\pm$  erro padrão da média e submetidos à análise estatística Kruskal-Wallis, Mann-Whitney, Teste “t” *student* não-pareado. O nível de significância utilizado foi de  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Determinação da Proliferação Celular

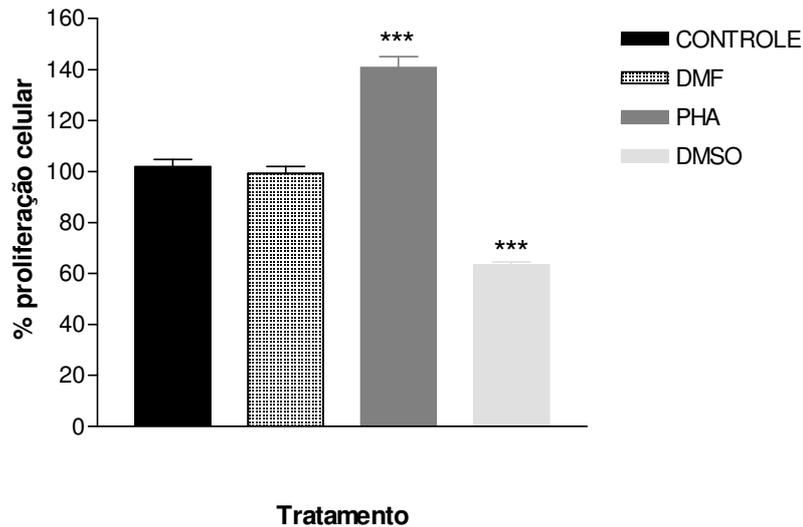
Inicialmente os experimentos visaram a identificação da ausência de interferência das variáveis do cultivo celular sobre a proliferação das células mononucleares humanas, empregando a metodologia previamente padronizada que definiu o tempo de incubação de 72 h, células na concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL, PHA  $5\mu\text{g/mL}$  e DMSO 10% (BUENO et al., 2001; DUARTE; VIEIRA, 2007; PHILIPPI, 2008). As condições dos experimentos foram avaliadas através de controles que objetivaram conferir a viabilidade das células mononucleares humanas (Figura 11A), a ausência de efeito do solvente dos compostos sobre estas (DMF, Figura 11B), a morte celular frente ao agente citotóxico DMSO (Figura 11C) e a proliferação celular frente ao mitógeno (Figura 11D), garantindo a confiabilidade dos resultados obtidos nos experimentos com os compostos de estudo.



**Figura 11.** Células mononucleares humanas incubadas isoladas (A, CONTROLE) ou simultaneamente com dimetilformamida 1% (B, DMF), dimetilsulfóxido 10% (C, DMSO) ou fitohemaglutinina  $5\mu\text{g/mL}$  (D, PHA) por 72 h a  $37^\circ\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$ . Seta: resposta celular ao efeito mitogênico da PHA com a formação de colônias celulares.

Os controles utilizados comprovaram a eficiência do teste de linfoblastogênese, demonstrando crescimento celular quando as células mononucleares foram expostas ao mitógeno (140,6%,  $p < 0,001$  em relação ao CONTROLE) e presença de efeito citotóxico quando as células foram expostas ao DMSO (63,2%,  $p < 0,001$  em

relação ao CONTROLE). O controle do solvente utilizado na solubilização dos compostos (DMF) demonstrou que o mesmo não interfere no crescimento celular na concentração empregada (Figura 12).



**Figura 12.** Proliferação celular revelada pelo ensaio de redução do MTT. Cultivo de células mononucleares humanas incubadas isoladamente em meio de cultivo (CONTROLE) ou simultaneamente com dimetilformamida 1% (DMF), fitohemaglutinina 5 µg/mL (PHA), ou dimetilsulfóxido 10% (DMSO) por 72 h a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

Os resultados representam média ± erro padrão da média de quatro experimentos em quadruplicata. \*\*\* p<0,001 em comparação com CONTROLE.

### 5.1.1 Brometos de fenacila

O efeito dos seis brometos de fenacila empregados na síntese dos adutos com o norfloxacin sobre a proliferação células mononucleares humanas foi avaliado com o objetivo de determinar a atividade sobre o crescimento celular de cada composto. O BF 01 nas concentrações de 1, 5, 25 e 50 µg/mL causou diminuição da proliferação das células mononucleares de forma concentração-dependente de 15,5% a 35% (Figura 13) quando comparado ao CONTROLE (p<0,001), e com efeito dose-dependente nas concentrações superiores a 1 µg/mL. Apesar da proliferação ser inferior ao CONTROLE, apenas a concentração de 50 µg/mL foi similar ao DMSO (65,0% x 63,2%, p>0,05), indicando que o composto em elevadas concentrações tem atividade citotóxica semelhante ao DMSO. Este mesmo

composto nas concentrações de 1 e 5 µg/mL incubado no cultivo celular junto com a PHA manteve a atividade proliferativa do mitógeno (132,9% e 132,5%, respectivamente, e 140,6% do PHA,  $p > 0,05$ ). Entretanto, a inibição da atividade proliferativa da PHA foi observada na concentração de 25 µg/mL (percentagem de proliferação de 98,2%), enquanto que a concentração de 50 µg/mL evidenciou efeito citotóxico semelhante ao próprio DMSO (57,2% e 63,2%, respectivamente), caracterizando efeito concentração-dependente em concentrações superiores a 1 µg/mL. Em resumo, o composto BF 01 em elevadas concentrações (50 µg/mL) apresenta efeito citotóxico em ambas as condições de cultivo, na presença e na ausência do mitógeno.

As células mononucleares humanas incubadas com BF 02 mostraram crescimento celular de 13,8% a 30,3%, significativamente inferiores ao CONTROLE nas quatro concentrações testadas ( $p < 0,01$ ) (Figura 13). A concentração de 50 µg/mL apresentou atividade citotóxica, com crescimento celular de 69,7%, semelhantemente ao DMSO. A adição deste composto (1 e 25 µg/mL) junto à PHA no cultivo celular preservou a atividade mitogênica da PHA (126,1% a 137,7% para BF 02 e 140,6% para PHA), enquanto que a maior concentração (50 µg/mL, 94,0%) inibiu completamente esta atividade sem, contudo, apresentar efeito citotóxico.

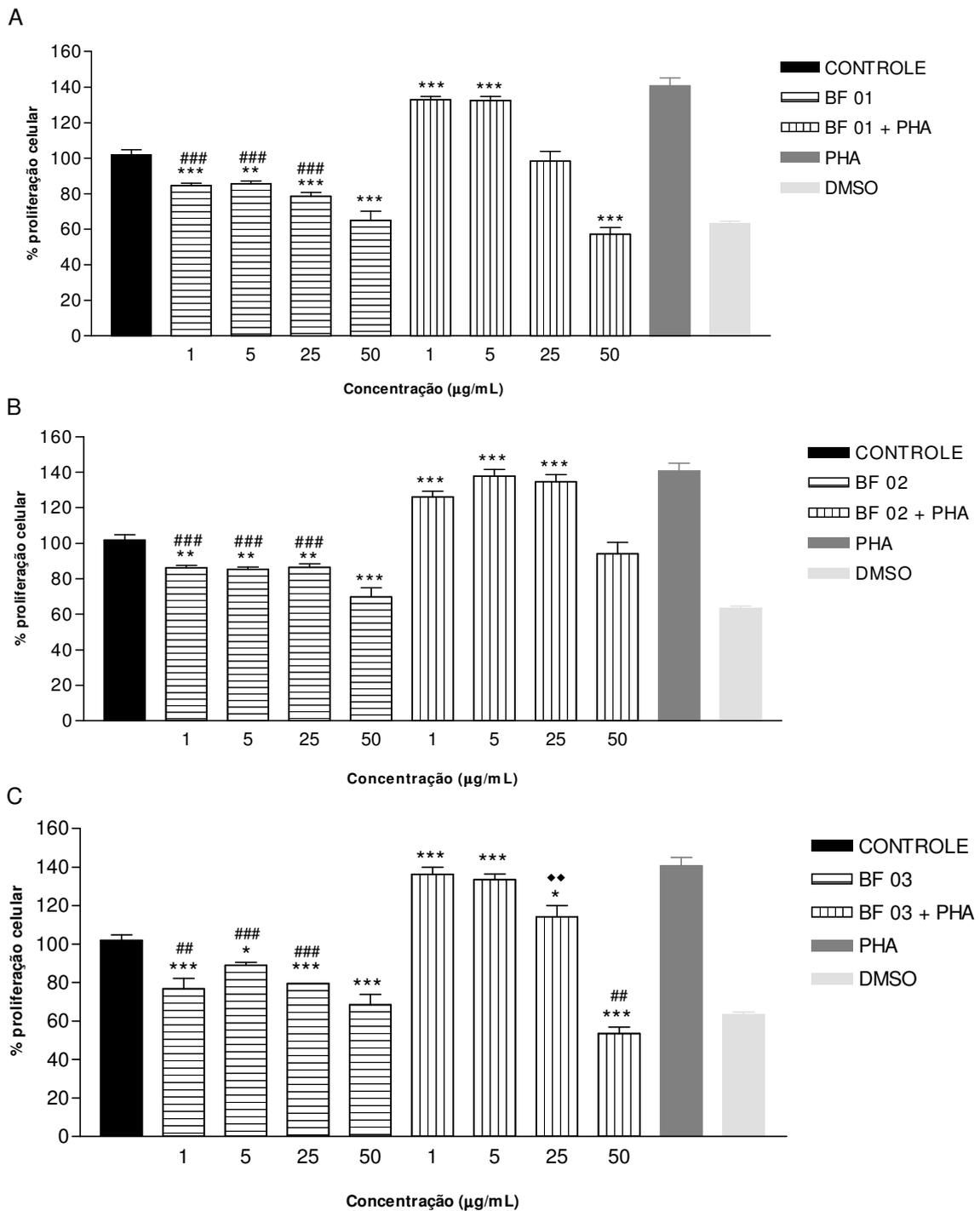
De acordo com Jones Júnior (2005), a presença de um átomo sacador de elétrons na estrutura da molécula, como o flúor e o cloro, gera uma polarização através do efeito indutivo que ele exerce ao sacar elétrons do anel aromático, fazendo com que a distribuição média dos elétrons do sistema conjugado se modifique e a carga negativa se concentre nas imediações deste átomo. Além disso, faz-se necessário considerar que o tamanho da molécula e a disposição estereoquímica também podem ser fatores envolvidos na atividade biológica dos compostos. Desta forma, a adição de átomos sacadores de elétrons, como o fluor e o cloro promovem um efeito eletrônico que confere à molécula uma maior polaridade e, contrariamente, enquanto que a adição de um radical doador de elétrons, como os radicais metil e metoxi, torna a molécula menos polarizada. Considerando que os resultados obtidos indicam que tanto os derivados com sacadores de elétrons quanto aqueles com doadores de elétrons apresentaram atividade citotóxica, e que a literatura não apresenta informações quanto ao efeito desta polarização sobre o cultivo de células mononucleares humanas, assim como sobre a interação que estas moléculas possam apresentar com os receptores de membrana celular a fim de

ativar ou suprimir a proliferação celular, ou mesmo induzir a morte celular, não há como inferir de forma segura que o efeito eletrônico seja o mecanismo envolvido na atividade dos brometos sobre o cultivo celular.

Com base nestes fundamentos, os resultados obtidos com BF 01 e BF 02 sugerem que a adição de um átomo de cloro na molécula do brometo de fenacila pode ser o fator envolvido na diminuição do efeito do composto BF 02 junto à PHA, embora ambos os compostos tenham mostrado o mesmo perfil de atividade quando colocados no cultivo celular na ausência do mitógeno.

As quatro concentrações testadas do composto BF 03 induziram a diminuição da proliferação celular (68,5% a 88,9%,  $p < 0,05$  em relação ao CONTROLE), com efeito concentração-dependente em concentrações superiores a 1  $\mu\text{g/mL}$ . A maior concentração testada (50  $\mu\text{g/mL}$ ) apresentou efeito citotóxico semelhante ao DMSO. O mitógeno teve sua atividade mantida quando incubado junto ao composto nas concentrações de 1 e 5  $\mu\text{g/mL}$  (136,2% e 133,5%, respectivamente), ao contrário do que foi observado quando o composto foi adicionado em maiores concentrações no cultivo celular, com crescimento de 114,0% com 25  $\mu\text{g/mL}$  de BF 03 ( $p < 0,01$  em relação do PHA) e de 53,5% com 50  $\mu\text{g/mL}$  de composto. A atividade citotóxica apresentada pelo composto a 50  $\mu\text{g/mL}$  foi maior que a observada com o DMSO ( $p < 0,01$ ), e os resultados evidenciam novamente efeito dose-dependente em concentrações superiores a 1  $\mu\text{g/mL}$ .

O composto BF 03 interfere no crescimento celular quando incubado na presença de PHA, com atividade citotóxica mais acentuada que o composto BF 01, desta forma sugere-se que a inclusão do átomo de flúor na molécula como provável interferente para a atividade citotóxica em elevadas concentrações. Entretanto, tanto BF 01 quanto BF 02 e BF 03 apresentaram resultados similares quando mantidos na proliferação de células mononucleares na ausência do mitógeno.



**Figura 13.** Proliferação de células mononucleares humanas *in vitro* frente ao brometo de fenacila (BF 01, A), brometo de 4-clorofenacila (BF 02, B) e brometo de 4-fluorfenacila (BF 03, C) nas concentrações de 1, 5, 25 e 50 µg/mL incubadas isoladas ou simultaneamente com fitohemaglutinina (5 µg/mL) por 72 h a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

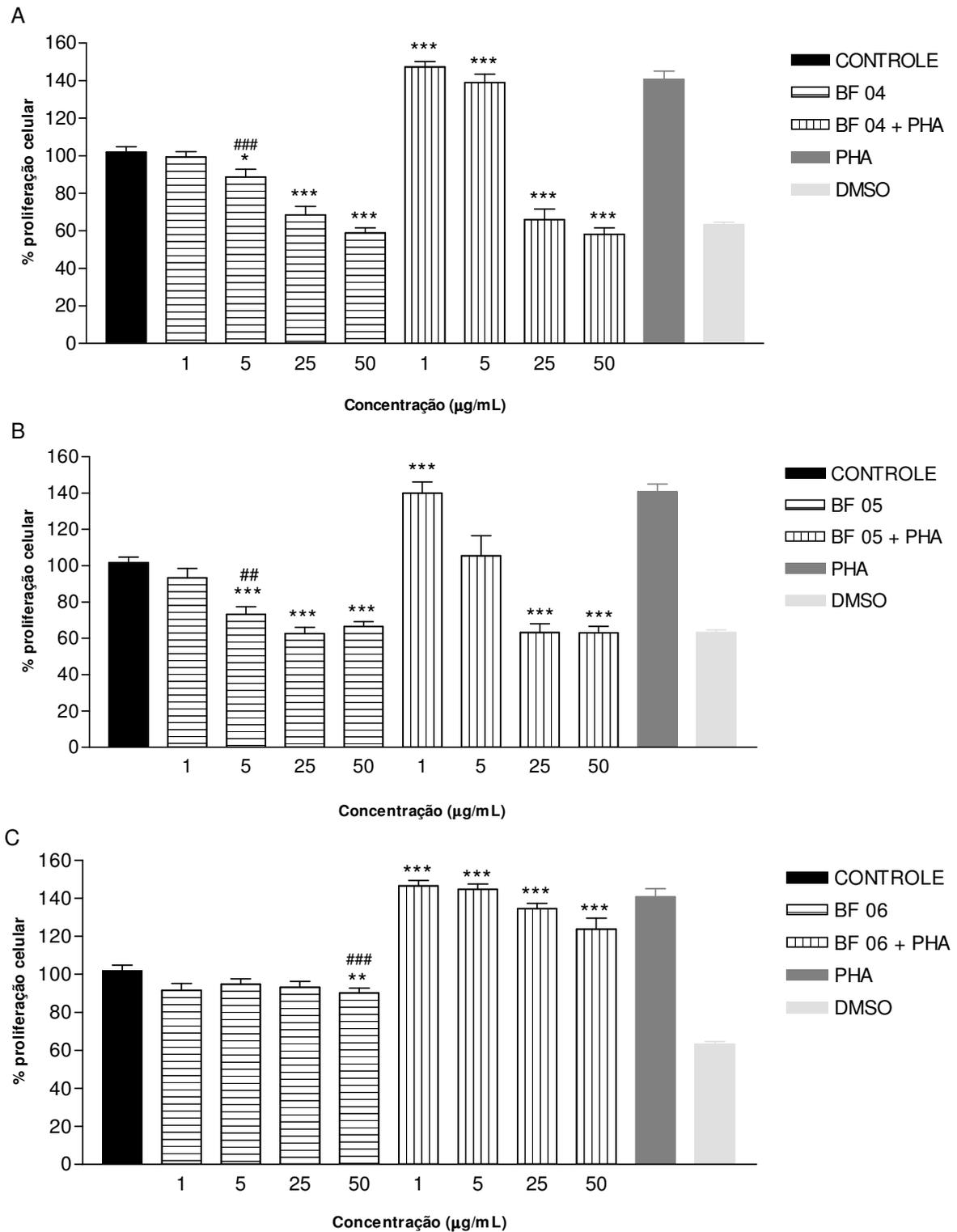
Os resultados representam média ± erro padrão da média de quatro experimentos em quadruplicata. CONTROLE: células em meio de cultura; PHA: células cultivadas com fitohemaglutinina 5 µg/mL; DMSO: células cultivadas com dimetilsulfóxido 10%; \* p<0,05, \*\* p<0,01 e \*\*\* p<0,001 em relação ao CONTROLE; ## p<0,01 e ### p<0,001 em relação ao DMSO; ♦♦ p< 0,01 em relação ao PHA.

A atividade do BF 04 nas concentrações de 1 a 50 µg/mL sobre as células mononucleares humanas mostrou efeito dose-dependente (Figura 14). A percentagem de crescimento foi 11,4% a 31,5% menor quando comparada ao CONTROLE nas concentrações de 5 µg/mL, 25 µg/mL e 50 µg/mL, as duas últimas inclusive semelhantes ao DMSO. O cultivo celular com o composto (1 e 5 µg/mL) junto à PHA manteve a atividade mitogênica (138,8 e 147,2%, respectivamente), enquanto que as concentrações de 25 e 50 µg/mL mostraram atividade citotóxica similar ao DMSO (65,9% e 58,1%, respectivamente). Desta forma, adição do radical metil a molécula do brometo de fenacila parece aumentar o potencial citotóxico, uma vez que a atividade se apresenta já na concentração intermediária de 25 µg/mL do composto.

O BF 05 induziu crescimento celular de 73,1% a 62,6% e com valores inferiores ao CONTROLE nas concentrações de 5 µg/mL, 25 µg/mL e 50 µg/mL. Dentre estas, somente a concentração de 5 µg/mL não mostrou analogia à atividade citotóxica do DMSO ( $p < 0,01$ , Figura 14). Na presença da PHA o BF 05 a 1 µg/mL manteve a atividade do mitógeno (140,0%), enquanto que a 5 µg/mL houve supressão da atividade mitogênica (105,4%). O aumento da concentração do composto (25 e 50 µg/mL), fez com que a molécula exibisse atividade citotóxica (63,2% e 63,1%) semelhante ao DMSO. Estes achados sugerem que a adição de um radical metoxi, assim como o radical metil (BF 04) amplifica a atividade citotóxica do brometo de fenacila.

Contrariamente, o BF 06 não interferiu com a mesma intensidade no crescimento das células mononucleares humanas quando comparado com os demais brometos testados (Figura 14). Este composto causou apenas uma discreta supressão do crescimento celular na concentração de 50 µg/mL (90,1%,  $p < 0,01$  em comparação ao CONTROLE).

Quando incubado simultaneamente à PHA, o BF 06 manteve a atividade do mitógeno nas quatro concentrações testadas (123,7% a 146,6%). Isto sugere que a presença de dois átomos de cloro na molécula inibe a atividade citotóxica do brometo de fenacila de forma mais acentuada do que aquela observada quando apenas um átomo de cloro foi incorporado (BF 02, Figura 13).



**Figura 14.** Proliferação de células mononucleares humanas *in vitro* frente ao brometo de 4-metilfenacila (BF 04, A), brometo 4-metoxifenacila (BF 05, B) e brometo de 3,4-diclorofenacila (BF 06, C) nas concentrações de 1, 5, 25 e 50 µg/mL incubadas isoladas ou simultaneamente com fitohemaglutinina (5 µg/mL) por 72 h a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

Os resultados representam média ± erro padrão da média de quatro experimentos em quadruplicata. CONTROLE: células em meio de cultura; PHA: células cultivadas com fitohemaglutinina 5 µg/mL; DMSO: células cultivadas com dimetilsulfóxido 10%;; \* p<0,05, \*\* p<0,01 e \*\*\* p<0,001 em relação ao CONTROLE; ## p<0,01 e ### p<0,001 em relação ao DMSO.

A análise dos resultados obtidos no cultivo de células mononucleares humanas frente aos brometos de fenacila quanto as diferenças químicas dos compostos permite inferir que a adição de um átomo de cloro (BF 02) ou de um átomo de flúor (BF 03) não demonstra diferença significativa na atividade citotóxica apresentada por estes compostos na concentração de 50 µg/mL. Em contrapartida, a incorporação de um radical metil (BF 04) ou de um radical metoxi (BF 05) amplifica o potencial citotóxico, que é detectado a partir da concentração de 25 µg/mL. Contrariamente, a adição de dois átomos de cloro (BF 06) inibiu significativamente a atividade citotóxica quando comparada ao BF 01 e ao BF 02 ( $p < 0,001$ ). Por outro lado, o cultivo celular tratado com os brometos de fenacila simultaneamente à PHA mostrou que a presença de um átomo de cloro (BF 02) ou de dois átomos de cloro (BF 06) mantém a atividade proliferativa do mitógeno e não preserva a atividade citotóxica do composto. A presença do átomo de flúor (BF 03) nesta mesma condição de cultivo inibiu a atividade mitogênica da PHA e mostrou aumento na atividade citotóxica, atividade que foi mais acentuada ainda para os radicais metil (BF 04) e metoxi (BF 05).

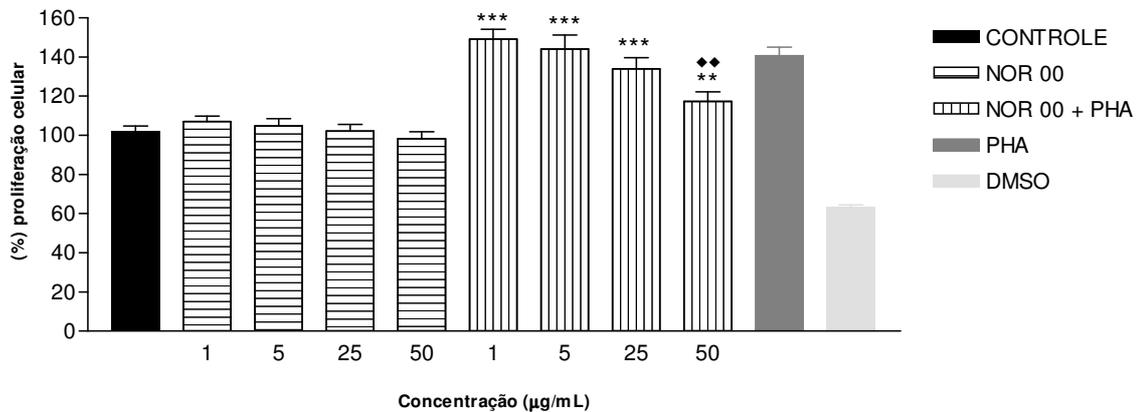
Os brometos de fenacila aqui avaliados apresentaram atividade citotóxica em células mononucleares humanas em concentração semelhante àquela analisada na atividade antimicrobiana por Martins (2009), cujos resultados indicaram atividade antimicrobiana contra *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* (isolado clínico), *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* em concentração inibitória mínima de até 64 µg/mL. A intensa atividade citotóxica frente as cepas bacterianas e as células mononucleares humanas foi observada para o composto BF 04, enquanto que o composto BF 06 mostrou menor atividade antibacteriana e também menor atividade citotóxica em células mononucleares que os demais brometos.

### **5.1.2 Norfloxacin e adutos**

O norfloxacin (NOR 00), empregado na síntese de seis adutos com o brometo de fenacila e derivados fenacílicos, foi testado junto ao cultivo de células mononucleares humanas com o objetivo de determinar a atividade imunomoduladora própria do composto. A proliferação obtida a partir do cultivo celular frente ao NOR

00 nas concentrações 1, 5, 25 e 50 µg/mL foi de 98,3% a 107,2% (Figura 15), não diferindo dos valores obtidos no CONTROLE.

O crescimento celular obtido quando este composto foi adicionado à cultura concomitantemente ao mitógeno foi de 117,4% a 149,2%, sendo que apenas na concentração de 50 µg/mL a atividade mitogênica da PHA foi reduzida pela presença do composto ( $p < 0,01$ ), embora superior ao CONTROLE ( $p > 0,01$ ).



**Figura 15.** Proliferação de células mononucleares humanas *in vitro* frente ao norfloxacina (NOR 00) nas concentrações de 1, 5, 25 e 50 µg/mL incubadas isoladas ou simultaneamente com fitohemaglutinina (5 µg/mL) por 72 h a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

Os resultados representam média ± erro padrão da média de quatro experimentos em quadruplicata. CONTROLE: células em meio de cultura; PHA: células cultivadas com fitohemaglutinina 5 µg/mL; DMSO: células cultivadas com dimetilsulfóxido 10%; \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao CONTROLE; ♦♦  $p < 0,01$  em relação ao PHA.

Outros estudos *in vitro* com norfloxacina em concentrações terapêuticas também indicaram não haver efeito significativo sobre as funções imunológicas, como quimiotaxia, metabolismo oxidativo ou mesmo fagocitose (BOOGAERTS et al., 1986; PUIVERER; PETERS, 1986; LOMBARD; DESCOTES; EVREUX, 1987; VAN DER-AUWERA; HUSSON; FRUHLING, 1987; FANTONI et al., 1988; VAN DER-AUWERA; HUSSON, 1989; LABRO, 1993).

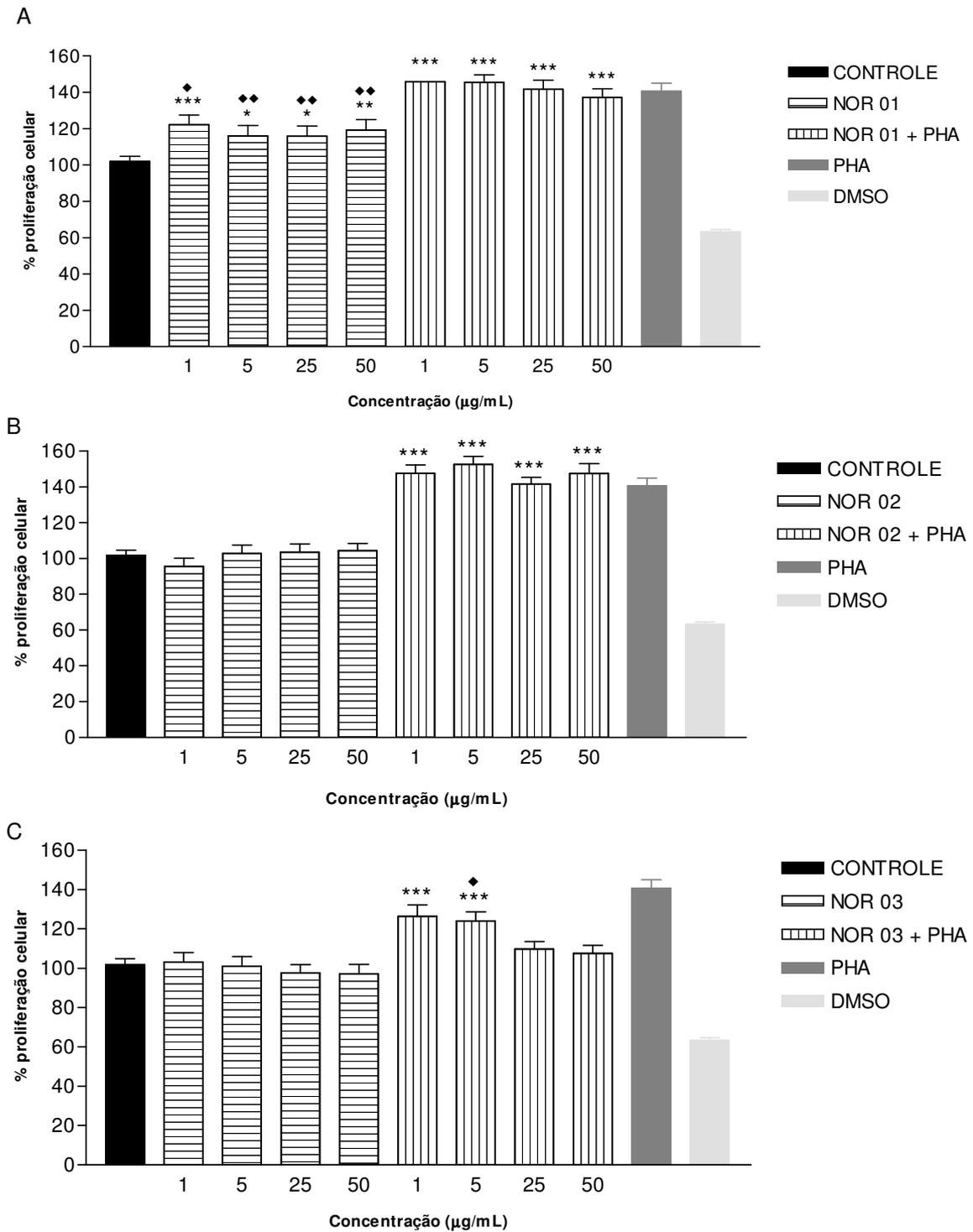
Em concordância com os resultados aqui obtidos, Forsgren e colaboradores (1986) evidenciaram que o norfloxacina na concentração de 50 µg/mL mostrou uma menor proliferação de linfócitos humanos *in vitro* em relação às demais concentrações testadas. Um ano depois, Forsgren, Schlossman e Tedder (1987), testaram dez diferentes quinolonas (1,56 µg/mL, 6,25 µg/mL e 25 µg/mL) no cultivo de linfócitos

humanos estimulados com PHA, tendo oito delas, inclusive o norfloxacin, apresentado atividade imunoproliferativa. Contrariamente, Schmid (2004), demonstraram uma resposta proliferativa de células mononucleares sem estímulo mitogênico frente ao norfloxacin e a outras sete quinolonas.

A síntese de seis adutos do norfloxacin com os brometo de fenacila teve por objetivo a identificação de um antimicrobiano com maior espectro de ação e também com atividade sobre o sistema de defesa, esta última verificada pela atividade proliferativa sobre células mononucleares humanas *in vitro*. O aduto NOR 01 induziu aumento na proliferação celular nas quatro concentrações testadas, de 14,0% a 20,2%, embora inferior à PHA ( $p < 0,05$ ) (Figura 16). Apesar do efeito imunoproliferativo sobre as células, o composto apenas manteve a atividade mitogênica da PHA em todas as concentrações testadas, sem amplificar o efeito imunoproliferativo (137,1% a 145,9%). Considerando que o BF 01 mostrou efeito citotóxico e que o NOR 00 apenas suprimiu a atividade da PHA a 50  $\mu\text{g/mL}$ , é possível inferir que a formação do aduto destes dois compostos inibe a atividade citotóxica do brometo precursor, promovendo o estímulo da proliferação celular.

O aduto NOR 02 não mostrou efeito sobre o cultivo celular, apresentando percentagens de crescimento similares ao CONTROLE, de 95,5% a 104,4% quando sozinho no cultivo, e mantendo a atividade mitogênica da PHA (141,7% a 152,6%) quando esta foi incluída no cultivo (Figura 16). A síntese deste aduto evitou a redução da proliferação celular observada com o BF 02 nas mesmas condições experimentais em que ambos foram submetidos. Entretanto, diferentemente do aduto NOR 01, o composto NOR 02 não promoveu um acréscimo na proliferação celular.

As quatro concentrações de NOR 03 ensaiadas não interferiram no crescimento celular, com valores de 97,0% a 103,0% (Figura 16). Entretanto, na presença do mitógeno o composto na concentração de 5  $\mu\text{g/mL}$  apresentou redução da atividade da PHA (124,0%,  $p < 0,05$  em comparação ao PHA), supressão esta maior evidenciada nas concentrações de 25  $\mu\text{g/mL}$  e 50  $\mu\text{g/mL}$ , cujos valores foram similares ao CONTROLE (109,0% e 107,5%). Estes dados indicam que a síntese do aduto NOR 03 suprimiu o efeito citotóxico do BF 03 e intensificou o efeito supressor do NOR 00.



**Figura 16.** Proliferação de células mononucleares humanas *in vitro* frente ao aduto do brometo de fenacila com norfloxacina (NOR 01, A), aduto do brometo de 4-clorofenacila com norfloxacina (NOR 02, B) e aduto do brometo de 4-fluorfenacila com norfloxacina (NOR 03, C) nas concentrações de 1, 5, 25 e 50 µg/mL incubadas isoladas ou simultaneamente com fitohemaglutinina (5 µg/mL) por 72 h a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

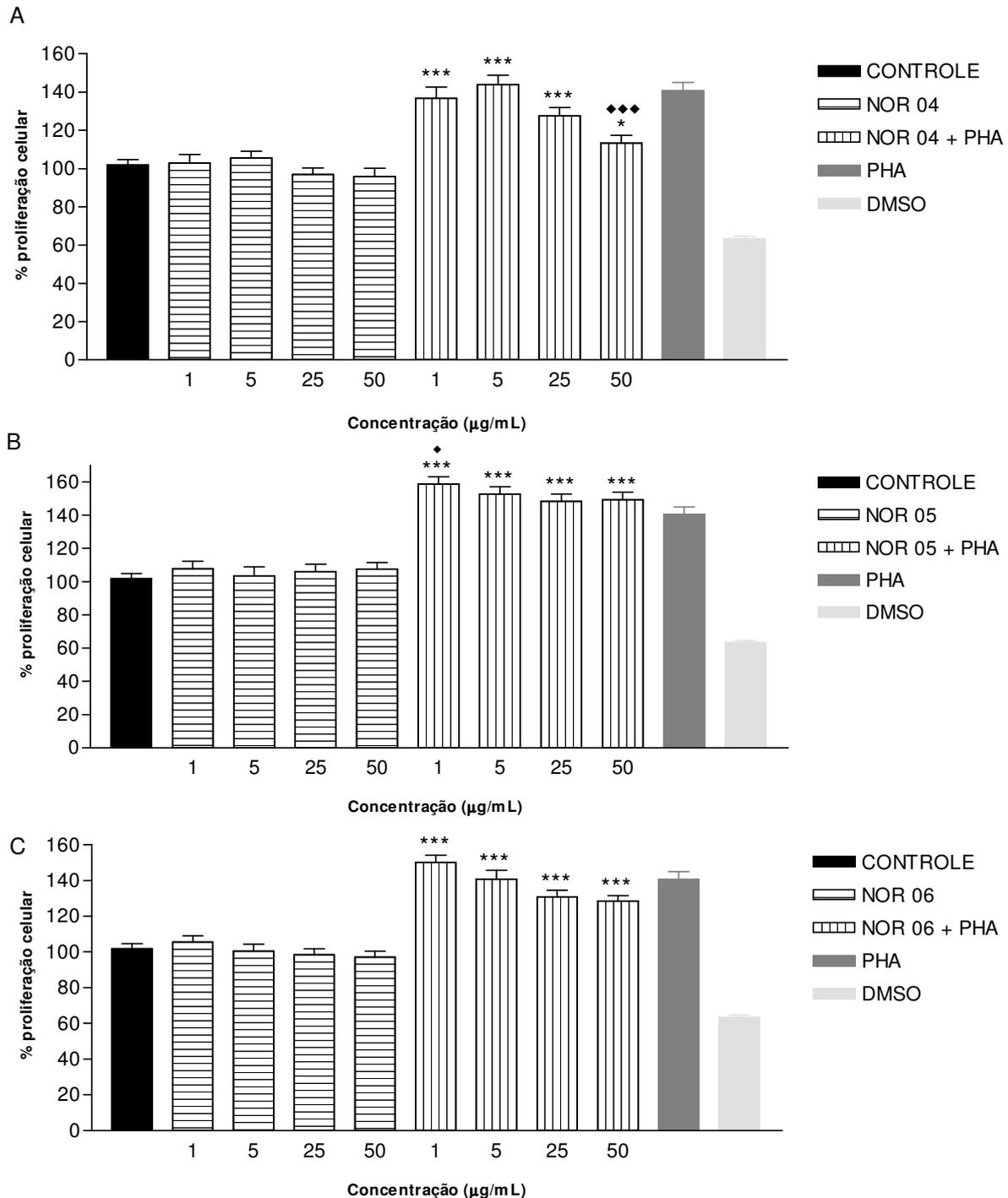
Os resultados representam média ± erro padrão da média de quatro experimentos em quadruplicata. CONTROLE: células em meio de cultura; PHA: células cultivadas com fitohemaglutinina 5 µg/mL; DMSO: células cultivadas com dimetilsulfóxido 10%; \* p<0,05, \*\* p<0,01 e \*\*\* p<0,001 em relação ao CONTROLE; ♦ p<0,05 e ♦♦ p<0,01 em relação ao PHA.

O tratamento das células mononucleares humanas com os compostos NOR 04, NOR 05 e NOR 06, incubados isoladamente e em todas as concentrações testadas, mostrou não interferir no crescimento celular e manteve a proliferação similar ao CONTROLE, de 95,9% a 105,4% para NOR 04 (Figura 17), de 103,3% a 107,7% para NOR 05 (Figura 17) e de 97,0% a 105,5% para NOR 06 (Figura 17). Nesta condição de cultivo na ausência do mitógeno, o efeito citotóxico do BF 04 e do BF 05 e o efeito supressor do BF 06 foi eliminado pela síntese dos adutos correspondentes.

As células estimuladas com PHA sob tratamento com o aduto NOR 04 mostraram proliferação de 113,3% a 143,9% (Figura 17), demonstrando redução do efeito proliferativo da PHA apenas na concentração de 50 µg/mL. Contrariamente, as células estimuladas com PHA e tratadas com NOR 05 mostraram ação imunoproliferativa na concentração de 1 µg/mL (158,7%) superior à própria PHA ( $p < 0,05$ ). Assim, a síntese destes dois adutos eliminou a atividade citotóxica observada no derivado fenacílico original (BF 04 e BF 05). As células estimuladas com PHA e tratadas com NOR 06 mantiveram o efeito da PHA, com proliferação de 128,4% a 150,2%, semelhantes ao observado com o composto BF 06.

A análise dos resultados obtidos no cultivo de células mononucleares humanas tratados com os adutos do norfloxacin com o brometo de fenacila e derivados fenacílicos na ausência do mitógeno demonstrou que o aduto NOR 01 estimulou a proliferação, enquanto que os demais adutos não interferiram no crescimento celular.

Os resultados permitem inferir que a adição de um átomo de cloro (NOR 02) ou dois átomos de cloro (NOR 06) inibe a atividade proliferativa do aduto que contém apenas um átomo de hidrogênio na posição C-7 (NOR 01), enquanto que um átomo de flúor (NOR 03) e um radical metil (NOR 04) inibem a atividade proliferativa do aduto original e suprimem a atividade da PHA, e ainda que a adição de um radical metoxi (NOR 05) inibe a atividade proliferativa do aduto NOR 01, mas amplifica discretamente a atividade mitogênica da PHA.



**Figura 17.** Proliferação de células mononucleares humanas *in vitro* frente ao aduto do brometo de 4-metilfenacila com norfloxacina (NOR 04, A), aduto do brometo de 4-metoxifenacila com norfloxacina (NOR 05, B) e aduto do brometo de 3,4-diclorofenacila com norfloxacina (NOR 06, C) nas concentrações de 1, 5, 25 e 50 µg/mL incubadas isoladas ou simultaneamente com fitohemaglutinina (5 µg/mL) por 72 h a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

Os resultados representam média ± erro padrão da média de quatro experimentos em quadruplicata. CONTROLE: células em meio de cultura; PHA: células cultivadas com fitohemaglutinina 5 µg/mL; DMSO: células cultivadas com dimetilsulfóxido 10%; \* p<0,05 e \*\*\* p<0,001 em relação ao CONTROLE; ♦ p<0,05 e ♦♦♦ p<0,001 em relação ao PHA.

A comparação dos resultados obtidos com os adutos sintetizados e aqueles obtidos com os brometos de fenacila mostrou que a síntese do aduto com o

norfloxacin eliminou a atividade citotóxica dos compostos iniciais, inclusive proporcionando o estímulo da proliferação celular para o NOR 01. Fang e colaboradores (2000) relataram que um composto com substituinte metil no anel piperazina do C-7 do norfloxacin não mostrou citotoxicidade em duas linhagens de câncer renal (CAKI-1 e RXF 393), mas foi fracamente citotóxico para outra linhagem de câncer de renal (UO-31), enquanto que outros seis derivados com grupos eletrofílicos na mesma posição mostraram citotoxicidade.

Os mecanismos envolvidos na atividade encontrada na determinação da proliferação celular frente aos brometos de fenacila e adutos destes com o norfloxacin não estão elucidados. Uma hipótese levantada estaria relacionada com a característica eletrofílica dos compostos, enquanto doadores e sacadores de elétrons e polarização da molécula. Contudo, este efeito não foi evidenciado de forma característica nos resultados aqui obtidos, pois os brometos com substituintes eletrofílicos potencialmente sacadores de elétrons (BF 02 e BF 03) obtiveram citotoxicidade similar a outros dois brometos que apresentam grupamentos doadores de elétrons (BF 04 e BF 05). Embora o potencial eletrofílico de dois átomos de cloro (BF 06) seja mais potente que um átomo de flúor (BF 03), o efeito sobre a redução da proliferação celular foi menor para o primeiro composto que para este último. Igualmente, quando comparados os adutos NOR 03 e NOR 04, que possuem grupamento com eletrofilicidade diferentes, a similaridade nos resultados obtidos com ambos os compostos também discorda desta hipótese.

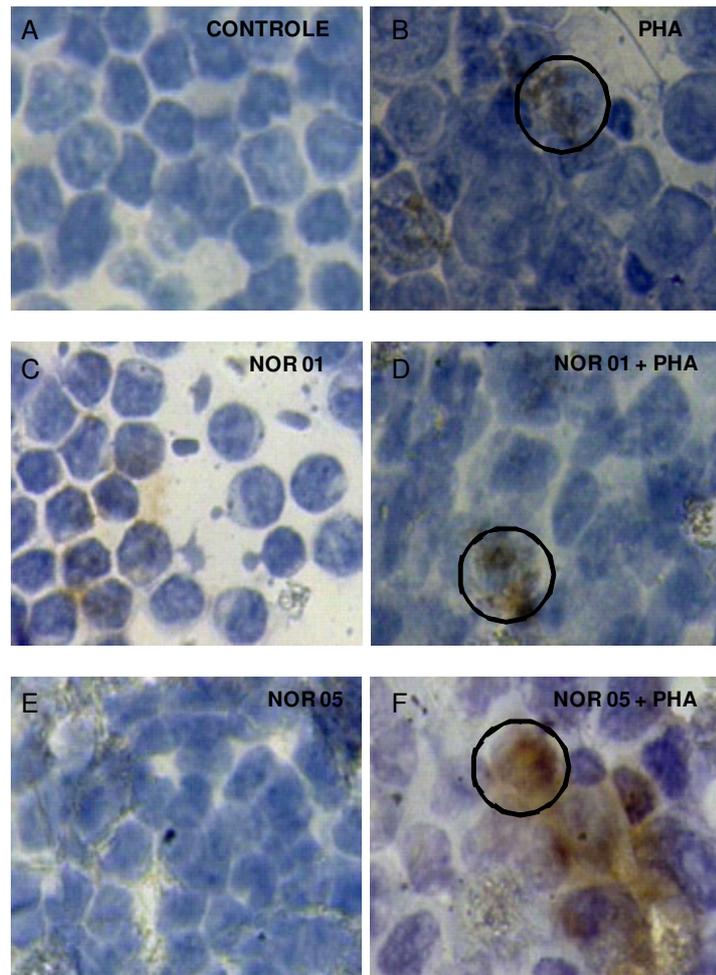
As modificações no C-7 em 4-aminoquinolonas com diferentes cadeias alifáticas em C-4 demonstraram citotoxicidade *in vitro* em células de câncer mamário, tendo a substituição por um átomo de flúor na posição 7 apresentado maior citotoxicidade que o átomo de cloro, sugerindo que a presença de substituintes eletrofílicos na estrutura química parece ser responsável pela redução da proliferação celular (ZHANG et al., 2008). Em concordância com esta hipótese foi demonstrado que derivados com potencial citotóxico superior a 50% em diversas linhagens de células tumorais humanas *in vitro* e com baixas concentrações de derivados fluorquinolônicos possuem no anel piperazina em C-7 um substituinte volumoso como o grupamento oxima, o qual possui caráter eletrofílico (FOROUMADI et al., 2009). Riesbeck e Forsgren (1995) demonstraram que o derivado quinolônico CP-115,953 (ácido 1-ciclopropil-6,8-difluoro-7-[4'-hidroxifenil]-4-quinolona-3-

carboxílico) suprimiu 50% do crescimento de linfócitos humanos estimulados com PHA.

A literatura tem descrito que a exposição de linfócitos humanos frente a concentrações superiores a 50 µg/mL de quinolona e incubados simultaneamente à PHA mostra inibição da proliferação celular (SHALIT, 1991; CHOI et al., 2003), e que o crescimento de linfócitos e a progressão do ciclo celular da fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> para a fase S tem sido inibida por quinolonas em concentrações mesmo inferiores a 20 µg/mL (GOLLAPUDI et al., 1986; FORSGREN; SCHLOSSMAN; TEDDER, 1987; GOLLAPUDI; PERUMAL; THADEPALLI, 1992; RIESBECK; FORSGREN, 1994; RIESBECK et al., 1998; CHOI et al., 2003; FOROUMADI et al., 2009). Quanto a atividade antibacteriana de compostos análogos às fluorquinolonas, Chen e colaboradores (2001) mostraram evidências não satisfatórias, pois avaliaram inúmeros derivados quinolônicos com modificações em C-7 quanto à atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, *Streptococcus pneumoniae* resistente à eritromicina e ampicilina e *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina, sendo que alguns deles, todos inativos contra as cepas testadas, apresentam a configuração química similar aos adutos avaliados no presente trabalho (NOR 01, NOR 03, NOR 02 e NOR 05).

## **5.2 Avaliação da Atividade Proliferativa dos Adutos dos Brometos de Fenacila com Norfloxacin**

A determinação da proliferação celular identificou a atividade proliferativa do NOR 01 e do NOR 05 sobre as células mononucleares humanas *in vitro* e conduziu à identificação da expressão de KI-67 nas células tratadas com estes compostos. A percentagem de células marcadas positivamente para KI-67 tem sido utilizada para quantificar a atividade proliferativa de determinado tipo celular (COLOZZA et al., 2005; WOLKWEIS, 2006), procedimento justificado pela expressão desta proteína nas fases do ciclo celular, exceto na fase G<sub>0</sub> (BROWN; GATTER, 2002; WIESNER et al., 2009).



**Figura 18.** Fotomicrografia representativa de imunocitoquímica (1000x) para a detecção da expressão de KI-67 por células mononucleares humanas incubadas isoladamente em meio de cultura (CONTROLE, A) e na presença de fitohemaglutinina 5 µg/mL (PHA, B), aduto do brometo de fenacila com norfloxacin isoladamente (NOR 01, C) e na presença de fitohemaglutinina (NOR 01 + PHA, D), aduto do brometo de 4-metoxifenacila com norfloxacin isoladamente (NOR 05, E) e na presença de fitohemaglutinina 5 µg/mL (NOR 05 + PHA, F) na concentração de 50 µg/mL por 72 h a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

Círculo: Marcação da imunocitoquímica para KI-67.

A Figura 18 dispõe as fotomicrografias representativas da expressão de KI-67 em células mononucleares humanas tratadas com NOR 01 e NOR 05 na concentração de 50 µg/mL, na presença e na ausência do estímulo mitogênico da PHA. As células mantidas em meio de cultura foram empregadas como controle basal de proliferação celular (CONTROLE), enquanto que as células mantidas na

presença da PHA (5 µg/mL) foram utilizadas como controle positivo de proliferação celular.

A positividade na expressão de KI-67 pelas células tratadas com NOR 01 e NOR 05 na presença de PHA foi à ordem de (++), em concordância com os resultados da proliferação celular, respectivamente 137,1% e 149,2% de crescimento celular. A estimulação da proliferação celular pelos compostos na ausência do mitógeno não foi suficiente para a detecção da expressão da proteína pela imunocitoquímica. A utilização de uma metodologia de maior sensibilidade, como o *western blotting*, provavelmente possibilitaria revelar a expressão de KI-67 nas células tratadas com NOR 01 e NOR 05 e, assim, identificar a capacidade estimuladora dos compostos *per si* sobre a proliferação celular.

Outros autores também têm reportado que representantes da classe dos agentes antibacterianos fluoroquinolônicos e derivados quinolônicos, como o ciprofloxacina, são indutores da imunoestimulação da proliferação celular e humoral em células murinas e mononucleares humanas (FORSGREN; SCHLOSSMAN; TEDDER, 1987; BAILLY et al., 1990; BAILLY et al., 1991; SHALIT, 1991; STUNKEL; HEWLETT; ZEILER, 1991; RIESBECK; FORSGREN, 1995). Souza e colaboradores (2007) também mencionam em resultados preliminares obtidos com compostos derivados do norfloxacina e de diferentes pesos moleculares que esses compostos estimulam a resposta de células mononucleares humanas *in vitro* ao mitógeno PHA.

Dentre os adutos avaliados, o NOR 01 apresenta melhor potencial imunoestimulador, pois isoladamente induziu a proliferação celular (Figura 16). Este mesmo composto também apresentou importante atividade antimicrobiana contra as cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* e *Staphylococcus aureus* (MARTINS, 2009). Os resultados destes dois estudos sugerem o NOR 01 como composto promissor na busca por um antimicrobiano com ação imunoestimuladora.

### **5.3 Avaliação da Atividade Citotóxica dos Brometos de Fenacila**

Os experimentos prévios na determinação da proliferação celular identificaram a atividade citotóxica do brometo de fenacila e dos derivados fenacílicos sobre as células mononucleares humanas *in vitro*, com maior atividade na concentração de 50 µg/mL e sem diferença significativa entre os compostos BF

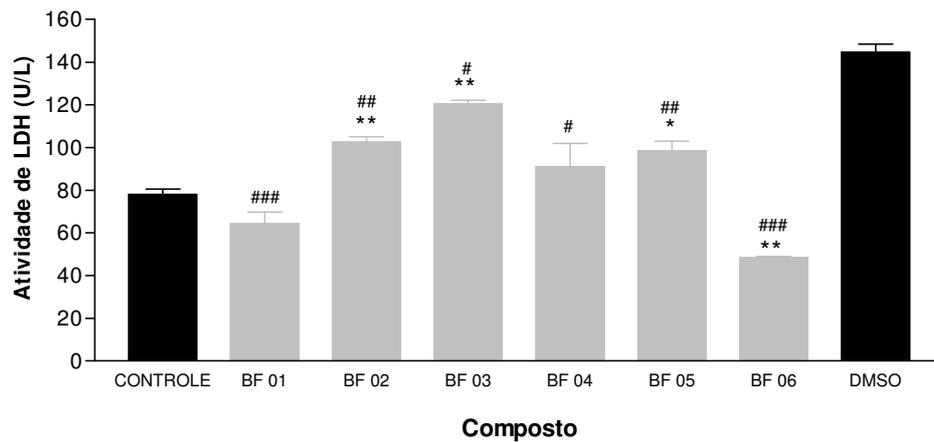
01, BF 02, BF 03, BF 04 e BF 05 ( $p < 0,001$ ). Estes resultados conduziram à pesquisa da via de morte celular, apoptose e necrose, envolvida no tratamento das células com os compostos.

### **5.3.1 Determinação da atividade da lactato desidrogenase (LDH)**

A quantificação da atividade de LDH é uma metodologia correlacionada com a viabilidade celular (CRUZ-CHAMORRO et al., 2006). Na morte celular ocorre o desenvolvimento de resposta inflamatória devido à liberação de enzimas que iniciam o processo inflamatório dos tecidos adjacentes (BURLACU et al., 2001). Justamente pela liberação de enzimas durante a morte celular é que o aumento da concentração e da atividade da lactato desidrogenase é considerado como um marcador de necrose (CRUZ-CHAMORRO et al., 2006).

Os sobrenadantes do cultivo celular tratado com os compostos BF 01, BF 02, BF 03, BF 04, BF 05 e BF 06 apresentaram concentração de LDH inferior ao DMSO (controle positivo de citotoxicidade,  $p < 0,05$ ) (Figura 19). O tratamento das células com os compostos BF 02, BF 03 e BF 05 apresentou atividade enzimática em concentrações que variaram de 98,5 U/L a 120,5 U/L, valores superiores às células sem tratamento (CONTROLE,  $p < 0,05$ ). No cultivo celular, as células mononucleares humanas incubadas simultaneamente a estes três compostos apresentaram perfis semelhantes de proliferação celular, 69,7%, 68,5% e 66,4%, respectivamente na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$ . Já o BF 06 apresentou uma proliferação celular de 90,1% nesta mesma concentração, em concordância com a baixa concentração de LDH, 48,5 U/L, obtida do sobrenadante deste cultivo celular, quando comparada ao CONTROLE ( $P < 0,01$ ).

Por fim, os compostos BF 01 e BF 04 apresentaram concentração de LDH semelhante ao CONTROLE, respectivamente 64,33 U/L e 91,0 U/L (Figura 19). Apesar do crescimento celular do BF 01 e BF 04, na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$ , não apresentarem diferença estatística quando comparados com o BF 02, BF 03 e BF 05, mostraram dosagem de LDH inferior a estes brometos.



**Figura 19.** Atividade de Lactato desidrogenase (U/L) formada pela exposição *in vitro* das células mononucleares humanas ao brometo de fenacila (BF 01), brometo de 4-clorofenacila (BF 02), brometo de 4-fluorfenacila (BF 03), brometo de 4-metilfenacila (BF 04), brometo de 4-metoxifenacila (BF 05) e brometo de 3,4-diclorofenacila (BF 06) na concentração de 50 µg/mL durante 72 h a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

Os resultados representam a média ± o erro padrão da média de quatro experimentos em quadruplicata; CONTROLE: células mantidas em meio de cultura; DMSO: células tratadas com dimetilsulfóxido a 10%, controle positivo de necrose; \* p<0,05 e \*\* p<0,01 em relação ao CONTROLE; # p<0,05, ## p<0,01 e ### p<0,001 em relação ao DMSO.

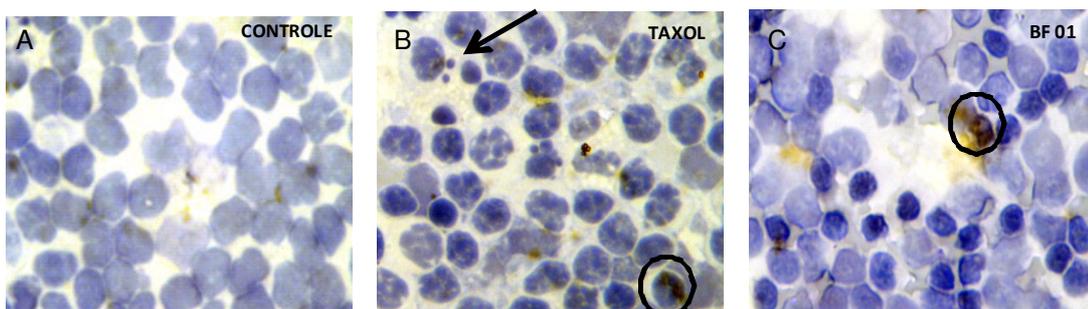
O processo de morte depende de múltiplos fatores, como o sítio de infecção, a natureza e inóculo do agente agressor. Os linfócitos infectados têm a apoptose como via de morte predominantemente, enquanto os macrófagos e as células dendríticas morrem preferencialmente por piroptose e, em alguns casos, por apoptose (LABBÉ; SALEH, 2008). Além disso, no processo apoptótico a caspase-3 é mais expressa em células de origem linfocítica, as quais desempenham um importante papel na homeostase dos LT, limitando a resposta imune e deletando LT auto-reativos. Diferentes estudos reportaram a existência da apoptose prejudicada em LT em pacientes com doenças auto-imunes, como anemia hemolítica e trombocitopenia (VENDRAME et al., 2006).

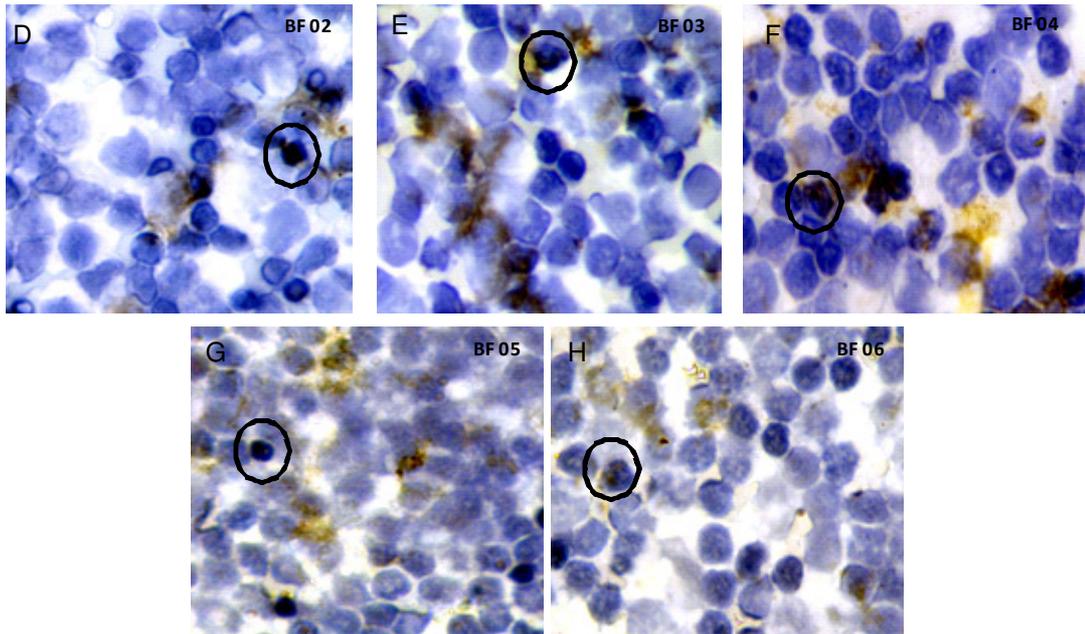
Em resumo, e as técnicas utilizadas, LDH e MTT, indicam que os brometos de fenacila apresentam citotoxicidade e/ou supressão da proliferação celular. De acordo com Fink e Cookson (2005), os processos de mortes, apoptose e necrose, podem ocorrer simultaneamente, quando na falta de fagocitose os corpos apoptóticos são lisados e secundariamente sofrem necrose, desencadeando também um processo inflamatório. Contudo, estes resultados não elucidam a via de morte, sendo

necessários testes complementares e específico para detalhamento de via de morte, os quais estão descritos posteriormente.

### 5.3.2 Detecção de caspase-3 por imunocitoquímica

A caspase-3 é amplamente distribuída e significativamente expressa em linfócitos, sugerindo ser mediador de apoptose no sistema imune (LABBÉ; SALEH, 2008; DUPREZ et al., 2009; RASTOGI; RICHA; SINHA, 2009). A imunocitoquímica para detecção de caspase-3 nas células tratadas com os compostos BF 01, BF 02, BF 03, BF 04 e BF 05 está representada na Figura 20. As células mantidas em meio de cultura (CONTROLE) não apresentaram a expressão de caspase-3 detectável pela técnica de imunocitoquímica, enquanto que o controle positivo de citotoxicidade induzida pela via apoptótica - Taxol<sup>®</sup> (TAXOL) apresentou positividade para caspase-3 na ordem de (++++) de marcação, mostrando a efetividade da metodologia. As células tratadas com o derivado fenacílico BF 01 mostraram positividade para a expressão de caspase-3 classificada como (++) . A expressão de caspase-3 foi maior no tratamento com os compostos BF 02, BF 03, BF 04 e BF 05, com positividade na ordem de (+++). As células expostas ao composto BF 06 mostraram positividade de apenas (+) na expressão de caspase-3, sendo que a supressão da proliferação celular também foi discreta (90,1% na concentração de 50 µg/mL). Estes resultados indicam a apoptose como via de morte envolvida na citotoxicidade destes compostos.





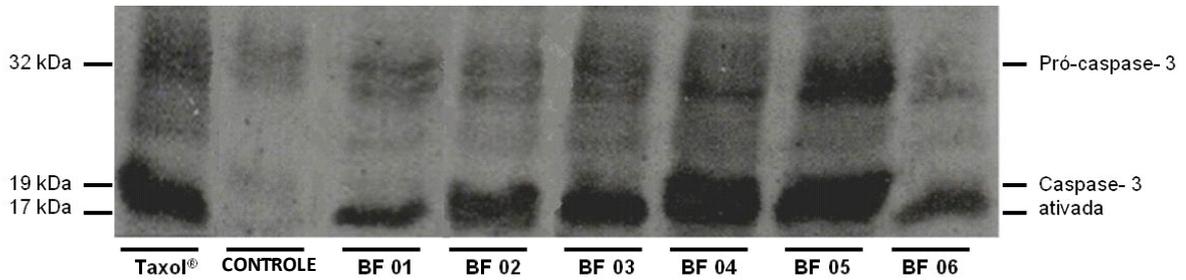
**Figura 20.** Fotomicrografia representativa da imunocitoquímica (1000x) para a detecção da expressão de caspase-3 por células mononucleares humanas incubadas em meio de cultura (CONTROLE, A), na presença de Taxol<sup>®</sup> (TAXOL, B), brometo de fenacila (BF 01, C), brometo de 4-clorofenacila (BF 02, D), brometo de 4-fluorfenacila (BF 03, E), brometo de 4-metilfenacila (BF 04, F), brometo de 4-metoxifenacila (BF 05, G) e brometo de 3,4-diclorofenacila (BF 06, H) na concentração de 50 µg/mL por 9 h a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

Seta: Formação de corpos apoptóticos induzida pelo Taxol<sup>®</sup>. Círculos: Marcação da imunocitoquímica para caspase-3.

### 5.2.3 Detecção de caspase-3 por western blotting

O *western blotting* foi outra metodologia utilizada na detecção de caspase-3, pois tem maior sensibilidade que a imunocitoquímica. As células incubadas em meio de cultura (CONTROLE) expressaram a banda de pró-caspase-3 (32 kDa) com fraca intensidade, referindo-se a síntese basal desta proteína inativa na célula (Figura 21). O Taxol<sup>®</sup> apresentou bandas referentes às pró-caspases e à subunidade ativada (14-21 kDa) com maior intensidade, indicando o processo de morte celular característico do fármaco. Os derivados fenacílicos BF 02, BF 03, BF 04 e BF 05 revelaram no *western blotting* bandas com grande intensidade, tanto da forma inativa quanto da forma ativa da proteína, sendo estes os compostos que também obtiveram positividade mais intensa (+++) na imunocitoquímica. O composto BF 01 mostrou menor expressão em ambas as bandas da caspase-3, enquanto que o BF

06 mostrou expressão ainda inferior que os demais. Os resultados obtidos com BF 01 e BF 06 são concordantes com aqueles obtidos na expressão de caspase-3 por imunocitoquímica, respectivamente (++) e (+).



**Figura 21.** Expressão de caspase-3 por células mononucleares humanas incubadas em meio de cultura (CONTROLE), na presença de Taxol<sup>®</sup> a 30  $\mu$ M, brometo de fenacila (BF 01), brometo de 4-clorofenacila (BF 02), brometo de 4-fluorfenacila (BF 03), brometo de 4-metilfenacila (BF 04), brometo de 4-metoxifenacila (BF 05) e brometo de 3,4-diclorofenacila (BF 06) na concentração de 50  $\mu$ g/mL por 9 h a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, detectada por *western blotting* em gel de poliacrilamida a 12%.

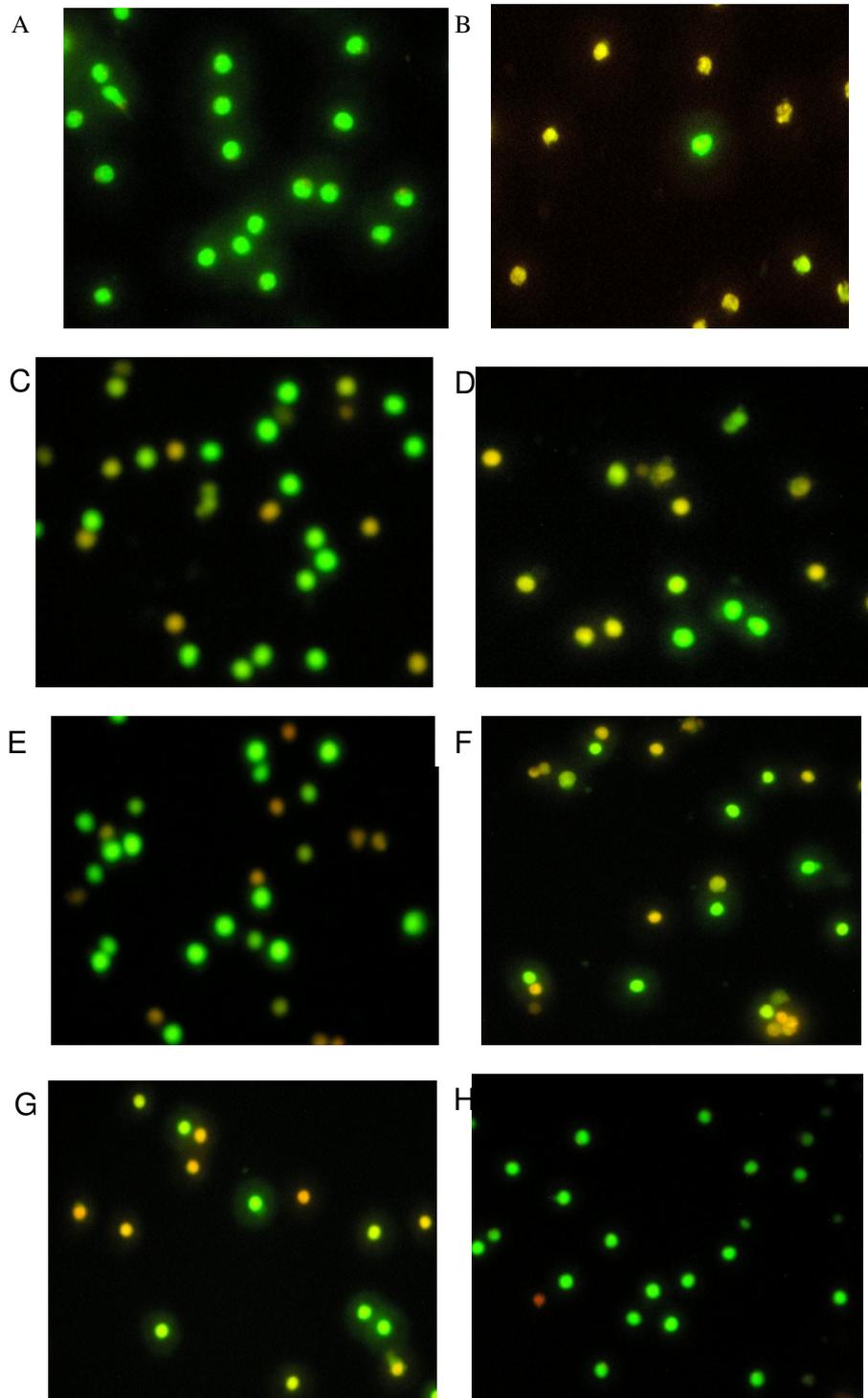
#### 5.2.4 Análise morfológica por microscopia de fluorescência

A morfologia das células mononucleares humanas tratadas com os brometos de fenacila a 50  $\mu$ g/mL por 24 h a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> foi investigada utilizando coloração de laranja de acridina e brometo de etídeo por microscopia fluorescente. A análise morfológica evidenciada pelo laranja de acridina e brometo de etídeo permite diferenciar células viáveis daquelas em processo de morte por necrose ou apoptose com base em alterações morfológicas nucleares e citoplasmáticas (McGAHON et al., 1995). As células uniformemente coradas de verde pelo laranja de acridina e com morfologia normal foram observadas no CONTROLE (Figura 22A). O Taxol<sup>®</sup> a 30  $\mu$ M empregado como controle positivo de apoptose induziu características apoptóticas às células (redução do volume celular, aparecimento de corpos apoptóticos, formação de vacúolos intracelulares e condensação de cromatina), bem como coloração alaranjada proveniente do brometo de etídeo, o que, conforme a

literatura, já era esperado (BUFALO et al., 2002; OFIR et al., 2002; EBERDING et al., 2007).

As células tratadas com os brometos BF 02, BF 03, BF 04 e BF 05 apresentaram características apoptóticas marcantes quanto morfologia e coloração, em concordância com o teste de imunocitoquímica (Figura 20). Da mesma forma, as células tratadas com o composto BF 01 apresentaram evidências do processo de morte apoptótica, mas de menor projeção que os brometos citados acima. O BF 06, por sua vez, evenciou grande viabilidade e pequena expressão de células com coloração e morfologia apoptótica. Este resultado mostrou correlação com o ensaio de *western blotting*, pois o BF 01 revelou menor expressão em ambas as bandas da caspase-3 e o BF 06 mostrou expressão ainda inferior aos demais brometos testados. Na avaliação da expressão de caspase-3 por imunocitoquímica, os resultados obtidos com BF 01 e BF 06, respectivamente (++) e (+), demonstram analogia com os resultados mostrados pela coloração de laranja de acridina e brometo de etídeo.

Os ensaios utilizados neste estudo propiciaram identificar compostos com atividade citotóxica sobre células mononucleares humanas *in vitro* e outro com atividade imunoestimuladora, esta última atividade especificamente sobre linfócitos T se considerada o emprego de PHA no cultivo celular. Isto sugere como continuidade do estudo a investigação do efeito imunoestimulador também em outras populações celulares do sistema imune, como LB, além de outros ensaios e modelos que possibilitarão elucidar os mecanismos envolvidos nas atividades imunoestimuladora e citotóxica.



**Figura 22.** Efeito do brometo de fenacila (BF 01, C), brometo de 4-clorofenacila (BF 02, D), brometo de 4-fluorfenacila (BF 03, E), brometo de 4-metilfenacila (BF 04, F), brometo de 4-metoxifenacila (BF 05, G) e brometo de 3,4-diclorofenacila (BF 06, H) na concentração de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por 24 h a 37°C com 5% de  $\text{CO}_2$ , na viabilidade de células mononucleares humanas; (A) Controle negativo (células incubadas isoladamente em meio de cultura – CONTROLE); (B) Controle positivo (células na presença de Taxol<sup>®</sup> a 30  $\mu\text{M}$  – TAXOL).

## 6 CONCLUSÕES

- ✓ Os seis brometos de fenacila avaliados apresentaram citotoxicidade em células mononucleares humanas cultivadas *in vitro*.
- ✓ As células tratadas com compostos BF02, BF 03 e BF 05 apresentaram produção de LDH, expressão de caspase-3, coloração com brometo de etídio e morfologia apoptótica, características estas indicativas da presença de apoptose como via de morte envolvida.
- ✓ A diversidade de resultados frente às características químicas dos compostos impossibilitou a construção de hipóteses relacionando o mecanismo de morte celular e a estrutura química dos compostos.
- ✓ A síntese dos adutos do brometo de fenacila com o norfloxacin inibiu a elevada citotoxicidade apresentada pelo BF 01, BF 02, BF 03, BF 04 e BF 05 em células mononucleares humanas *in vitro*.
- ✓ Entre os adutos formados, o NOR 01 e NOR 05 promoveram o estímulo da proliferação celular, inclusive com a expressão de KI-67 detectada pela imunocitoquímica.

## REFERÊNCIAS

- AHMED, R., SPRENT, J. Immunological memory. **Immunologist**, v. 7, n. 1-2, p. 23-26, 1999.
- AJCHENBAUM, F.; ANDO, K.; DECAPRIO, J. A.; GRIFFIN, J.D. Independent regulation of human D-type cyclin gene expression during G<sub>1</sub> phase in primary T lymphocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 4113-4119, 1993.
- ALAM, A.; COHEN, L. Y.; AOUAD, S.; SÉKALY, R. Early activation of caspases during t lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 190, p. 1879-1890, 1999.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF M.; ROBERTS K.; WATSON, J.D. **Molecular Biology of the Cell., Molecular Biology of the Cell.** 3 ed. New York: Garland Science, 2002.
- AMBROZ, K. L.H. Improving quantification accuracy for western blots. **Image Analysis**, n. 9, p.32-34, 2006.
- ARAUJO, F.G.; SLIFER, T. L.; REMINGTON, J. S. Effect of moxifloxacin on secretion of cytokines by human monocytes stimulated with lipopolysaccharide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, p. 26–30. 2002
- BABICH, H.; BORENFREUND, E. Neutral red assay for toxicology *in vitro*. In: WATSON, R.R. **Methods in Toxicology and Pharmacology**. Boca Raton (FL):CRC Press, p. 237-251,1992.
- BAILLY, S.; FERRUA, B.; FAY, M.; GOUGEROT-POCIDALO, M. A. Differential regulation of IL-6, IL1A, IL-1 beta and TNF alpha production in LPS-stimulated human monocytes: role of cyckic AMP. **Cytokine**, v. 2, p. 205-210, 1990.
- BAILLY, S.; FERRUA, B.; FAY, M.; GOUGEROT-POCIDALO, M. A. Ciprofloxacin treatment *in vitro* increase the *ex vivo* capacity of lipopolysaccharide-stimulated human monocytes to produce IL-1, IL-6 and tumor necrosis factor alpha. **Clinical Experimental Immunology**, v. 85, p. 331-334, 1991.
- BAKSHI, R.P.; SHAPIRO, T.A. DNA topoisomerases as targets for antiprotozoal therapy. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 597-608, 2003.
- BALDACCI, E. R. Efeito imunomodulador dos antibióticos. **Pediatria**, v. 19, p.5, 1997.
- BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, p. 245-252, 1998.
- BANCK, G.; FORSGREN, A. Antibiotics and suppression of lymphocyte function *in vitro*. **Journal of Immunology**, v. 16, p. 554-560, 1979.
- BAUHOFER, A.; HUTTEL, M.; LORENZ, W.; SESSLER, D. I.; TOROSSIAN, A. Differential effects of antibiotics in combination with G-CSF on survival and polimorphonuclear granulocyte cell functions in septic rats. **BMC Infectious diseases**, v. 8, n. 55, p. 1-10, 2008.
- BOENISCH, T. **Handbook on Immunohistochemical Staining Methods**. 3 ed. Carpinteria: DAKO Corporation, 2001.
- BOGLIOLO, L. **Patologia Geral**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 1998.
- BONSING, B. A.; COVER, W.E.; GORSIRA, M. C. B.; VAN VIET, M.; OUD, P.S.; CORNELISSE, C.J. Specific of seven Monoclonal antibodies against p53 evaluated with Western blotting, immunohistochemistry, confocal laser scanning microscopy and flow cytometry. **Cytometry**, v. 28, p. 11-24, 1997.

- BOOGAERTS, M. A.; MALBRAIN, S.; SCHEERS, W.; VERWILGHEN, R. L. Effects of quinolones on granulocyte function in vitro. **Infection**, v. 14, n. 4, p. 258-262, 1986.
- BORENFREUND, E. Neutral Red Cytotoxicity Assay. **ECVAM DB-ALM: INVITTOX protocol**, n° 64, p. 1-16, 1992.
- BORGHETTI, P.; SALERI, R.; MOCCHEGIANI, E.; CORRADI, A.; MARTELLI, P. Infeccion, immunity and the neuroendocrine response. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 130, p. 141-162, 2009.
- BORTNER, C. D.; CIDLOWSKI, J. A. Cellular mechanisms for the repression of apoptosis. **Annual review of pharmacology and toxicology**. v.42, p.259-281, 2002.
- BOYUM, A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. **Scandinavian Journal of Clinical Investigation**, v. 97, p. 7, 1968.
- BOYUM, A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 5, p. 9-15, 1976.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução n° 196, de 10 de out. de 1996. **Diário Oficial da União**, Brasília, n° 201, 16 de out. 1996. Seção 1, p. 21082-21085. [Diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos].
- BROWN, D. C.; GATTER, K. C. KI-67 protein: the immaculate deception?. **Histopathology**, v. 40, p. 02-11, 2002.
- BRUEY, J.; KANTARJIAN, H.; ESTROV, Z.; ZHANG, Z.; MA, W.; ALBITAR, F.; ABDOOL, A.; THOMAS, D.; YEH, C.; O'BRIEN, S.; ALBITAR, M. Circulating Ki-67 protein in plasma as a biomarker and prognostic indicator of acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia Research**, doi:10.1016/j.leukres.2009.07.030, 2009.
- BUENO, E.C., VAZ, A.J., OLIVEIRA, C.A., MACHADO, L.R., LIVRAMENTO, J.A., MIELLI, S.R., UEDA, M. Analysis of cells in cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis by means of flow cytometry. **Cytometry**, v. 38, p. 106-110, 1999.
- BUENO, E. C.; VAZ, A. J.; MACHADO, R.; LIVRAMENTO, J. A.; ÁVILA, L. M.; FERREIRA, W. Antigen-specific suppression of cultured lymphocytes from patients with neurocysticercosis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 126, p. 104-110, 2001.
- BUFALO, D.; CASTRO, V.; BIROCCIO, A.; VARMI, M.; SALANI, D.; ROSANO, L.; TRISCIUOGGIO, D.; SPINELLA, F.; BAGNATO, A. Endothelin-1 protects ovarian carcinoma cells against Paclitaxel-induced apoptosis: requirement for akt activation. **Molecular Pharmacology**, v. 61, p. 524-532, 2002.
- BUTTKE, T. M.; MCCUBREY, J. A.; OWEN, T. C. Use of an aqueous tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines. **Journal of Immunological Methods**, v. 157, p. 233-240, 1993.
- BURLACU, A.; JINGA, V.; GAFENCU, A. V.; SIMIONESCU, M. Severity of oxidative stress generates different mechanisms of endothelial cell death. **Cell and tissue research**. v.306, p.409-416, 2001.
- CABAUD, P. G.; WRÓBLEWSKI, F. Colorimetric measurement of lactic dehydrogenase activity of body fluids. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 30, p. 234-236, 1981.
- CAEKENBERGHE, D. K. L.; PATTYN, S. R. *In vitro* activity of ciprofloxacin compared with dose other new fluorinated piperrazinyl-substituted quinolone derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 25, p. 518-521, 1984.
- CARTER, C. **Neuropharmacology of Polyamines**. Londres: Academic Press, 1994.

- CASTRO, L. N. **Engenharia imunológica: desenvolvimento e aplicação de ferramentas computacionais inspirados em sistemas imunológicos artificiais**. 2001. 287f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Elétrica, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2001.
- CENTNER, J.; WECK, A. L. **Atlas of immuno-allergology**. Seattle: Hogrefe & Huber Publishers, 1995.
- CHAMPOUX, J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. **Annual Review of Biochemistry**, v. 70, p. 369-413, 2001.
- CHEN, Y.; FANG, K.; SHEU, J.; HSU, S.; TZENG, C. Synthesis and antibacterial evaluation of certain quinolone derivatives. **Journal Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 2374-2377, 2001.
- CHEN, Y.; CHANG, S.; WU, M.; CHUANG, K.; WU, J.; TSAI, W.; KUO, Y. Norcantharidin reduced cyclins and cytokines production in human peripheral blood mononuclear cells. **Life Sciences**, v. 84, p. 218-226, 2009.
- CHOI, J.; SONG, M.; KIM, S.; CHOI, S.; LEE, D.; YOO, J.; SHIN, W. Effect of moxifloxacin on production of proinflammatory cytokines from human peripheral blood mononuclear cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 3704-3707, 2003.
- CLAUSEN, C. A. Immunological Detection of Wood Decay Fungi: An Overview of Techniques Developed from 1986 to the Presently. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.39, p. 133-143, 1997.
- COLOZZA, M.; AZAMBUJA, E.; CARDOSO, F.; SORTIRIOU, C.; LARSIMONT, D.; PICCART, M. J. Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now? **Annals of Oncology Advanced Access**, doi:10.1093/annonc/mdi352, p. 1-17, 2005.
- CRUZ-CHAMORRO, L.; PUERTOLLANO, M. A.; PUERTOLLANO, E.; DE CIENFUEGOS, G. A.; DE PABLO, M. A. In vitro biological activities of magainin alone or in combination with nisin. **Peptides**, v.27, p.1201-1209, 2006.
- DAGUANO, J. K. M. F.; SANTOS, C.; ROGERO, S. O. Avaliação da citotoxicidade de biocerâmicas desenvolvidas para uso em sistemas de implantes. **Revista Matéria**, v. 12, p. 134-139, 2007.
- DALHOFF, A.; SHALIT, I. Immunomodulatory effects of quinolones. **Lancet Infectious Diseases**, v. 3, 359-371, 2003.
- DAVIS, R. H. Management of polyamine pools and the regulation of ornithine decarboxylase. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 44, p. 199-205, 1990.
- DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunology Methodology**, v. 89, p. 271-277, 1986.
- DIZMAN, B.; ELASRI, M. O.; MATHIAS, L. J. Synthesis, characterization, and antibacterial activities of novel methacrylate polymers containing norfloxacin. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 514-520, 2005.
- DREHER, H. **The Immune Power Personality: 7 traits you can develop to stay healthy**. Plume: Penguin Books, 1995.
- DUARTE, B. M.; VIEIRA, C. S. **Padronização do teste de proliferação linfocitária humana com fitohemaglutinina e avaliação do efeito imunomodulador dos extratos de *Rubus imperialis* e *Ipomea pes-caprae***. 2007. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2007.
- DUPREZ, L.; WIRAWAN, E.; BERGHE, T. V.; VANDENABEELE, P. Major cell death pathways at a glance. **Microbes and Infection**, v. 11, p. 1050-1062, 2009.

- EBERDING, A.; MADERA, C.; GUNS, E. S.; XIE, S.; WOOD, C. A.; BROWN, P. N. Evaluation of the antiproliferative effects of essiac on *in vitro* and *in vivo* models of prostate cancer compared to paclitaxel. **Nutrition and Cancer**, v. 58, p. 188-196, 2007.
- ECKHART, L.; BALLAUN, C.; HERMANN, M.; VANDEBERG, J. L.; SIPOS, W.; UTHMAN, A.; FISCHER, H.; TSCHACHLER, E. Identification of novel mammalian caspases reveals an important role of gene loss in shaping the human caspase repertoire. **Molecular Biology of Evolution**, v. 25, p.831-841, 2008.
- ENDL, E.; GERDES, J. The KI-67 protein: fascinating forms and na Unknown function. **Experimental Cell Research**, v. 257, p. 231-237, 2000.
- ERIKSSON, E.; FORSGREN, A.; RIESBECK, K. Several gene programs are induced in ciprofloxacin-treated human lymphocytes as revealed by microarray analysis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 74, p. 456-463, 2003.
- ESTEVES-SOUZA, A.; SILVA, T. M. S.; ALVES, C. C. F.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R.; ECHEVARRIA, A. Cytotoxic activities against erlich carcinoma and human K562 leukaemia of alkaloids and flavonoid from two *Solanum* species. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 13, n. 6, p. 838-842, 2002.
- FANG, K.; CHEN, Y.; SHEU, J.; WANG, T.; TZENG, C. Synthesis, antibacterial, and cytotoxic evaluation of certain 7-substituted norfloxacin derivatives. **Journal Medicinal Chemistry**, v.43, p. 3809-3812, 2000.
- FANTONI, M.; TAMHURRINI, E.; PALLAVICINI, F.; ANLINORI, A.; NERVO, P. Influence of ofloxacin and pefloxacin on human lymphocyte immunoglobulin secretion and on polymorphonuclear leucocyte superoxide anion production. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 22, p. 193-196, 1988.
- FINK, S.; COOKSON, B. T. Apoptosis, pyroptosis and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 1907-1916, 2005.
- FLORÃO, A.; MATTANA, F. V. R.; ROCHA, F. H.; NARDIN, J. M.; MACHADO JUNIOR, J. C.; SANTOS, A. M. W. Efeitos do dimetilsufóxido sobre a proliferação de linfócitos humanos *in vitro*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 2, 2007.
- FOROUMADI, A.; MANSOURI, S.; KIANI, Z.; RAHMANI, A. Synthesis and *in vitro* antibacterial evaluation of N-[5-(5-nitro-2-thienyl)-1,3,4-thiadiazole-2-yl] piperazinyl quinolones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 38, p. 851-854, 2003.
- FOROUMADI, A.; EMANI, S.; RAJABALIAN, S.; BADINLOO, M.; MOHAMMADHOSSEINI, N.; SHAFIEE, A. N-Substituted piperazinyl quinolones as pontecial cytotoxic agents: structure-activity relationships study. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 63, p. 216-220, 2009.
- FORTERRE, P.; GRIBALDO, S.; GADELLE, D.; SERRE, M. Origin and evolution of DNA topoisomerases. **Biochimie**, v. 89, p. 427-446, 2007.
- FORSNGREN, A. The immunosuppressive effect of cephalosporins and cephalosporin-gentamicin combinations. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 8, p. 183-186, 1991.
- FORSNGREN, A.; BANCK, G. Influence of antibiotics on lymphocyte function *in vitro*. **Infection**, v. 6, p. 91-97, 1978.
- FORSNGREN, A.; BERGH, A.; BRANDT, M.; HANSSON, G. Quinolones affect thymidine incorporation into the DNA of human lymphocytes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 29, p. 506-508, 1986.
- FORSNGREN, A.; SCHLOSMA, S. F.; TEDDER, T. F. 4-quinolones drugs affect cell cycle progression and function of humam lymphocytes *in vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 31, p. 768-773, 1987.

GAGE, M. **Cell cycle research**, Ago. 2007. Disponível em: <<http://kirschner.med.harvard.edu/files/html/research.shtml>>. Acesso em: 20, Out. 2009.

GAREWAL, H. S.; GERNER, E. W.; SAMPLINER, R. E.; ROE, D. Ornithine decarboxylase and polyamine levels in columnar upper gastrointestinal mucosae in patients with Barrett's esophagus. **Cancer Research**, v. 48, p. 3288-3291, 1988.

GELLERT, M.; MIZUUCHI, K.; O'DEA, M. H.; ITOH, T.; TOMIZAWA, J. I. Nalidixic acid resistance: a second genetic character involved in DNA gyrase activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, p. 4772-4776, 1977.

GERMAIN, R. N. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for lymphocyte activation. **Cell**, v. 76, p. 287-299, 1994.

GERMAIN, R. N. MHC-dependent antigen processing, presentation, and recognition adolescence, maturity and beyond. **The Immunologist**, v. 3, p. 185-190, 1995.

GILLIS, S.; FERM, M. M.; OU, W.; SMITH, K. A. T-cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity. **Journal of Immunology**, v. 120, p. 2927-2932, 1978.

GOLLAPUDI, S. V. S.; VAYUVEGULA, B.; GUPTA, S.; FOK, M.; THADEPALLI, H. Aryl-fluoroquinolone derivatives A-56619 (difloxacin) and A-56620 inhibit mitogen-induced human mononuclear cell proliferation. **Antimicrobials Agents and Chemotherapy**, v. 30, p. 390-394, 1986.

GOLLAPUDI, S.; PERUMAL, V.; THADEPALLI, H. Effects of rifloxacin on in-vitro proliferation and differentiation of human mononuclear cells. **Antimicrobials Agents and Chemotherapy**, v. 29, p. 669-676, 1992.

GRAY, M. R.; HALL, P. A.; NASH, J.; ANSARI, B.; LANE, D. P.; KINGSNORTH, A. N. Epithelial proliferation in Barrett's esophagus by proliferating cell nuclear antigen immunolocalization. **Gastroenterology**, v. 103, p. 1769-1776, 1992.

HAMACHER, R.; SCHMID, R. M.; SAUR, D.; SCHNEIDER, G. Apoptotic pathways in pancreatic ductal adenocarcinoma. **Molecular Cancer**, v. 64, doi:10.1186/1476-4598-7-64, 2008.

HUANG, H.; SHIEH, C.; YU, W.; CHENG, K.; CHEN, C.; CHANG, S.; CHUANG, Y. Comparing the protective effects of ciprofloxacin, moxifloxacin and levofloxacin in mice with lipopolysaccharide-induced acute lung injuries. **Respirology**, v. 13, p. 47-52, 2008.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. J.. **Imunologia: o sistema imunológico na saúde e na doença**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

JONES JUNIOR, M. **Organic Chemistry**. 3. ed. New York: W. W. Norton & Company, 2005.

JUN, Y. T.; KIM, H. J.; SONG, M. J.; LIM, J. H.; LEE, D. G.; HAN, K. J.; CHOI, S. M.; YOO, J. H.; SHIN, W. S.; CHOI, J. H. *In vitro* effects of ciprofloxacin and roxythromycin on apoptosis of Jurkat T-lymphocyte. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p.1161-1164, 2003.

KADOTA, J.; MIZUNOE, S.; KISHI, K.; TKIMATSU, I.; NAGAI, H. NASU, M. Antibiotic-induced apoptosis in human activated peripheral lymphocytes. **Internacional Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, p. 216-220, 2005.

KAWAKAMI, K.; KATOKA, J.; IIDA, K.; FUJII, T.; SHIRAI, R.; MATSUBARA, Y.; KOHNO, S. Phenotypic characterization of T cells in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and peripheral blood of patients with diffuse panbronchiolitis; the importance of cytotoxic T cells. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 107, p. 410-416, 1997.

KETHEESAN, N.; BARNES, J.; ULETT, G. C.; VANGESSEL, H. J.; NORTON, R. E.; HIRST, R. G.; LABROOY, J. T. Demonstration of a Cell-Mediated Immune Response in Melioidosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p. 286-289, 2002.

- KHODURSKY, A. B.; ZECHIEDRICH, E. L.; COZZARELLI, N. R. Topoisomerase IV is a target of quinolones in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, p. 11801–11805, 1995.
- KLIMPEL, G. R.; EAVES-PYLES, T.; MOEN, S. T.; PETERSON, J. W.; CHOPRA, A. K.; NIESEL, D. W.; CARNES, N. P.; HAITCOAT, J. L. Levofloxacin rescues mice from lethal-nasal infections with virulent *Francisella tularensis* and induces immunity and production of protective antibody. **Vaccine**, v. 26, p. 6874-6882, 2008.
- KORNBERG, A.; BAKER, T. A. **DNA Replication**. 2. ed. Nova York : W. H. Freeman e Co., 1992.
- LABBÉ, K.; SALEH, M. Cell death in host response to infection. **Cell Death and Differentiation**, v. 15, p.1339-1349, 2008.
- LABRO, M. T. Interaction of macrolides and quinolones with the host defence system. **European Bulletin Drug Research**, v.2, n. 1, p. 7–13, 1993.
- LABRO, M. T. The prohost effect of antimicrobial agents as a predictor of clinical outcome. **Journal of Chemotherapy**, v. 9, p. 100-108, 1997.
- LABRO, M. T. Antibacterial agents-phagocytes: new concepts for old in immunomodulation. **Journal of Antimicrobial Agents**, v. 10, p. 11-21, 1998.
- LABRO, M. T. Interference of antimicrobial agents with phagocyte functions: immunomodulation or “immune-fairy tales”? **Clinical Microbiology Review**, v. 13, p. 615-650, 2000.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. **Nature**,v. 227, p. 680-685, 1970.
- LIMA, H. C. Fatos e mitos sobre imunomoduladores. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, n. 82, p. 207-221, 2007.
- LOMBARD, J. Y.; DESCOTES, J.; EVREUX, J. C. Polymorphonuclear leucocyte chemotaxis little affected by three quinolones in vitro. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 20, p. 614-615, 1987.
- LOURENÇO, E. E. **Clonagem, sequenciamento e caracterização do gene que codifica a enzima DNA topoisomerase do tipo II do protozoário *Blastocystis culicis* (Brueske, 1967)**. 2005. 78f. Dissertação (Mestrado) – Curso Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- MACHADO, P. R. L.; CARVALHO, L.; ARAÚJO, M. I. A. S.; CARVALHO, E. M. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 79, n. 6, p. 647-664, 2004.
- MAKARE, N.; BODHANKAR, S.; RANGARI, V. Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica* L. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 133-137, 2001.
- MANOSROI, A.; SARAPHANCHOTIWITTHAYA, A.; MANOSROI, J. *In vivo* immunomodulating activity of wood extracts from *Clausena excavate* Burm. f. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 5-9, 2005.
- MARTINS, M. F. R. **Análise do potencial antimicrobiano de precursores e derivados quinolônicos análogos de norfloxacin**. 2009. 67f. Dissertação (Mestrado) – Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2009.
- MATSUMOTO, M.; KOJIMA, K.; NAGANO, H.; MATSUBARA, S. Photostability and biological activity of fluoroquinolones substituted at the 8 position after UV irradiation. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 36, n. 8, p. 1715-1719, 1992.
- MILLER, O.; GONÇALVES, R. R. **Laboratório para o Clínico**. 8 ed. São Paulo: Atheneu, 1998.

- MORAES, S. L. A Resposta Imune: aspectos gerais. In: VAZ, A. J.; TAKEI, K.; BUENO, E. C. **Imunoensaios: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 3-6, 2007.
- MOSMANN, T. R.; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunology Today**, v. 17, p.138-146, 1996.
- MOSMANN, T. R. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p. 55-63, 1983.
- MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annual Review of Immunology**, v.7, p. 145-173, 1989.
- MUKAE, H.; KADOTA, J.; KOHNO, S.; KUSANO, S.; MORIKAWA, T.; MATSUKURA, S.; HARA, K. Increase in activated CD8+ cells in bronchoalveolar lavage fluid in patients with diffuse panbronchiolitis. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine**, v. 152, p. 613-618, 1995.
- MURIGANDE, C.; REGENASS, S.; WIRZ, D.; DANIELS, A. U.; TYNDALL, A. A comparison between (<sup>3</sup>h)-thymidine incorporation and isothermal microcalorimetry for the assessment of antigen-induced lymphocyte proliferation. **Immunological Investigations**, v 38, p. 67-75, 2009.
- NORBY, S. R.; JONSSON, M. Antibacterial activity of norfloxacin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 23, p.15-18, 1983.
- NUNES-PINHEIRO, D. C. S.; LEITE, A. K. R. M.; FARIAS, V. M.; BRAGA, L. T.; LOPES, C. A. P. Atividade imunomoduladora de plantas medicinais: perspectivas em medicina veterinária. **Ciência Animal**, n.13, p. 23-32, 2003.
- OFIR, R.; SEIDMAN, R.; RABINSKI, T.; KRUP, M.; YAVELSKY, V.; WEINSTEIN, Y.; WOLFSON, M. Taxol-induced apoptosis in human SKOV3 ovarian and MCF7 breast carcinoma cells is caspase-3 and caspase-9 independent. **Cell Death and Differentiation**, v. 9, p. 636-642, 2002.
- OGAWA, N.; SUGAWARA, Y.; FUJIWARA, Y.; NOMA, T. Roxithromycin promotes lymphocyte apoptosis in Dermatophagoides-sensitive asthma patients. **European Journal of Pharmacology**, v. 474, p. 273-281, 2003.
- ORCHARD, G. Immunocytochemical techniques and advances in dermatopathology. **Current Diagnostic Pathology**, v. 12, p. 292-302, 2006.
- OTSUKI, Y.; LI, Z.; SHIBATA, M. Apoptotic detection methods from morphology to gene. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v. 38, p. 275-340, 2003.
- PALLAVICINI, F.; ANTINORI, A.; FEDERICO, G.; FANTONI, M.; NERVO, P. Influence of two quinolones, ofloxacin e pefloxacin, on human myelopoiesis *in vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 33, n. 1, p. 122-123, 1989.
- PANDEYA, S. N.; SRIRAMA D.; NATHB G.; CLERCQC, E. D. Synthesis, antibacterial, antifungal and anti-HIV activities of norfloxacin mannich bases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, p. 249-255, 2000.
- PANDIMA DEVI, K.; SAI RAM, M. SREE PRIYA, M.; ILAVAZHAGAN, G.; DEVAKI, T. Immunomodulatory effects of *Premna tomentosa* extract against Cr (VI) induce toxicity in splenic lymphocytes – an *in vitro* study. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 57, n. 2, p. 105-108,2003.
- PATWARDHAN, B.; KALBAG, D.; PATKI, P. S.; NAGSAMPAGI, B. A. Search of Immunomodulatory agents: a review. **Indian Drugs**, v. 28, n. 2, p. 348-358, 1990.
- PAUL, W. E. **Fundamental Immunology**. 4 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2001.
- PELÚZIO, M. C. G.; VOLP, A. C. P.; QUEIROZ, I. C.; BRITO, C. J.; MIRANDA, T. C. As proteínas supressoras em neoplasias malignas - conhecendo seu papel. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 21, p. 233-238, 2006.

PETER, M. E.; KRAMMER, P. H. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. **Cellular Death Differentiation**, v. 10, p. 26–35, 2003.

PHILIPPI, M. E. **Avaliação do efeito de extratos de plantas da flora catarinense sobre a proliferação de células mononucleares humanas**. 2008. 80f. Dissertação (Mestrado) – Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2008.

PUIVERER, G.; PETERS, G. Investigations on ofloxacin: antibacterial activity and influence on the immune system. **Infection**, v. 14, n. 4, p. 245-247, 1986.

RAHMAN, M. **Introduction to Flow Cytometry**. Oxford: Serotec, 2006.

RASTOGI, R. P.; RICHA; SINHA, R. P. Apoptosis: molecular mechanisms and pathogenicity. **EXCLI Journal**, v. 8, p. 155-181, 2009.

RIESBECK, K.; FORSGREN, A. Limited effects of temifloxacin compared with ciprofloxacin on L-lymphocyte function. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, p.879-882, 1994.

RIESBECK, K.; FORSGREN, A. CP-115,953 stimulates cytokine production by lymphocytes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p.476-483, 1995.

RIESBECK, K.; FORSGREN, A.; HENRIKSSON, A.; BREDBERG, A. Ciprofloxacin induces an immunomodulatory stress response in human T lymphocytes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, p. 1923–1930, 1998.

RIESEBERG, M.; KASPER, C.; REARDON, K. F.; SCHEPER, T. Flow cytometry in biotechnology. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 56, p. 260-350, 2001.

RISCO, E.; GHIA, F.; VILA, R.; IGLESIAS, J.;ALVAREZ, E.; CANIGUERAL, S. Immunomodulatory activity and chemical characterization of sangre de drago (dragon's blood) from *Croton lechleri*. **Planta Medica**, v. 69, n. 9, p. 785-794, 2003.

RIVOIRE, W. A.; CORLETA, H. V. E.; BRUM, I. S.; CAPP, E. Biologia molecular do câncer cervical. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 6, p. 447-451, 2006.

ROCA, J.; WANG, J. C. DNA transport by a type II DNA topoisomerase: Evidence in favor of a two-gate mechanism. **Cell**, v. 77, p. 119-131, 1994.

ROCHA, K.; GORESCU, R. A. G.; BELTRAME, R. L. A Resposta Imune: aspectos gerais. In: VAZ, A. J.; TAKEI, K.; BUENO, E. C. **Imunoensaios: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 119-131, 2007.

ROGERO, S. O.; MALMONGE, S. M.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; MIYAMARU, L.; CRUZ, A.S. Biocompatibility study of polymeric biomaterials. **Artificial Organs**, v. 27, n. 5, p.424-427, 2003.

ROTHLIN, R. P. Quinolonas revision histórica. **Medicina**, v.59, p. 3-7, 1999.

RUIZ, J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, p.1109-1117, 2003.

RUTHENBURG, A. J.; GRAYBOSCH, D. M.; HUETSCH, J. C.; VERDINE, G. L. A Superhelical Spiral in the *Escherichia coli* DNA Gyrase A C-terminal Domain Imparts Unidirectional Supercoiling Bias. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 26177-26184, 2005.

SEILER, N., DELCROS, J. G.; MOULINOX, J. P. Polyamine transport in mammalian cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 28, p. 843-861, 1996.

SHALIT, I. Immunological aspects of new quinolones. **European Journal of Clinical Microbiology**, v. 10, p. 262-266, 1991.

SHALIT, I.; KLETTER, Y.; HALPERIN, D.; WALDMAN, D. VANSSEMAN, E.; NAGLER, A.; FABIAN, I. Immunomodulatory effects of moxifloxacin in comparison of ciprofloxacin and G-CSF in murine model cyclophosphamide-induced leukopenia. **European Journal of Haematology**, v. 66, p. 287-296, 2001.

SCHMID, A. T-cell-mediated immunity to quinolonas. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 113, p. 72, 2004.

SIKORAV, J.; DUPLANTIER, B.; JANNINK, G.; TIMSIT, Y. DNA crossovers and type II DNA topoisomerases: a thermodynamical study. **Journal of Molecular Biology**, v. 284, p. 1279-1287, 1998.

SILVA, C. V.; DUARTE, B. M.; FELIPPE, M. E.; NIERO, R.; CECHINEL FILHO, V.; BUENO, E. C. Human lymphoproliferation assay standardization using phytohemagglutinin and evaluation of immunomodulatory activity of *Ipomea pes-caprae* and *Rubus imperialis mathanolic* extracts. In: CIFARP – International Congress of Pharmaceutical Sciences, 6, Ribeirão Preto, 2007. **Anais**. Ribeirão Preto, 2007.

SIMMS, P. E.; ELLIS, T. M. Utility of flow cytometric detection of cd69 expression as a rapid method for determining poly- and oligoclonal lymphocyte activation. **Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 3, p. 301–304, 1996.

SOARES, J. L. M. F.; PASQUALOTTO, A. C.; ROSA, D. D.; LEITE, V. R. S. **Métodos Diagnósticos**. São Paulo: Artmed, 2002.

SOUZA, K.C.; COELHO, F.; FERREIRA, J.; SILVA, C. V.; DUARTE, B. M.; FELIPPE, M. E.; ZANDONAI, R. H.; CORRÊA, R.; V.; BUENO, E. C. Synthesis and preliminary analysis of the immunomodulatory activities of norfloxacin derivatives. In: CIFARP – International Congress of Pharmaceutical Sciences, 6, Ribeirão Preto, 2007. **Anais**. Ribeirão Preto, 2007.

SOUZA, K. C. **Síntese e avaliação da atividade imunomodulatória preliminar de precursores e derivados do norfloxacin**. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2009.

SPRENT, J. T and B memory cells. **Cellular Immunology**, v. 76, n. 2, p. 315-322, 1994.

STITES, D. P.; TERR, A. I.; PARSLOW, T. G. **Basic & Clinical Immunology**. 8. ed. East Norwalk: Appleton & Lange, 1994.

STUNKEL, K. G.; HEWLETT, G.; ZEILER, H. J. Ciprofloxacin enhances T cell function by modulating interleukin activities. **Clinical Experimental Immunology**, v. 86, p. 525-531, 1991.

SUGINO, A.; PEEBLES, C. I.; KRENZER, K. N.; COZZARELLI, N. R. Mechanism of action of nalidixic acid: purification of *Escherichia coli nalA* gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, p. 4767–4771, 1977.

SUNILA, E. S.; KUTTAN, G. Immunomodulatory and antitumour activity of *Piper longum* Linn. and Piperine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 339-346, 2004.

THOMAS, T.; THOMAS, T. J. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, p. 244-58, 2001.

VAN DER-AUWERA, P.; HUSSON, M.; FRUHLING, J. Influence of various antibiotics on phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by human polymorphonuclear leucocytes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 20, p. 399–404. 1987.

VAN DER-AUWERA, P.; HUSSON, M. Influence of antibiotics on motility and adherence of human neutrophils studied in vitro. **Drugs and Experimental of Clinical Research**, v. 15, n. 5, p. 211–218, 1989.

VARGA, G.; DREIKHAUSEN, U.; KRACHT, M.; APPEL, A.; RESCH, K.; SZAMEL, M. Molecular mechanisms of T lymphocyte activation: convergence of T cell antigen receptor and IL-1 receptor induced signaling at the level of IL-2 gene transcription. **International Immunology**, v. 11, p. 1851-1862, 1999.

VENDRAME, F.; SEGNI, M.; GRASSETTI, D.; TELLONE, V.; AUGELLO, G.; TRISCHITTA, V.; TORLONTANO, M.; DOTTA, F. Impaired caspase-3 expression by peripheral t cells in chronic autoimmune thyroiditis and in autoimmune polyendocrine syndrome. **The Journal of Endocrinology & Metabolism**, v. 91, p. 5064-5068, 2006

WANG, J. C. DNA topoisomerases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 65, p. 635–692, 1996.

WIESNER, F. G.; MAGENER, A.; FASCHING, P. A.; WESSE, J.; BANI, M. R.; RAUH, C.; JUD, S.; SCHRAUDER, M.; LOEHLBERG, C. R.; BECKMANN, M. W.; HARTMANN, A.; LUX, M. Ki-67 as a prognostic molecular marker in routine clinical use in breast cancer patients. **The Breast**, v. 18, p. 135-141, 2009.

WIKIPEDIA. **Western blot**, Set. 2009. Disponível em: <[http://en.wikipedia.org/wiki/Western\\_blot](http://en.wikipedia.org/wiki/Western_blot)>. Acesso em: 06, Nov, 2009.

WOLKWEIS, B. S. **Avaliação imunohistoquímica do antígeno KI-67 na sequência de Barrett-Adenocarcinoma de esôfago**. 2006. 114f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

XU, L.; JIN, X.; MAO, P.; LU, Z.; CUI, X.; JIAN, C. Three new species of genus *Actinobispora* of the family *Pseudonocardiaceae*, *Actinobispora alaniniphila* sp. nov., *Actinobispora aurantiaca* sp. nov. and *Actinobispora xinjiangensis* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 49, p. 881-886, 1999.

ZHANG, Z.; ZHOU, W.; YU, A. Synthesis and antibacterial activity of 7-(substituted) aminomethyl quinolones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 393-395, 2004.

ZHANG, H.; SOLOMON, V. R.; HU, C.; ULIBARRI, G.; LEE, H. Syntesis and in vitro cytotoxicity evaluation of 4-aminoquinolone derivatives. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 62, p. 65-69, 2008.

ZHAO, Y.; ZHANG, W.; XU, C.; LI, H.; WANG, L.; LI, H.; SUN, Y.; LIN, Y.; HAN, L.; ZHANG, L.; TIAN, Y.; WANG, R.; YANG, B.; LI, W. Involvement of the ornithine decarboxilase/polyamine system in precondition-induced cardioprotection through an interaction with PKC in rats hearts. **Molecular and Cellular Biochemistry**, DOI 10.1007/s11010-009-0183-5, 2009.

**ANEXO 1**



UNIVALI

UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO,  
EXTENSÃO E CULTURA

## **Certificado**

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "Síntese e avaliação da atividade imunomodulatória preliminar de derivados do Norfloxacin.", da pesquisadora **Isabel Daufenback Machado**, com a orientação da Professora Ednéia Casagrande Bueno, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/ MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado através do parecer nº 97/2006 pela Comissão de Ética em Pesquisa da UNIVALI.

Itajaí (SC), 30 de maio de 2008.

**Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho**  
Pró-Reitor de Pesquisa, Pós-Graduação, Extensão e Cultura

**Prof. Alfeu Antônio Hausen Beck**  
Coordenador do CEP/UNIVALI

UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAI  
PRÓ-REITORIA DE ENSINO  
Gerência de Administração Discente

Certificado registrado sob o nº 5306,  
Livro 40 e folha 296.  
Itajaí(SC), 18/06/2008

  
Prof. Pedro Francisco Bettoni, MSc.  
p) Registro de Diplomas - Responsável

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)