



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ATIVIDADE CITOTÓXICA E PRÓ-APOPTÓTICA DE
NOVOS COMPOSTOS SINTÉTICOS EM LINHAGENS DE
CÉLULAS LEUCÊMICAS**

Mauro Cunha Xavier Pinto

Belo Horizonte

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Mauro Cunha Xavier Pinto

**ATIVIDADE CITOTÓXICA E PRÓ-APOPTÓTICA DE
NOVOS COMPOSTOS SINTÉTICOS EM LINHAGENS DE
CÉLULAS LEUCÊMICAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais
como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Elaine Maria de Souza Fagundes

Belo Horizonte

2010

Colaboradores

Dr. Olindo de Assis Martins Filho ⁱ

Dr^a. Andrea Teixeira de Carvalho ⁱ

Dr. Ricardo José Alves ⁱⁱ

Dr^a. Heloísa de Oliveira Beraldo ⁱⁱⁱ

i- Laboratório de Biomarcadores, Diagnóstico e Monitoração -
Fundação Oswaldo Cruz

ii- Laboratório de Química Farmacêutica - Faculdade de Farmácia -
Universidade Federal de Minas Gerais

iii- Laboratório de Química Inorgânica - Departamento de Química -
Universidade Federal de Minas Gerais

Suporte Financeiro

CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

FAPEMIG- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

CNPq- Conselho Nacional de Pesquisa

Dedico este trabalho a meus pais, Mauro e Margaret, a meu irmão, Danilo,
e ao meu amor, Cristina, que são a minha motivação, força e inspiração.

***“Se procurar bem você acaba encontrando.
Não a explicação (duvidosa) da vida,
Mas a poesia (inexplicável) da vida.”***

Carlos Drummond de Andrade

AGRADECIMENTOS

À Cristina, minha namorada, pelo amor, carinho, dedicação e a companhia durante todo o tempo de realização deste projeto, por ser minha inspiração e fonte de motivação.

À minha família, pela confiança, suporte e educação que me guiou para este caminho e me levará muito mais adiante.

À Prof^a. Elaine Maria de Souza Fagundes, pela oportunidade de desenvolver este trabalho e por sua contribuição científica e pessoal a minha formação.

À Prof^a. Maria de Fátima Leite, do Laboratório de Sinalização de Cálcio, por gentilmente ceder o laboratório para realização de inúmeros procedimentos.

Ao Laboratório de Biomarcadores, Diagnóstico e Monitoração - FIOCRUZ, e seus pesquisadores Dr. Olindo Assis Martins Filho e Dr^a. Andrea Teixeira de Carvalho, pela contribuição científica e possibilitar a realização de experimentos essenciais para este trabalho no citômetro de fluxo.

Ao Laboratório de Química de Produtos Naturais - FIOCRUZ, e ao pesquisador Carlos Leomar Zani, pela contribuição científica e na realização de experimentos importantes para a escolha das substâncias.

Ao Laboratório de Substâncias Antitumorais, à Prof^a. Miriam Teresa Paz Lopes e à mestranda Kátia Michelle Freitas, pela contribuição científica e na realização de experimentos relevantes para o trabalho.

Ao Prof. Ricardo Toshio Fujiwara, ao mestrando Pedro Henrique Gazzinelli Guimarães, pelo apoio na realização de experimentos no citômetro de fluxo.

Ao Prof. Almir de Sousa Martins e a Helen Lima Del Puerto, pela contribuição científica na realização dos ensaios de PCR.

Ao Núcleo de Neurociências, ao Prof. André Ricardo Massensini e à mestranda Onésia Cristina de Oliveira Lima, pela contribuição científica e na realização de experimentos na área de microscopia.

Aos meus colegas de laboratório, Bráulio, Lucas, Diego, Gabriele, Juliana, Carla e especialmente à Débora, por todo apoio na realização dos experimentos e desenvolvimento dos projetos.

Aos meus amigos e colegas, Flávio Mourão, Flávio Carvalho, Bruno Leles, Ana Cristina, Viviane Andrade, Ana Cândida, Celso Viana, Dalton Ditz, Rogério Billheiro, Hércules Leite, Gustavo Conseza, Gustavo Rezende, Gustavo Lopes, Leandro Bastos, Daniel Medeiros, Gabriel Castro, Luciana de Carvalho, João Nietzsche, Patrícia Lima, Luciana Guzzo, Giovane Galdino, Grazielle Silva e Rafael Rezende, que contribuíram com idéias, conversas e boas risadas.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES	IX
LISTA DE TABELAS E FIGURAS	X
RESUMO	XI
ABSTRACT	XII
APÊNDICE 1	XIII
APÊNDICE 2	XV
APÊNDICE 3	XVI
ANEXO 1	XVII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O processo de descoberta de fármacos	1
1.2. Apoptose, câncer e descoberta de novos antitumorais	3
1.3. Importância da química Medicinal no processo de descoberta de fármacos antitumorais.....	8
2. JUSTIFICATIVA	11
3. OBJETIVOS	12
3.1. Geral	12
3.2. Específicos	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS	13
4.1. Materiais	13
4.1.1. Substâncias sintéticas	13
4.1.2. Preparo das amostras	13
4.1.3. Linhagens celulares	13
4.1.4. Células mononucleares do sangue periférico humano	14
4.2. Procedimentos	15

4.2.1. Triagem inicial: Avaliação de viabilidade de células leucêmicas pelo ensaio de MTT	15
4.2.2. Avaliação da atividade citotóxica em células mononucleares do sangue periférico	16
4.2.3. Determinação do conteúdo de DNA sub-diplóide por meio de uma solução fluorocrômica hipotônica (HFS)	17
4.2.4. Bloqueio da atividade de caspases em células HL60	18
4.2.5. Avaliação da morfologia nuclear por microscopia de fluorescência.....	18
4.2.6. Ensaio fluorimétrico para a quantificação de caspase-3.....	19
4.2.7. Detecção simultânea da externalização de fosfatidilserinas por anexina-V e marcação do DNA com iodeto de propídeo	20
4.3. Análise Estatística	21
 5. RESULTADOS	 22
5.1. Avaliação da viabilidade celular em linhagens de células leucêmicas: triagem aleatória de compostos sintéticos	22
5.2. Determinação da concentração inibitória de 50% do crescimento celular (IC50) pelos compostos ativos	25
5.3. Avaliação da atividade citotóxica em células mononucleares do sangue periférico humano	27
5.4. Avaliação da fragmentação do DNA nas linhagens HL60 e Jurkat	28
5.5. Avaliação da inibição de caspases na fragmentação de DNA induzida pelos compostos ativos	30
5.6. Avaliação da morfologia nuclear na linhagem HL 60	32
5.7. Avaliação da externalização de fosfatidilserinas na linhagem HL 60	34
5.8. Avaliação da ativação de caspase-3 na linhagem HL 60	36
 6. DISCUSSÃO	 37
 7. RESUMO DOS RESULTADOS	 48
 8. CONCLUSÃO	 49
 9. PERSPECTIVAS	 50
 10. REFERÊNCIAS	 51

LISTA DE ABREVIACÕES

ADME - Absorção, distribuição, metabolismo e excreção

ATP – Trifosfato de adenosina (do inglês, adenosine triphosphate)

AV – Anexina V

DNA- Ácido deoxirribonucleico (do inglês, deoxyribonucleic acid)

DMSO – Dimetilsulfóxido

CAD - DNAase Ativada por Caspase (do inglês, caspase-activated DNAase)

HFS - Solução fluorocrômica hipotônica (do inglês, hypotonic fluorescent solution)

Hst – Hoechst 33342

HTS – High throughput screening

IC50 – Concentração inibitória para 50% da viabilidade celular

ICAD – inibidor da DNAase ativada por caspase (do inglês, caspase-activated DNAase inhibitor)

INCA - Instituto Nacional do Câncer

NCI - Instituto Nacional do Câncer (do inglês, National Cancer Institute)

MTT – Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)

PBMC - Células mononucleares do sangue periférico humano (do inglês, peripheral blood mononuclear cells)

PBS – Tampão fosfato-salino (do inglês, phosphate buffered saline)

PI - Iodeto de propídio (do inglês, propidium iodete)

ROS - Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês, reactive oxygen species)

RSF - Triagem de resposta rápida (do inglês, rapid screening feedback)

rTNF - Receptores de fatores de necrose tumoral (do inglês, tumor necrosis factor receptor)

Z-VAD-FMK - benziloxycarbonil-Val-Ala-Asp (OMe) Fluorometilquetona

Z-DEVD-AMC – benziloxycarbonil-Asp-Glu-Val-Asp-7-Amino-4-metilcoumarina

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1. Viabilidade celular das linhagens tratadas com substâncias selecionadas	24
Tabela 1. Valores de IC ₅₀ das substâncias selecionadas em micromolar (μM)	25
Figura 2. Curvas representativas da concentração inibitória de 50% da viabilidade celular dos enantiômeros RA33 e RA34 em linhagens leucêmicas	26
Figura 3. Avaliação da concentração inibitória de 50% da viabilidade celular dos enantiômeros RA33 e RA34 em células mononucleares do sangue periférico humano	27
Figura 4. Avaliação do conteúdo de DNA sub-diplóide de células HL 60 tratadas com os enantiômeros RA33 e RA34	29
Figura 5. Avaliação do conteúdo de DNA sub-diplóide de células HL 60 pré-tratadas com Z-VAD-FMK e tratadas com os enantiômeros RA33 e RA34	31
Figura 6. Avaliação da morfologia nuclear de células tratadas com os enantiômeros RA33 e RA34 por microscopia de fluorescência	33
Figura 7. Avaliação da exposição de fosfatidilserinas e marcação do DNA em células HL 60 tratadas com enantiômeros RA33 e RA34	35
Figura 8. Avaliação da ativação de caspase-3 em células HL 60 pelos enantiômeros RA33 e RA34	36
Tabela 2. Código, estrutura e peso molecular das substâncias químicas testadas pertencentes à biblioteca de substâncias sintéticas	XVIII
Tabela 3. Efeito de compostos sintéticos na viabilidade de diferentes células leucêmicas	XV
Figura 9. Curvas representativas da concentração inibitória de 50% do crescimento celular dos enantiômeros RA 33 e RA 34 em linhagens aderentes	XVI

RESUMO

Este trabalho realizou a triagem de substâncias sintéticas em modelos *in vitro* de células leucêmicas sensíveis e resistentes a apoptose para investigar o seu potencial citotóxico e pró-apoptótico. O objetivo deste estudo foi identificar de novos compostos indutores de apoptose que possam ser utilizados como ferramenta farmacológica ao desenvolvimento de fármacos com atividade antitumoral. Neste contexto, a presente investigação descreve dois enantiômeros denominados RA33 e RA34 (respectivamente formas R e S do composto 2,2-dimetil-4-(3-nitrofenoxi)metiloxazolidina-3-carboxilato de *tert*-butila), substâncias inéditas com atividade citotóxica e pró-apoptótica. Estas substâncias foram descobertas a partir de uma triagem aleatória de 38 substâncias sintéticas em um painel de cinco linhagens de células leucêmicas. A determinação da IC50 evidenciou diferenças entre a RA33 e RA34, mostrando uma relação enantiômero dependente, em que a substituição do grupo nitro por uma hidroxila reduz significativamente a atividade citotóxica do grupo. Ensaios *in vitro* com células mononucleares do sangue periférico humano de pacientes normais demonstram que RA33 e RA34 apresentaram menor citotoxicidade do que a cisplatina após 48 horas de incubação. As substâncias de melhor atividade citotóxica foram selecionadas para investigação do potencial pró-apoptótico. Ensaios de citometria de fluxo demonstraram que RA33 e RA34 (50 μ M) induzem fragmentação de DNA de maneira dose-dependente. A fragmentação do DNA pôde ser bloqueada pelo pré-tratamento das células com Z-VAD-FMK, um inibidor geral de caspases, sugerindo envolvimento da via clássica da apoptose. Para confirmar esta hipótese, foram realizados experimentos para avaliação da principal caspase efetora deste fenômeno, a caspase-3. Ensaios demonstraram que RA33 e RA34 induziram a ativação de caspase-3. Corroborando com esta observação, ensaios de citometria de fluxo demonstraram que RA33 e RA34 induzem a exposição da fosfatidilserinas de forma semelhante à cisplatina. Tomados em conjunto os resultados apontam os compostos RA33 e RA34 como substâncias promissoras com atividade citotóxica e pró-apoptótica. Estes compostos serão úteis para o desenvolvimento de novos agentes antitumorais.

Palavras-chave: Substâncias sintéticas; atividade citotóxica; apoptose.

ABSTRACT

This work accomplished the screening of synthetic substances on *in vitro* models of leukemic cells sensitive and resistant to apoptosis to investigate their cytotoxic and pro-apoptotic potential. The aim of this study was to identify new compounds that induce apoptosis and could be used as pharmacological tool for the development of drugs with antitumor activity. In this context, this research describes two enantiomers called RA33 and RA34 (respectively R and S forms of the compound tert-butyl-4-((3-nitrophenoxy)-methyl)-2,2-dimethyloxazolidine-3-carboxylate), new compounds with cytotoxic activity and pro-apoptotic. These substances were discovered from a random screening of 38 synthetic substances in five leukemic cell lines. The determination of IC₅₀ showed differences between the RA33 and RA34. Substitution of nitro group by a hydroxyl significantly reduces the cytotoxic activity of the group. In vitro assays with mononuclear cells from human peripheral blood of normal patients showed that RA33 and RA34 showed less cytotoxicity than cisplatin after 48 hours of incubation. The substances with better cytotoxic activity were selected for investigation of pro-apoptotic potential. Flow cytometry assays showed that RA33 and RA34 (50µm) induced DNA fragmentation. The DNA fragmentation could be blocked by pretreatment of cells with Z-VAD-FMK, a general inhibitor of caspases, suggesting involvement of the classical pathway of apoptosis. To confirm this hypothesis, experiments were performed to evaluate the main effectors caspase of this phenomenon, the caspase-3. Experiments demonstrated that RA33 and RA34 induced activation of caspase-3. Corroborating with this observation, flow cytometry analysis showed that RA33 and RA34 induce exposure of phosphatidylserine in a similar manner to cells treated with cisplatin. Taken together the results indicate the RA33 and RA34 compounds as promising substances with cytotoxic and pro-apoptotic activity. These compounds will be useful for the development of new anticancer agents.

Keywords: Synthetic substances; cytotoxic activity; apoptosis.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O processo de descoberta de fármacos

As primeiras substâncias antitumorais surgiram a partir da década de 1940 oriundas de estudos toxicológicos com mostardas nitrogenadas realizados na Universidade de Yale por Goodman, Gilman e colaboradores. Essas substâncias tinham capacidade de alquilar o Ácido Desorribonucléico – DNA e apresentavam citotoxicidade devido à inibição da síntese de DNA e da divisão das células. Este mecanismo de inibição da replicação foi explorado durante muitas décadas, levando à identificação de substâncias como a cisplatina, usada principalmente para câncer testicular (Gibbs, 2000; Goodman & Gilman, 2006).

Na década de 1950 foram desenvolvidos métodos de cultivos de células tumorais humanas que sendo mantidas na presença de fatores de crescimento e nutrientes apropriados poderiam ser mantidas indefinidamente, o que mudou drasticamente o campo da descoberta de novas drogas. Linhagens celulares derivadas de linfoma de Burkitt foram as primeiras células hematopoiéticas humanas estabilizadas em suspensão. Atualmente, existem mais de mil linhagens celulares que abrangem todos os tipos de células hematopoiéticas e diversos tipos de diferenciação celular, bem como modificações genéticas pontuais para modelos de estudos do câncer. O uso destas metodologias, que buscam mimetizar o ambiente *in vivo*, foi o que possibilitou o aumento das chances de descoberta de novas drogas (Baguley & Marshall, 2004; Drexler et al, 2005; Falconnet et al, 2006).

O processo de descoberta de novas drogas antitumorais cresceu bastante a partir da década de 1970 graças à introdução de bioensaios em larga escala *in vitro* com diversas linhagens celulares, capazes de avaliar muitas amostras em um curto espaço de tempo e assim, fornecer resultados de testes em replicatas suficientes que possibilitam a análise consistente. Estes ensaios tinham como alvo principal a interferência em processos de morte celular avaliando enzimas ou receptores específicos, sendo os métodos *in vitro* também utilizados para determinação da toxicidade *in vivo* dos novos compostos. Estes métodos avaliavam o dano oxidativo, a produção de energia, síntese de DNA e a morte por necrose ou apoptose. A comparação entre a atividade de novos compostos em células normais e células tumorais apresentou-se como uma promissora estratégia para descoberta de drogas. Assim, os novos compostos deveriam ser seletivos

para as células tumorais e não afetar as células normais, conservando sua função e estrutura. Esse processo é conhecido como “*screening*”, ou triagem de atividade biológica, sendo estes ensaios de importância fundamental para o sucesso do programa de bioprospecção e de inovação farmacêutica (Souza-Fagundes et al, 2002; Butcher, 2005; Tuschl & Schwab, 2005).

Nas últimas duas décadas novas formas de triagem virtual com diferentes níveis de complexidade foram introduzidas para determinar quais as estruturas apresentam potencial biológico e atendem critérios farmacocinéticos e farmacodinâmicos (Bleicher et al, 2003). Os modelos mais sofisticados utilizam estruturas tridimensionais para determinar os principais grupos farmacofóricos, suas orientações espaciais e possíveis interações com os alvos, porém os ensaios *in silico* não substituem os ensaios *in vitro* para identificação da atividade citotóxica, sendo imprescindível a realização de ensaios *in vivo* para confirmação de atividade antitumoral (Bajorath, 2002).

Existem dois modelos principais de “*screening*” sendo largamente utilizados: o primeiro é o ensaio de alto desempenho ou “High-Throughput Screening – HTS”, método robotizado realizado principalmente em indústrias farmacêuticas, que permite o processamento de grande número de substâncias simultaneamente (até 10 mil substâncias por vez). O segundo é a triagem de resposta rápida ou “Rapid Screening Feedback – RSF”, cujo método baseia-se na análise de pequenos conjuntos de compostos, com grupos formados com menos que mil substâncias, os quais são orientados pelo estudo da relação estrutura-atividade para um projeto iterativo rápido e com vários ciclos de síntese paralela (Bleicher et al, 2003; Ferraz et al, 2009; Gupta et al, 2009). Em laboratórios de pequeno e médio porte são utilizadas bioensaios mais simples e com menor custo operacional, porém que aproveitam e adaptam as características dos modelos de HTS e RSF para identificar e produzir novos compostos ativos contra o câncer. Esses ensaios avaliam principalmente a viabilidade das células tumorais após serem tratadas com substâncias selecionadas de uma biblioteca de amostras (Souza-Fagundes et al, 2003; Ferraz et al, 2009)

O objetivo das triagens iniciais é identificar um composto ativo primário inédito, também conhecido como “Hit Compound”, cujo valor da atividade ultrapasse um determinado limiar estabelecido para o ensaio. A identificação do “HIT” é seguida por avaliação da autenticidade do composto e posterior determinação do ponto de atividade

para estabelecer a validade da descoberta. Após a descoberta do composto “HIT”, este se torna a estrutura modelo para criação de uma série de estruturas relacionadas que serão testadas quanto à atividade e seletividade farmacológica. Estes novos compostos são chamados de “LEAD Compounds” e constituem a base do esforço da química farmacêutica para a melhoria da atividade do composto. O número de compostos LEAD passíveis de serem sintetizados é teoricamente ilimitado, porém, os processos de síntese necessários para criar uma variedade de novos compostos além de complexos são financeiramente dispendiosos. Mesmo que uma infinidade destes compostos seja sintetizada, apenas algumas destas moléculas serão farmacologicamente relevantes, tornando a síntese e análise de todas as combinações tecnicamente inviável. Para baratear o processo e direcionar a síntese, atualmente é feita a triagem virtual que “filtra” as melhores combinações para prever quais os compostos ativos mais promissores (Keseru & Makara, 2006; Langer et al, 2009).

1.2. Apoptose, câncer e descoberta de novos antitumorais

Segundo as estimativas do Instituto Nacional do Câncer-INCA, em 2010 ocorrerão 489.270 casos novos de câncer no Brasil. Os tumores mais incidentes no sexo masculino em 2010 serão o câncer de próstata (52 mil), pulmão (18 mil) e estômago (14 mil) e para o sexo feminino destaca-se o câncer mama (49 mil), colo do útero (18 mil) e cólon e reto (15 mil) (Brasil, 2009). O termo câncer é usado para designar diversas doenças distintas que têm em comum um desarranjo no maquinário celular que provoca a proliferação desordenada juntamente com uma insuficiência no processo de controle de crescimento e morte celular, podendo invadir outros tecidos ou órgãos e levar ao colapso de todos os sistemas. A principal causa da transformação das células em tumores é o acúmulo de mutações genéticas que a leva a perda do controle do crescimento e a insensibilidade a fatores antiproliferativos. Cada tipo de câncer está associado a fatores hereditários e sócio-ambientais, sendo os principais fatores de risco o tabagismo, alcoolismo, hábitos sexuais, hábitos alimentares, uso de medicamentos ou exposição a substâncias carcinogênicas, radiação ionizante, vírus e bactérias. Um dos principais genes modificados envolvidos na tumorigênese é o responsável pela expressão da proteína supressora de tumores chamada P53, que induz parada no ciclo e até morte por apoptose em resposta ao estresse agudo e a danos do DNA. Atualmente há relatos que 50% dos tumores apresentam essa mutação (Nora et al, 1999; Vousden &

Lane, 2007; Chari et al, 2009).

O crescimento do tumor necessita ser acompanhado pelo aumento do aporte vascular, fenômeno conhecido como angiogênese. O crescimento de novos vasos mantém-se inativo quando há o equilíbrio entre moléculas pró e anti angiogênicas, porém é ativado quando fatores pró-angiogênicos têm suas concentrações plasmáticas aumentadas, o que leva à formação de novos vasos sanguíneos. Durante a expansão clonal das células tumorais a demanda por nutrientes e oxigênio aumenta rapidamente no microambiente tumoral gerando hipóxia no tecido. Para que o crescimento seja contínuo, as células tumorais produzem o fator de transcrição induzido por hipóxia (HIF)-1, que mobiliza células endoteliais gerando o crescimento de novos vasos para fornecer oxigênio e metabólitos. Na década de 70 foi proposto que a formação de metástases é dependente da angiogênese, o que tornou este fenômeno um alvo potencial para terapia antitumoral (Liao & Johnson, 2007).

A metástase é a principal causa de mortalidade em pacientes com câncer. A cascata metastática começa com a expansão clonal e crescimento do tumor associados ao processo de angiogênese e invasividade. Os tumores podem formar células com potencial metastático, que caem na corrente sanguínea e/ou linfática e se aderem em outro local do corpo e invadem a membrana basal por um processo semelhante aos leucócitos na diapedese. Após a passagem pela matriz extracelular é formado o depósito metastático, que pode ficar quiescente até que ocorra liberação de fatores de crescimento, formação de novos vasos sanguíneos e conseqüentemente a formação de um novo tumor (Pantel & Brakenhoff, 2004). A metástase é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes com câncer de mama, sendo a incidência total de metástases cerebrais deste tumor aproximadamente 30% (Cheng & Hung, 2007). O questionamento sobre em quais órgãos as células tumorais gerariam metástases foi levantada por Paget no fim do século XIX, que desenvolveu a teoria "semente e solo". Esta hipótese diz que determinados tipos de células tumorais colonizam seletivamente órgãos distantes, cujo ambiente é favorável para sobrevivência das novas células tumorais. Na década de 1950, Sugarbaker confirmou essa teoria ao demonstrar que tumores do tipo melanoma aplicado na orelha de ratos geram metástases preferencialmente nos pulmões (Fokas et al, 2007).

A evasão da morte celular tem sido apontada como uma das principais causas

associadas à fisiopatologia do câncer, que se encontra relacionada à regulação aberrante dos reguladores e efetores da morte apoptótica (Pérez-Tomás, 2003; Fleischer, 2006). A resistência à apoptose em células tumorais está associada à perda do controle do crescimento celular, à evasão da morte induzida por hipóxia (ligadas a angiogênese), à evasão da morte pelos danos causados por espécies reativas de oxigênio - ROS e à insensibilidade a danos no DNA. Um dos principais mecanismos envolvidos na evasão da apoptose é a super-expressão de proteínas anti-apoptóticas tais como Bcl-2 e Bcl-X_L que regulam e estabilizam a função mitocondrial e a proteína “survivin” que bloqueia a função de caspases efetoras. A super-expressão da proteína Bcl-2, por exemplo, tem sido observada em 70% de cânceres de mama, 80% de linfomas de células B e 90% de carcinoma colorretal, estando também a família destas proteínas envolvida na quimioresistência a vários tipos de cânceres. A expressão da proteína *survivin* foi encontrada no tecido fetal e em todos os cânceres mais comuns em humanos como pulmão, cólon, pâncreas, próstata e mama, mas é quase indetectável em tecidos adultos normais (Ambrosini et al, 1997).

O termo apoptose foi proposto em 1972 por Currie e colaboradores para descrever um tipo especial de morte celular programada onde as células compartilhavam características morfológicas distintas das características observadas na morte celular por necrose. Atualmente, sabe-se que este fenômeno é caracterizado pela fragmentação e reabsorção orquestrada da célula que inclui a degradação de proteínas do citoesqueleto e do núcleo, a retração celular, a condensação da cromatina e fragmentação do núcleo e da célula. A apoptose é essencial para qualquer organismo multicelular por ser a chave do crescimento, renovação e eliminação de células do organismo para manutenção da homeostase (Kerr et al, 1972; Hengartner, 2000; Wang et al, 2005).

A maioria das alterações morfológicas geradas pelo processo de apoptose é causada por um conjunto de proteases conhecidas como caspases, os executores centrais da via apoptótica, que apresentam um sítio ativo cisteína e clivam inúmeros substratos protéicos de quatro aminoácidos amino-terminais iniciados com aspartato, sendo classificadas de acordo com o substrato. Atualmente são conhecidas 14 caspases diferentes em seres humanos que podem ser subdivididas em caspases iniciadoras (1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14) e caspases efetoras (3, 6 e 7). Cada uma destas enzimas é sintetizada como uma pró-enzima ou zimógeno, que é ativada proteoliticamente para

formar um domínio catalítico heterodimérico especificamente ativo em células apoptóticas. Essas proteínas também são de grande interesse farmacológico, pois a utilização substâncias inibidores de caspases pode diminuir ou até mesmo evitar a morte celular por apoptose, essa atividade pode ser útil em doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer, reduzindo a perda tecidual, ou em processos de isquemia preservando células presentes na região de penumbra (Alnemri et al, 1996; Desjardins, 1998; Earnshaw et al, 1999; Van Noorden, 2001).

São descritas duas vias clássicas de ativação do fenômeno de apoptose: a via extrínseca e a intrínseca. Na via extrínseca ou de receptores de morte, a interação destes aos seus respectivos ligantes tais como o fator de necrose tumoral -TNF, ligante FAS/(CD95L), TRAIL, leva ao recrutamento do domínio de morte associado a FAS (FADD, do inglês – Fas-associated death domain) e ativação da pró-caspase-8. Uma vez ativa, a caspase-8, a iniciadora desta via, irá clivar o zimógeno caspase 3, ativando assim a principal caspase efetora e desencadear a apoptose. Já a via intrínseca, ou mitocondrial, é ativada por dano intracelular (Ex.: Estresse oxidativo ou dano ao DNA) ou ativação de genes supressores de tumor. Os sinais de morte são transmitidos para a mitocôndria através de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 que se ligam á membrana mitocondrial e criando poros de permeabilidade mitocondriais. A perda da permeabilidade leva a perda do potencial de membrana interna ($\Delta\psi$) e depleção da produção de ATP. A perda da função mitocondrial leva a liberação de proteínas pró-apoptóticas como o citocromo c, Smak/Diablo e AIF. Uma vez livre no citosol, o citocromo c se liga a outras duas proteínas, à APAF-1 e à caspase-9, e forma um complexo enzimático chamado apoptossomo. O apoptossomo cliva o zimógeno caspase-3 que vai desencadear a apoptose. Existe uma comunicação entre as vias de ativação de caspases, mediada pela proteína da família Bcl-2 chamada de Bid, que após clivada pela caspase 8 transfere o sinal de apoptose para a mitocôndria, ativando também a via intrínseca (Green & Reed, 1998).

A família Bcl-2 é um grupo de proteínas reguladoras da morte celular, que compreende proteínas pró e anti-apoptóticas com ações opostas no equilíbrio celular inibindo ou promovendo a morte celular programada. Os membros dessa família, como Bcl-2 e Bcl-X_L, são anti-apoptóticas e por outro lado, Bax, Bid e Bak são proteínas pró-apoptóticas. Essa família age através da formação de poros, pelos quais o citocromo C, íons e outras proteínas mitocondriais podem escapar. A formação desses poros é

dependente da formação de homodímeros de proteínas pró-apoptóticas, sendo a heterodimerização citoplasmática entre membros pró e anti-apoptóticas apresentando efeito contra apoptose (Vander Heiden & Thompson, 1999; Hengartner, 2000; Lessene et al, 2008).

Outras alterações envolvidas na apoptose incluem modificação da disposição das fosfatidilserinas da membrana plasmática. As fosfatidilserinas normalmente estão dispostas no folheto interno da membrana plasmática, porém durante o processo de apoptose estes componentes são expostos no exterior das células. Assim, estes fosfolípidos são importantes para o processo de reconhecimento e fagocitose das células em apoptose pelos macrófagos, precedendo a perda da integridade de membrana e alterações nucleares que definem a apoptose, sendo utilizados como marcadores específicos em fases precoces do processo de apoptose (Martin et al, 1995; Fadok et al, 1998; Schlegel & Williamson, 2001).

O processo final da apoptose é caracterizado por dois fenômenos nucleares distintos: condensação da cromatina e fragmentação do DNA. A condensação da cromatina é um dos mais importantes critérios para identificação do processo de apoptose (Oberhammer et al, 1994). Durante a apoptose há uma rápida degradação da eucromatina hipersensível a nucleases que contém histonas hiper-acetiladas. Isto ocorre juntamente com a perda de integridade nuclear devido à degradação das lâminas e reorganização da matriz protéica intranuclear. Ambos os eventos levam ao colapso do núcleo e agregação da heterocromatina para produzir a condensação da cromatina apoptótica (Hendzel et al, 1998). A fragmentação do DNA, ocorre graças a ativação de uma enzima chamada DNAase Ativada por Caspase – CAD sobre a heterocromatina condensada, que quando ativa gera fragmentos de aproximadamente 180 pares de bases. A CAD está presente nas células vivas na sua forma inativa e após clivagem da subunidade inibitória pela caspase-3, o sítio catalítico é liberado para atuar na degradação do DNA (Nicoletti et al, 1991; Nagata, 2000).

Substâncias que possam modular o fenômeno de apoptose têm potencial de alterar a progressão natural de doenças como o câncer, infecções virais, doenças auto-imunes e doenças neurodegenerativas. A maioria das substâncias quimioterápicas em uso clínico induz apoptose das células malignas, sendo a avaliação desses parâmetros apoptóticos de grande relevância para desenvolvimento de fármacos para o câncer

(Thompson, 1995; Sellers & Fisher, 1999).

Na prática clínica, a radioterapia e a quimioterapia são utilizadas como tratamentos de primeira escolha para o câncer, mas caracterizam-se por não possuir toxicidade seletiva, causando sérios efeitos adversos como a inibição da resposta imunológica e a mielossupressão. A maioria dos fármacos antitumorais que chega à fase clínica ativa as vias de sinalização apoptótica em células cancerosas ou agem no maquinário bioquímico que regula a apoptose, tais como cisplatina e etoposídeo (Ferraz, et al, 2009; Souzafagundes et al, 2003; Fesik, 2005). A descoberta de novas substâncias com atividade citotóxica e pró-apoptótica, com um menor potencial de toxicidade para células normais, têm sido o principal foco das pesquisas, abrindo perspectivas para a identificação de novos agentes farmacológicos mais eficazes na terapia do câncer (Fischer & Schulze-Osthoff, 2005).

1.3. Importância da química Medicinal no processo de descoberta de fármacos antitumorais

A química medicinal ou química farmacêutica atual teve sua origem no início do século XX a partir de trabalhos de Paul Ehrlich, prêmio Nobel em Medicina e Fisiologia em 1908, fundador da quimioterapia e que introduziu as primeiras idéias sobre relação estrutura-atividade de compostos químicos, seletividade aos agentes infecciosos e o conceito de índice terapêutico em estudos realizados para o desenvolvimento de novos medicamentos para a sífilis. Seu tratamento para Sífilis foi substituído anos mais tarde pela revolução na quimioterapia com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming, também laureado com o prêmio Nobel em Medicina e Fisiologia em 1946.

A química medicinal moderna trabalha na interface com a bioquímica e farmacologia para desenvolver novas entidades químicas a partir do conhecimento fisiopatológico de cada doença, tendo um papel central nas fases iniciais da descoberta de novas drogas. Quando um composto “HIT” é identificado através de testes farmacológicos *in vitro*, a química farmacêutica caracteriza as novas espécies e prepara compostos análogos para exploração da relação estrutura-atividade dos novos compostos com objetivo de aumentar sua potência. O desenvolvimento das substâncias após comprovação farmacológica *in vivo* das novas espécies passa, muitas vezes, por

etapas complexas que visam melhorar as variáveis farmacocinéticas como absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME), com o objetivo de maximizar a eficácia e minimizar os efeitos colaterais dos produtos (Lombardino & Lowe, 2004).

A partir da década de 1970, a química farmacêutica focou na busca de alvos específicos para células tumorais, o oposto das substâncias usadas até então que apresentavam atividade inespecífica agindo sobre a proliferação celular e com alta toxicidade. Um dos exemplos mais bem sucedidos para a triagem direcionada a um alvo molecular vem da história do mesilato de imatinib usada para o tratamento da leucemia mielocítica crônica. O Imatinib inibe a tirosina quinase Bcr.Abl, que é uma proteína quimérica oriunda da translocação recíproca de material genético entre os genes Abl (Abelson murine leukemia) no cromossomo 9 e o Bcr (breakpoint cluster region) no cromossomo 22, gerando o conhecido Cromossomo da Philadelphia presente apenas em células leucêmicas (Dobrovic et al, 1991). Como ponto de partida para o projeto foi escolhido um já conhecido composto inibidor da proteína quinase C, que após adição química de um grupo amida e um grupo metil ao anel fenil apresentou a potência e seletividade necessárias para a inibição da tirosina quinase Bcr-Abl. Para aumentar a solubilidade em água e biodisponibilidade oral foi adicionado um grupo piperazinilmetil, criando assim o imatinib. Posteriormente, o raio X de cristais da proteína Bcr.Abl revelou que este grupamento era importante também para a interação com a proteína (Lombardino & Lowe, 2004).

As indústrias farmacêuticas também utilizam a modificação estrutural de fármacos com atividade já descrita para identificar novas espécies químicas que atuem pelo mesmo mecanismo farmacológico do primeiro, sendo estes compostos denominados de fármacos "me-too". Estas pequenas alterações estruturais nos compostos originais conferem novas propriedades farmacodinâmicas e/ou farmacocinéticas aos "me-too" (Barreiro & Fraga, 2005). Um bom exemplo vem da classe das tiossemicarbazonas que já em 1956 apresentou atividade antileucêmica, porém o composto apresentou baixo índice terapêutico. Uma modificação estrutural que aumentou o caráter lipofílico fez aumentar a atividade e diminuir a toxicidade desta classe de substâncias (Beraldo, 2004).

Apesar da estratégia de moléculas com alvos definidos ter apresentado sucesso, a maior parte dos medicamentos quimioterápicos foram descobertos através da triagem

aleatória de substâncias. Na década de 1950, o Instituto Nacional do Câncer (NCI) norte americano começou seu programa de triagem sistemática de substâncias de origem sintética e vegetal a procura de quimioterápicos capazes de agir seletivamente sobre células tumorais e como consequência desta política, aproximadamente metade dos quimioterápicos atualmente utilizados na clínica para o tratamento do câncer foram descobertos e/ou desenvolvidos no NCI.

Um exemplo bem sucedido da triagem aleatória é o produto natural paclitaxel, proveniente da casca da planta *Taxus brevifolia*, que foi descoberto durante uma triagem aleatória de larga escala em células tumorais realizada em 1967, porém as quantidades presentes na casca eram demasiadamente pequenas para utilização clínica da droga. A solução veio da química farmacêutica através de uma reação de semi-síntese a partir de um precursor, 10-deacetilbaccatina III, que era extraído das folhas de *Taxus* e possibilitou a produção comercial do medicamento (Braña & Sánchez-Migallón, 2006; Fu et al, 2009).

2. JUSTIFICATIVA

O laboratório de Biologia Molecular e Celular do Instituto de Ciências Biológicas - UFMG, juntamente com os laboratórios de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia - UFMG e Química Inorgânica do Departamento de Química – UFMG e com colaboração do laboratório de Biomarcadores Diagnóstico e Monitoração do Centro de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ têm realizado a prospecção de substâncias sintéticas com objetivo de identificar novos compostos “Hit” e/ou “Lead”, que possam ser utilizados como protótipos úteis para o desenvolvimento de agentes antitumorais. Para isso, como estratégia experimental têm sido utilizadas duas abordagens de triagem a partir de bibliotecas químicas de compostos inéditos: uma abordagem de triagem aleatória e outra abordagem de triagem de compostos com reconhecida atividade (direcionada). Por meio de uma parceria com o Departamento de Química e Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG foi realizada a triagem de novos compostos quanto ao seu potencial citotóxico. No presente projeto foi realizada a triagem direcionada de 75 novos compostos sintéticos, dentre elas: 37 tiosemicarbazonas e seus complexos metálicos, que têm sido amplamente estudados em razão de sua ação citotóxica ou antitumoral (Beraldo, 2004). Para a triagem aleatória, foram avaliados 38 intermediários de síntese (Dias et al, 2009), ainda não avaliados quanto ao potencial antitumoral.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Identificar novos compostos que possam ser utilizados como modelo para o desenvolvimento de novos protótipos ou ferramentas farmacológicas, através da investigação do seu potencial citotóxico e pró-apoptótico em bioensaios *in vitro*, com vistas à descoberta de novos antitumorais.

3.2. Específicos

1. Avaliar a citotoxicidade de 38 substâncias sintéticas em modelo experimental *in vitro* utilizando linhagens celulares HL 60, HL 60 Bcl-2, HL 60 Bcl-X_L, HL 60 Bcr.Abl e Jurkat.
2. Determinar a concentração que inibe 50% da viabilidade celular (IC₅₀) das substâncias ativas para as linhagens HL 60, HL 60 Bcl-2, HL 60 Bcl-X_L, HL 60 Bcr.Abl e Jurkat.
3. Avaliar a citotoxicidade das substâncias selecionadas para células mononucleares do sangue periférico humano – PBMC, por meio da determinação da concentração que inibe 50% da viabilidade celular (IC₅₀).
4. Investigar o potencial pró-apoptótico das substâncias selecionadas por meio da avaliação da condensação e fragmentação do DNA celular.
5. Investigar a ativação da via clássica da apoptose pela substância selecionada por meio da avaliação de pelo menos três parâmetros:
 - a. Investigação da ativação de caspases por meio da avaliação de fragmentação do DNA celular após tratamento com o inibidor geral de caspases Z-VAD-FMK.
 - b. Avaliação da ativação da caspase efetora caspase-3
 - c. Avaliação da exposição das fosfatidilserinas
 - d. Avaliação da morfologia nuclear

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Substâncias sintéticas

As substâncias foram fornecidas pelo grupo de química farmacêutica do Prof. Dr. Ricardo José Alves da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG. Foram fornecidos 30 amostras de aproximadamente 01 mg de cada substância que foram mantidas a -20°C e solubilizadas imediatamente antes dos experimentos em dimetilsulfóxido - DMSO (Sigma Aldrich, USA). As estruturas moleculares das substâncias e massa molecular podem ser conferidas no Apêndice 1.

4.1.2. Preparo das amostras

Para a triagem inicial foi preparada a solução estoque de cada substância sintética à 100 mM em dimetilsulfóxido - DMSO, imediatamente antes da aplicação. O volume de 05 µL da solução estoque foi diluído em 995 µL de água destilada e deionizada, gerando a solução de trabalho com concentração de 500 µM de amostra. As substâncias foram adicionadas na cultura de células, sendo a concentração final dos compostos de 50 µM e a concentração final de DMSO de 0,0005%.

As substâncias ativas foram submetidas à determinação da concentração inibitória de 50% da viabilidade celular – IC₅₀. A partir da solução estoque foi realizada uma diluição seriada em DMSO, sendo preparadas sete concentrações entre 20 mM e 02 µM. Após a diluição seriada, foi preparada a segunda diluição em água destilada e deionizada (1:20), obtendo-se soluções de trabalho com diferentes concentrações e quantidade de DMSO de 5%. As concentrações finais no experimento variaram entre 100 µM e 100 nM e com a quantidade de DMSO de 0,5%.

4.1.3. Linhagens celulares

As linhagens celulares HL 60 (Leucemia promielocítica humana) e Jurkat (Leucemia de células T humanas) foram cedidas pelo Dr. Gustavo P. Amarante-Mendes da Universidade de São Paulo-USP. Também foram utilizadas as linhagens HL 60 Bcl-X_L, HL 60 Bcl-2 e HL 60 Bcr.Abl que expressam ectopicamente proteínas anti-apoptóticas, Bcl-X_L, Bcl-2 e Bcr.Abl respectivamente, o que confere a essas células resistência a morte celular.

As células foram mantidas em meio RPMI 1640 (Sigma Aldrich, USA) suplementado com 1% de solução antibiótica (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (GIBCO BRL, Grand Island, NY)), enriquecido com 2 mM de L-glutamina (GIBCO UK, Grand Island, NY) e 10% de soro fetal bovino (GIBCO BRL, Grand Island, NY), sendo incubada em atmosfera de 5% de CO₂ a temperatura de 37°C.

4.1.4. Células mononucleares do sangue periférico humano

Leucócitos do sangue periférico humano foram obtidos em convênio firmado com o Centro de Pesquisas René Rachou /Fiocruz. As células mononucleares periféricas do sangue periférico (do inglês, “peripheral blood mononuclear cells - PBMC) foram preparadas usando o protocolo descrito por Gazzinelli et al em 1983, com modificações. As amostras de PBMC foram obtidas de voluntários saudáveis adultos de ambos os sexos. O sangue venoso heparinizado por foi aplicado cuidadosamente sobre o gradiente Histopaque® 1077 (Sigma Aldrich, USA) em tubos de 50 mL, na proporção de 2:1 do gradiente. Após preparação dos tubos, estes são centrifugados durante 40 minutos, 1200 RPM a 18°C. As células mononucleares foram coletadas na interfase após a separação no Ficoll com pipetas Pasteur e transferidas para outro tubo de 50 mL onde foram lavadas três vezes em RPMI-1640 antes da contagem.

As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 (GIBCO, UK), suplementado com 5% de soro humano normal AB Rh+, previamente inativado (Flow Laboratories, Royane, UN), enriquecido com 02 mM de L-glutamina, 1% solução antibiótica/antimicótica (1000 U/mL de penicilina, 1000 µg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina B).

Os experimentos realizados com sangue humano foram feitos em colaboração com a Fundação Hemominas e Centro de Pesquisas René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz em convênio firmado sobre o protocolo nº 105/2004.

4.2. Procedimentos

4.2.1. Triagem inicial: Avaliação de viabilidade de células leucêmicas pelo ensaio de MTT

As suspensões celulares de HL 60, HL 60 Bcl-X_L, HL 60 Bcl-2 e HL 60 Bcr.abl e Jurkat foram plaqueadas na densidade de 50.000 células por poço (placas de 96 poços) e incubadas *overnight* a 37°C para estabilização da cultura. Após estabilização, todas as células foram incubadas com as substâncias na concentração final de 50 µM, no volume final de 200 µL por poço, em atmosfera de 5% de CO₂ por um período de 48h.

Os ensaios foram realizados em triplicata utilizando-se como controles a solução aquosa contendo o veículo DMSO (0,0005%), na mesma quantidade das amostras testes, controle negativo apenas com meio RPMI-1640 e controle positivo a cisplatina, composto já utilizado na terapia antitumoral.

O ensaio para avaliação de viabilidade e proliferação celular é baseado na redução metabólica do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) a formazan e permite avaliar tanto a proliferação quanto a viabilidade celular. A metodologia utilizada foi descrita por Monks et al, 1991, e realizada com modificações.

Decorrido o período de incubação das células com as substâncias, foram adicionados a cada poço, 10 µL de uma solução de 05 mg/mL MTT (Sigma Aldrich, USA) em meio RPMI, preparada no momento de uso. Após 4 horas de incubação com o reagente, e conseqüentemente a formação de cristais de formazan, o sobrenadante foi retirado com pipeta multicanal de maneira a preservar os cristais. Posteriormente, a cada poço foram adicionados 200 µL de uma solução de HCl 0,04M em isopropanol (Merk KGaA, Alemanha). Após solubilização dos cristais de formazan formados pela metabolização do MTT pelas células viáveis, as placas foram analisadas no leitor de ELISA no comprimento de onda de 595 nm.

Os resultados foram expressos como porcentagem de viabilidade, em comparação com o controle DMSO, sendo calculados da seguinte forma: a absorbância das células controle DMSO foram considerados como 100 por cento. A absorbância foi calculada para as células tratadas por comparação com o controle DMSO.

Interações dos compostos e o meio foram estimados com base nas variações entre o controle positivo de cisplatina e controle negativo sem drogas para escapar de falso-positivos ou falso-negativos.

Para a determinação da IC₅₀ foram selecionadas as substâncias que reduziram em mais de 50% a viabilidade celular na concentração de 50 µM após um período de incubação de 48 horas na triagem inicial. Para esta finalidade, as amostras foram preparadas empregando-se sete diluições (100; 75; 50; 25; 10; 01; 0,01 µM) e incubadas com as células em atmosfera de 5% de CO₂, em temperatura de 37°C, por um período de 48 horas e a viabilidade avaliada pelo ensaio de MTT.

Os ensaios foram realizados em triplicata com controle positivo, negativo e controle DMSO e as porcentagens foram determinadas como descrito anteriormente. Os pontos de cada concentração foram utilizados para construção da curva dose-resposta no formato sigmoidal simétrico padrão, sendo o objetivo de determinar a concentração que provoca uma resposta entre a resposta máxima e a mínima. Os gráfico e o ponto da IC₅₀ foram produzidos no software GraphPad Prism 5.0.

4.2.2. Avaliação da atividade citotóxica em células mononucleares do sangue periférico

As substâncias que apresentaram a maior atividade em células tumorais foram testadas em células normais do sangue humano para avaliação de seu caráter citotóxico e imunomodulador. O sangue periférico foi colhido no dia do procedimento na Fundação Hemominas e as células mononucleares foram processadas no Centro de Pesquisas René Rachou-FIOCRUZ.

As células foram contadas e ajustadas para uma densidade de 150.000 células por poço (placa de 96 poços) e foram cultivadas por um período de 48 horas na presença dos compostos selecionados. Para comparação de atividade entre as substâncias e as células foram utilizadas concentrações (100; 75; 50; 25; 10; 1; 0,01 µM) para determinação da IC₅₀ e após a incubação a viabilidade foi avaliada pelo ensaio de MTT. As curvas concentração-resposta e IC₅₀ foram feitas como descrito anteriormente utilizando o software GraphPad Prism 5.0.

4.2.3. Determinação do conteúdo de DNA sub-diplóide por meio de uma solução fluorocrômica hipotônica (HFS)

A avaliação do conteúdo de DNA sub-diplóide é uma metodologia que permite a identificação das substâncias com potencial pró-apoptótico nas linhagens tumorais susceptíveis, sendo utilizado o método descrito por Nicoletti et al, (1991). Para o procedimento foram utilizadas as linhagens HL 60 e Jurkat. As células tratadas e os controles foram cultivados em placas de 24 poços na densidade de 250.000 células por poço durante 24 horas. Foi utilizada para este procedimento a concentração de 50 μ M, a mesma escolhida para a triagem. Após o período de incubação as células foram transferidas para tubos de 01 mL e centrifugadas por 5 minutos a 5.000 RPM, sendo o sobrenadante bem como o excesso de meio removidos após este processo. Aos precipitados de células dos tubos foram adicionados 300 μ L de uma solução fluorocrômica hipotônica (HFS), contendo 50 μ g/mL de Iodeto de Propídeo - PI (Sigma, Saint Louis, Missouri USA) e 0,1% de triton X-100 (Sigma, Saint Louis, Missouri USA) em citrato de sódio a 0,1% (Sigma, Saint Louis, Missouri USA). A incubação das células com a solução de HFS leva à fragilização da membrana celular pela ação do triton-X100 e o choque hipotônico provoca a lise da membrana celular. O material nuclear se torna acessível ao PI, que irá se intercalar no DNA nuclear.

As células foram incubadas a temperatura de 4°C durante 4 horas e levadas para análises no Citômetro de fluxo FACScalibur ([BD Biosciences, USA](#)). A população celular é delineada utilizando o controle de células. Foram utilizadas como controle do experimento células tratadas apenas com o veículo DMSO (Solução aquosa com 0,005% de DMSO) e como controle positivo composto por células tratadas com cisplatina na concentração de 50 μ M. Foram realizados três experimentos independentes, realizados em replicatas.

Os dados são dispostos em gráficos pontuais de tamanho por granulosidade, e a fluorescência emitida dos núcleos foi analisada em histogramas. Os dados e o conteúdo de DNA sub-diplóide foi definido utilizando o programa CellQuest (Becton Dickinson, USA). As células normais apresentam o conteúdo de DNA igual a 2n ou 4n, dependendo da fase do ciclo celular em que se encontram. Já as células em apoptose apresentarão o conteúdo de DNA menor que 2n, uma vez que os fragmentos de pequeno peso molecular irão deixar o interior do núcleo.

4.2.4. Bloqueio da atividade de caspases em células HL 60

A linhagem HL 60 foi cultivada na densidade de 100.000 células por poço em placa de 96 poços e foram pré-incubadas por 45 minutos com 40 μ M do inibidor inespecífico de caspases Z-VAD-FMK (Biomol, USA). As substâncias selecionadas foram adicionadas a cada poço e incubadas por 24 horas, sendo utilizados como controle as células tratadas com o veículo DMSO (0,0005%) e como controle positivo células tratadas com cisplatina (50 μ M). Após incubação, as substâncias foram transferidas para os tubos de 01 mL e centrifugadas durante 5 minutos a 5.000 RPM e o sobrenadante foi desprezado. Ao precipitado de células foi adicionado 300 μ L da solução de HFS. Após 4 horas de incubação a 4°C o conteúdo de DNA foi analisado por citometria de fluxo como descrito anteriormente. Foram realizados três experimentos independentes.

4.2.5. Avaliação da morfologia nuclear por microscopia de fluorescência

A linhagem HL 60 foi cultivada em placa de 24 poços e tratada com as substâncias selecionadas na concentração final de 50 μ M, num volume final de 1,0 mL, em atmosfera de 5% de CO₂, em temperatura de 37°C, por um tempo de incubação de 24 horas. Como controles foram utilizados a cisplatina (50 μ M) e o veículo DMSO (0,0005%). Após 24 horas de incubação foi realizada a dupla marcação diretamente em células vivas, sem fixação, com a adição ao meio de cultura dos reagentes Hoechst 33342 (Hst) (Sigma) e iodeto de propídeo (PI) (Sigma) na concentração final de 1,0 mg/mL para cada reagente. As células foram incubadas por 20 minutos a 37 ° C na estufa de CO₂ protegidas da luz para absorver a marcação, como descritas por Thuret et al (2003).

Após a marcação, o meio contendo as células foi homogeneizado afim de ressuspender as células leucêmicas e transferidas para um tubo de 2,0 mL para centrifugação. Após 5 minutos de centrifugação a 5.000 RPM o sobrenadante foi desprezado e as células lavadas com PBS antes de mais uma etapa de centrifugação. Após a segunda centrifugação o PBS foi desprezado e o concentrado de células é aplicado sobre as lâminas de vidro, levadas imediatamente para o microscópio de fluorescência (Carl Zeiss, Alemanha) e avaliados com aumento de 40X em dois filtros

(filtro DAPI, excitação 340-380 nm, filtro barreira de 430 nm e filtro de rodamina, excitação 530-560 nm, filtro barreira de 580 nm).

Foram realizados dois experimentos independentes. Para cada amostra foram fotografados três campos microscópicos captados pela câmera acoplada ao microscópio AxionCam RMm (Carl Zeiss, Alemanha), sendo tiradas uma fotografia de Hst e uma de PI para comparação. Com o tempo de 24 horas, as células exibindo um núcleo condensado em azul brilhante foram considerados em apoptose (Hst +, PI -) e células com dupla marcação foram consideradas, dependendo da morfologia, em apoptose tardia ou necrose (Hst+, PI+). As imagens foram analisadas e combinadas utilizando o programa livre ImageJ 1.43r (National Institutes of Health, USA).

4.2.6. Ensaio fluorimétrico para a quantificação de caspase-3

A avaliação da ativação de caspase-3 foi determinada com o EnzChek® Caspase-3 Assay Kit #1 (Molecular Probes, USA), ensaio que baseia-se na detecção do substrato para caspase-3, o Z-DEVD (Substrato) ligado ao AMC (7-amino-4-metilcumarina) que é fracamente fluorescente no comprimento de onda UV (excitação/emissão 330/390 nm), mas após a clivagem proteolítica este mesmo substrato produz forte fluorescência (excitação/emissão 342/482 nm). Para leitura do experimento foi utilizado o espectrofotômetro de fluorescência Cary Eclipse (Varian, USA).

As células foram cultivadas em placas de 6 poços na densidade de 1.000.000 de células por poço. Após o período de recuperação as células foram tratadas com as substâncias testes e os controles. A concentração utilizada foi de 50 μ M para as substâncias testes e o controle de cisplatina. Decorrido o tempo de incubação, as células foram transferidas para tubos cônicos de 2,0 mL e centrifugadas durante 5 minutos a 5.000 RPM. Após centrifugação o sobrenadante de meio de cultura foi descartado e o precipitado celular foi tratado com solução de lise. As células com a solução de lise foram mantidas a temperatura de 0°C (banho de gelo) e centrifugadas novamente durante 5 minutos a 5.000 RPM. Alíquotas de 50 μ L do sobrenadante foram adicionadas a 50 μ L da solução tampão de reação com 10 mM do substrato Z-DEVD-AMC e mantidas a temperatura ambiente durante 30 minutos. As amostras foram, então, levadas ao espectrofotômetro de fluorescência para a realização da leitura (excitação/emissão:

342/482 nm). Foram realizados três experimentos independentes. Os resultados foram expressos como porcentagem da ativação de Caspase-3, onde a densidade ótica do controle DMSO foi considerada como 100 % e os grupos tratados foram calculados em comparação ao grupo DMSO.

4.2.7. Detecção simultânea da externalização de fosfatidilserinas por anexina-V e marcação do DNA com iodeto de propídeo

Para detecção simultânea da externalização das fosfatidilserinas por anexina-V e marcação do DNA com iodeto de propídeo foi utilizado o Annexin-V FITC Apoptosis Kit (Invitrogen, USA) para citometria de fluxo baseado no método descrito por Vermes e Colaboradores, 1995. As fosfatidilserinas são componentes fosfolipídicos normalmente mantidos para o lado citosólico das membranas celulares, porém quando há a morte por apoptose as fosfatidilserinas invertem sua posição para o exterior da membrana. (Vermes et al, 1995) As células foram incubadas na densidade de 250.000 células por poço (placa de 24 poços) durante 24 horas juntamente com as amostras testes na concentração de 50 μ M. Paralelamente as amostras testes, um controle negativo sem substâncias e um controle positivo com cisplatina foi preparado. As células foram centrifugadas durante 5 minutos a 5.000 RPM e o sobrenadante foi descartado. O precipitado de células foi lavado com PBS e depois diluído em 100 μ L da solução de tampão de ligação (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2). A cada tubo foi acrescentado 1 μ L de Annexin-V FITC (Anexina-V recombinante conjugada com FITC em solução salina em 1% BSA e 0.1% sodium azide, pH 7.4) e solução de e 2 μ L da solução de iodeto de propídeo (50 μ g/mL em PBS) para cada tubo e incubado à temperatura ambiente por 15 minutos protegido da luz. Depois de marcadas as células, foi adicionado a cada tubo 400 μ L do tampão de ligação e estes foram levados para análise no citômetro de fluxo FACscan.

A análise dos resultados foi feita por meio de gráficos do tipo pontual (“dot plot”). Células positivas para anexina V e negativas para PI serão agrupadas como apoptose precoce. Células duplamente positivas foram agrupadas como apoptose tardia. Células negativas para anexina V e positivas para PI serão agrupadas como necróticas.

4.3. Análise estatística

Os resultados apresentados foram obtidos de três experimentos independentes. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão e a significância entre o grupo controle e o grupo tratado foi medida pelo teste t de Student.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação da viabilidade celular em células leucêmicas: triagem aleatória de compostos sintéticos

Com o objetivo de identificar novos compostos com potencial atividade antitumoral, com alvo nas vias de apoptose, neste estudo foram avaliadas trinta e oito substâncias de diferentes classes, selecionadas ao acaso e sintetizadas pelo Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia - UFMG. Destas substâncias, dezoito são éteres alquil-glicídicos (RA02, RA08, RA09, RA11, RA13, RA15, RA20, RA21, RA22, RA26, RA27, RA28, RA29, RA30, RA33, RA34, RA35 e RA 36), onze são derivados de carboidratos (RA01, RA03, RA06, RA12, RA14, RA17, RA24, RA25, RA31, RA37 e RA38), cinco são derivados do ácido benzóico (RA16, RA18, RA19, RA23 e RA32) e quatro compostos pertencentes a outros grupos (RA04, RA05, RA07 e RA10).

Neste contexto, o modelo *in vitro*, utilizado para triagem das substâncias inclui cinco linhagens leucêmicas distintas: células do tipo selvagem como Jurkat (leucemia linfóide) e HL 60 (leucemia mielóide), bem como células HL 60 transfectadas estavelmente com proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 (HL 60 Bcl-2) e Bcl-X_L (HL 60 Bcl-X_L), bem como a tirosina quinase Bcr.Abl (HL 60 Bcr.Abl). Os dados foram expressos como percentual de proliferação celular em relação ao DMSO. Os resultados da triagem inicial geral podem ser observados no Apêndice 2.

Dentre as substâncias testadas, apenas quatro compostos da classe dos éteres alquil-glicídicos induziram mais que 50% de redução da viabilidade celular em diferentes linhagens, apresentando os enantiômeros RA33 e RA34 o maior potencial citotóxico. Na linhagem HL 60, as substâncias RA33 e RA34 reduziram a viabilidade celular em $17,35 \pm 11,42$ e $12,24 \pm 3,29\%$, respectivamente, que não difere significativamente entre si, porém o são quando comparados ao controle DMSO ($p > 0,05$, teste *T-Student*). Ambas as substâncias também apresentaram atividade citotóxica nas linhagens expressam ectopicamente fatores anti-apoptóticos, no entanto, houve diminuição do efeito citotóxico a 50 μ M nas linhagens HL 60 Bcl-X_L quando comparadas a HL 60 (RA34 com $29,26 \pm 7,67 \%$ e a RA33 com $56,71 \pm 15,72 \%$ de viabilidade) e HL 60 Bcr.Abl (RA34 com $49,60 \pm 16,54\%$ e a RA33 com $48,87 \pm 6,70\%$ de viabilidade). Na linhagem Jurkat, as substâncias RA33 e RA34 reduziram a

viabilidade para $16,14 \pm 0,89\%$ e $32,77 \pm 0,07\%$, respectivamente, sendo estes valores significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$, teste *T-Student*). Esse mesmo efeito foi observado nas linhagens HL 60 Bcl-X_L e HL 60 Bcl-2, como pode ser observado na Figura 1.

A substância RA36 apresentou um menor potencial citotóxico, sendo a concentração de 50 μ M capaz de induzir perda de viabilidade superior a 50% apenas nas linhagens Jurkat ($44,29 \pm 7,25\%$) e HL 60 ($41,41 \pm 10,44\%$). Nas linhagens HL 60 Bcl-X_L, HL 60 Bcl-2, HL 60 Bcr.Abl, a substância RA36 apresentou perda de atividade citotóxica quando comparado a linhagem HL 60, a substância RA35, apresentou baixo efeito citotóxico em todas as linhagens (Figura 1).

Como resultados desta investigação, também foram testados complexos metálicos sintetizados a partir de doze tiossemicarbazonas distintas, sendo gerados para triagem: dez tiossemicarbazonas complexadas com antimônio (III), seis tiossemicarbazonas complexadas com bismuto (III), seis tiossemicarbazonas complexadas com paládio (II) e três tiossemicarbazonas complexadas com platina (II). Estas substâncias foram sintetizadas pelo grupo de química inorgânica da Prof^a. Dr^a. Heloísa de Oliveira Beraldo do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, gerando uma publicação na revista *Bioorganic & Medicinal Chemistry* que pode ser encontrado no Anexo 1.

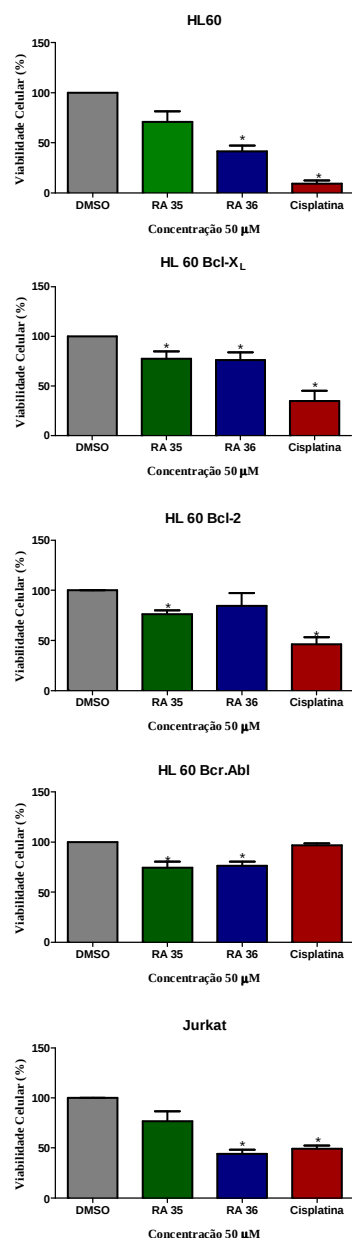
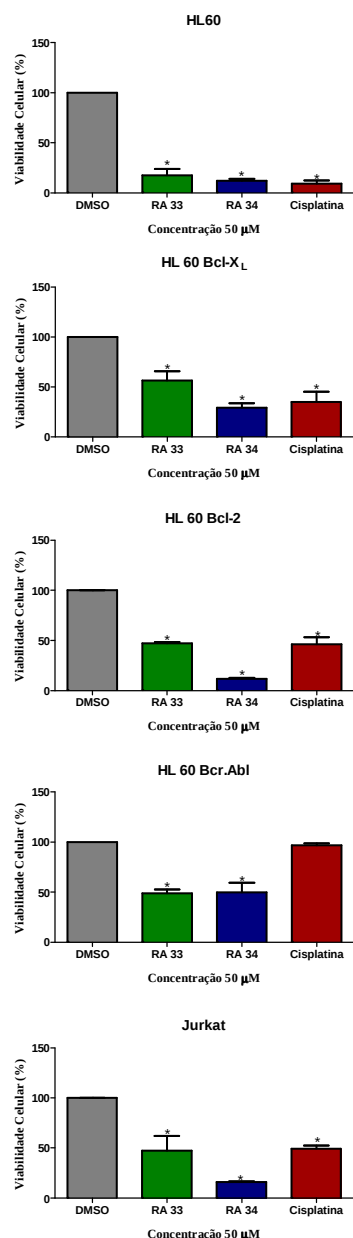
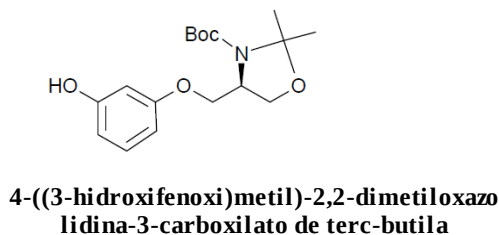
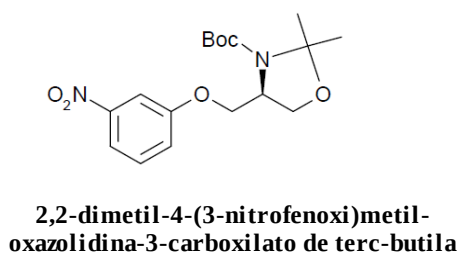


Figura 1. Viabilidade celular das linhagens tratadas com substâncias selecionadas. As células foram tratadas com os enantiômeros do grupo nitro RA33 e RA34 e os enantiômeros do grupo hidroxila RA35 e RA36 na concentração de 50 µM e incubadas em atmosfera 5% CO₂ durante 48 horas. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT. Dados representativos de três experimentos independentes (* p<0,05, teste *T-Student*).

5.2. Determinação da concentração inibitória de 50% do crescimento celular (IC₅₀) pelos compostos ativos

As substâncias ativas selecionadas, RA33, RA34, RA35 e RA36, tiveram sua IC₅₀ determinada nas linhagens HL 60, HL 60 Bcl-X_L, HL 60 Bcl-2 e Jurkat, no tempo de 48 horas, tendo sido feita a diluição seriada, com variação de concentração de 100 µM a 0,01 µM e a viabilidade avaliada pelo ensaio de MTT. A determinação da IC₅₀ para a linhagem HL 60 Bcr.Abl não foi realizada pois os valores de inibição da proliferação obtidos a partir da triagem inicial demonstraram que na concentração de 50 µM as substâncias RA33 e RA34 apresentaram aproximadamente a 50%. A determinação da IC₅₀ foi realizada no programa GraphPad Prism5, tendo sido construídas curvas de regressão, nas concentrações citadas anteriormente. Os dados podem ser avaliados na tabela 1.

O tratamento das células leucêmicas com as substâncias RA33, RA34 e RA36 apresentou efeito citotóxico concentração-dependente em todas as linhagens avaliadas. A substância RA34 apresentou maior atividade citotóxica em todas as linhagens, não apresentando diferenças significativas entre as IC₅₀ para as linhagens HL 60 (12,22 ± 2,13 µM), HL 60 Bcl-X_L (12,20 ± 5,55 µM) e Jurkat (13,61 ± 2,30 µM), havendo perda de atividade quando comparado a linhagem transformada HL 60 Bcl-2 (36,88 ± 19,44 µM). Para a substância RA36, observa-se grande perda de atividade citotóxica na ordem de 05 a 06 vezes, nas linhagens HL 60 (75,25 ± 3,82 µM), HL 60 Bcl-X_L (78,21 ± 6,62 µM) e Jurkat (74,44 ± 5,66 µM). A substância RA33 apresentou menor atividade citotóxica quando comparada a RA34, tendo alcançado efeito relevante apenas nas linhagens HL 60 (52,01 ± 5,14 µM) e Jurkat (32,71 ± 13,62 µM). A substância RA35 apresentou baixa atividade em todas as linhagens testadas.

Tabela 1. Valores de IC₅₀ das substâncias selecionadas em micromolar (µM)

Linhagem	RA 33	RA 34	RA 35	RA 36	Cisplatina
HL 60	44,82 ± 5,30	12,22 ± 2,13	> 100	75,25 ± 3,82	1,79 ± 1,62
HL 60 Bcl-2	> 100	36,88 ± 19,44	> 100	> 100	5,77 ± 3,98
HL 60 Bcl-X _L	> 100	12,20 ± 5,55	> 100	78,21 ± 6,62	4,91 ± 3,00
Jurkat	32,71 ± 13,62	13,61 ± 2,30	> 100	74,44 ± 5,66	2,24 ± 0,66

As células foram tratadas com os compostos RA33, RA34, RA35 e RA36 em diferentes concentrações e incubadas por 48 horas em atmosfera 5% de CO₂. Dados representativos de três experimentos independentes.

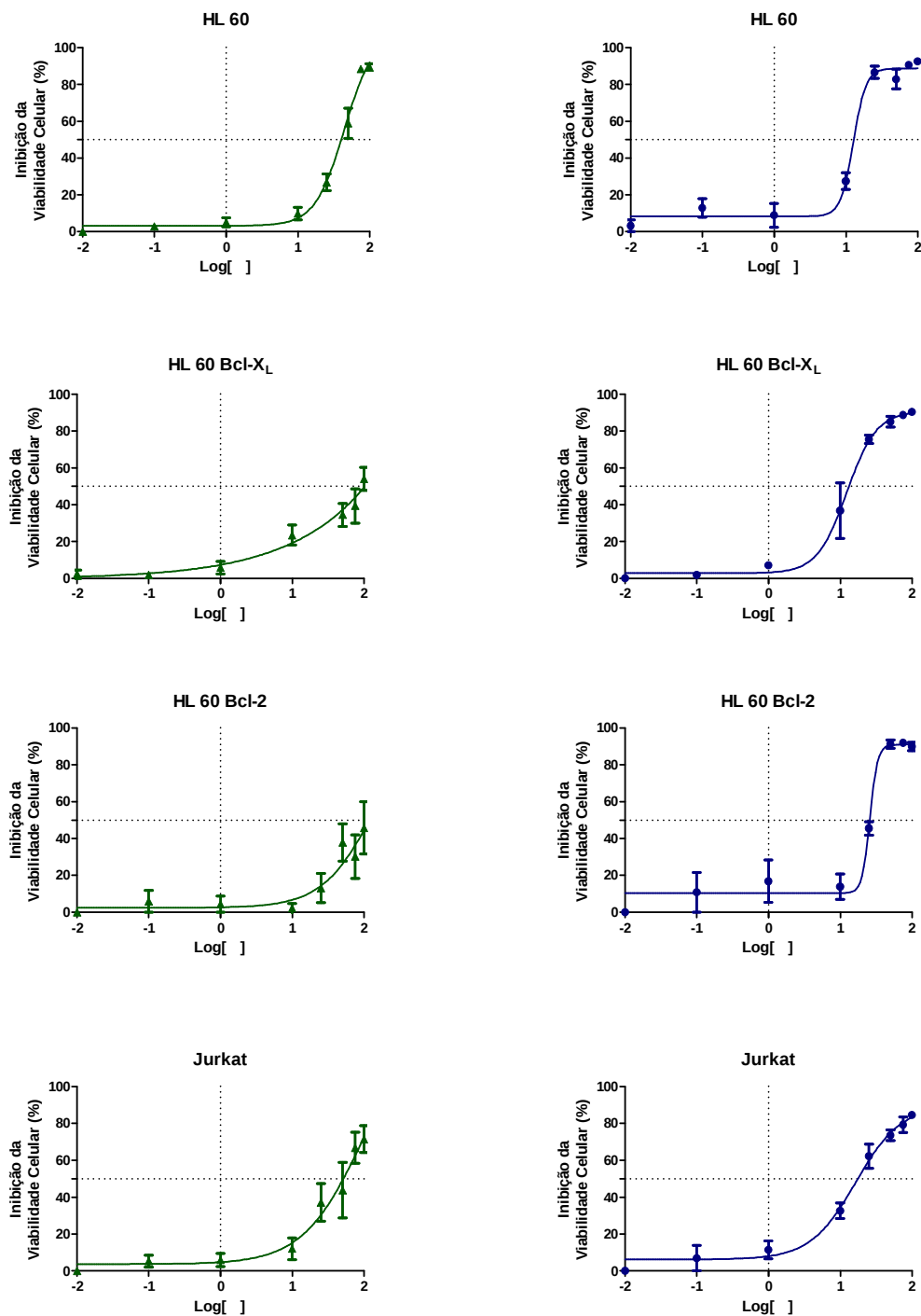


Figura 2. Curvas representativas da concentração inibitória de 50% da viabilidade celular dos enantiômeros RA33 e RA34 em linhagens leucêmicas. As linhagens foram tratadas com diferentes concentrações dos enantiômeros por 48 horas e a viabilidade das células foi determinada pelo ensaio de MTT. Dados representativos de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata.

5.3. Avaliação da atividade citotóxica em células mononucleares do sangue periférico humano

A determinação da IC_{50} foi realizada seguindo-se o mesmo período de incubação realizados nos experimentos com células tumorais, utilizando o programa GraphPad Prism5. Para avaliação da viabilidade celular foi utilizado o ensaio de MTT e os resultados foram dispostos em gráficos de dispersão, como é possível observar na Figura 3. No tratamento de 48 horas não foi observado diferenças significativas ($p > 0,05$, teste *T-Student*) entre as concentrações inibitórias de 50% da viabilidade celular (IC_{50}) das substâncias RA33 ($105,51 \pm 68,67 \mu M$) e RA34 ($64,83 \pm 13,12 \mu M$) para células do PBMC, porém a ambas foram significativamente ($p < 0,05$, teste *T-Student*) menos citotóxicas do que a droga controle cisplatina ($28,07 \pm 17,22 \mu M$) no PBMC.

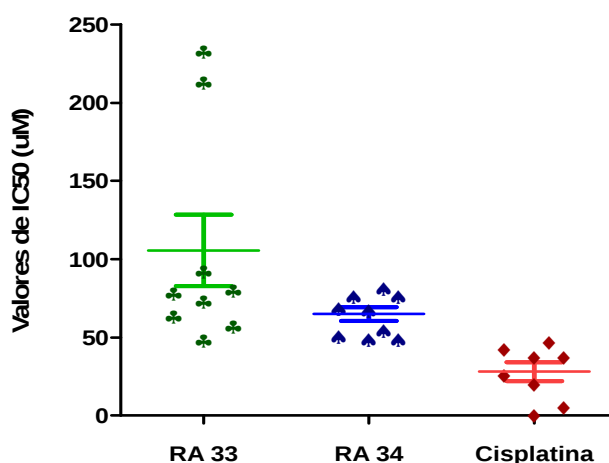


Figura 3. Avaliação da concentração inibitória de 50% da viabilidade celular dos enantiômeros RA33 e RA34 em células mononucleares do sangue periférico humano. As células foram tratadas com os compostos RA33, RA34 em diferentes concentrações e incubadas por 48 horas em atmosfera 5% de CO_2 . Dados representativos de nove experimentos independentes.

5.4. Avaliação da fragmentação do DNA nas linhagens HL60 e Jurkat

Com a finalidade de identificar o potencial pró-apoptótico das substâncias ativas, foi escolhido como ensaio inicial, a avaliação da fragmentação do DNA celular por citometria de fluxo. As substâncias RA33 e RA34 foram selecionadas para esta análise por apresentar maior efeito citotóxico. Estes ensaios foram realizados com células Jurkat e HL 60 já que foram as linhagens que apresentaram maior susceptibilidade a estes compostos. A fragmentação do DNA é um evento que pode ser mensurado em tempos variáveis, em função do tipo celular e natureza do estímulo pró-apoptótico, mas que na grande maioria dos estudos é passível de ser observado com 24 horas. Portanto, estes experimentos foram realizados com este tempo. Desta forma, as células foram tratadas com as duas substâncias por 24 horas e a fragmentação do DNA celular avaliado por marcação com iodeto de propídeo e análise por citometria de fluxo. Nesta metodologia o iodeto de propídeo se intercala com o DNA celular, permitindo a quantificação do conteúdo de DNA sub-diplóide e de células em diferentes fases do ciclo celular (vide a metodologia). Para análise do conteúdo de DNA sub-diplóide (Fragmentação de DNA) foram construídos histogramas no programa BQ Cell Quest Pro. Os dados foram expressos em percentual de fragmentação do DNA e como controle foi utilizado o DMSO. Valores iguais ou inferiores a 10% são considerados aceitáveis para células em suspensão cultivadas *in vitro*.

A substância RA34 induziu fragmentação do DNA de maneira concentração dependente na linhagem HL 60, onde é possível observar que nas concentrações de 50 μM e 25 μM houve indução de $65,97 \pm 15,72 \%$ e $29,16 \pm 11,43 \%$, respectivamente. Estes valores apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$, teste *T-Student*) quando comparadas a cultura controle tratada com DMSO ($8,24 \pm 3,54 \%$), enquanto a concentração de 12,5 μM ($15,42 \pm 10,12\%$) não apresentou atividade significativa quando comparado ao controle ($p > 0,05$, teste *T-Student*). A substância RA34 não induziu significativa fragmentação de DNA na linhagem Jurkat após tratamento por 24 horas. A substância RA33, na linhagem HL 60, induziu significativa fragmentação do DNA nas concentrações de 50 μM ($71,78 \pm 17,78 \%$) e 25 μM ($31,60 \pm 13,19 \%$) e 12,5 μM ($17,61 \pm 4,15 \%$) quando comparadas ao controle de DMSO ($8,24 \pm 3,54 \%$). Também não houve atividade significativa da substância RA33 na linhagem Jurkat após 24 horas de incubação.

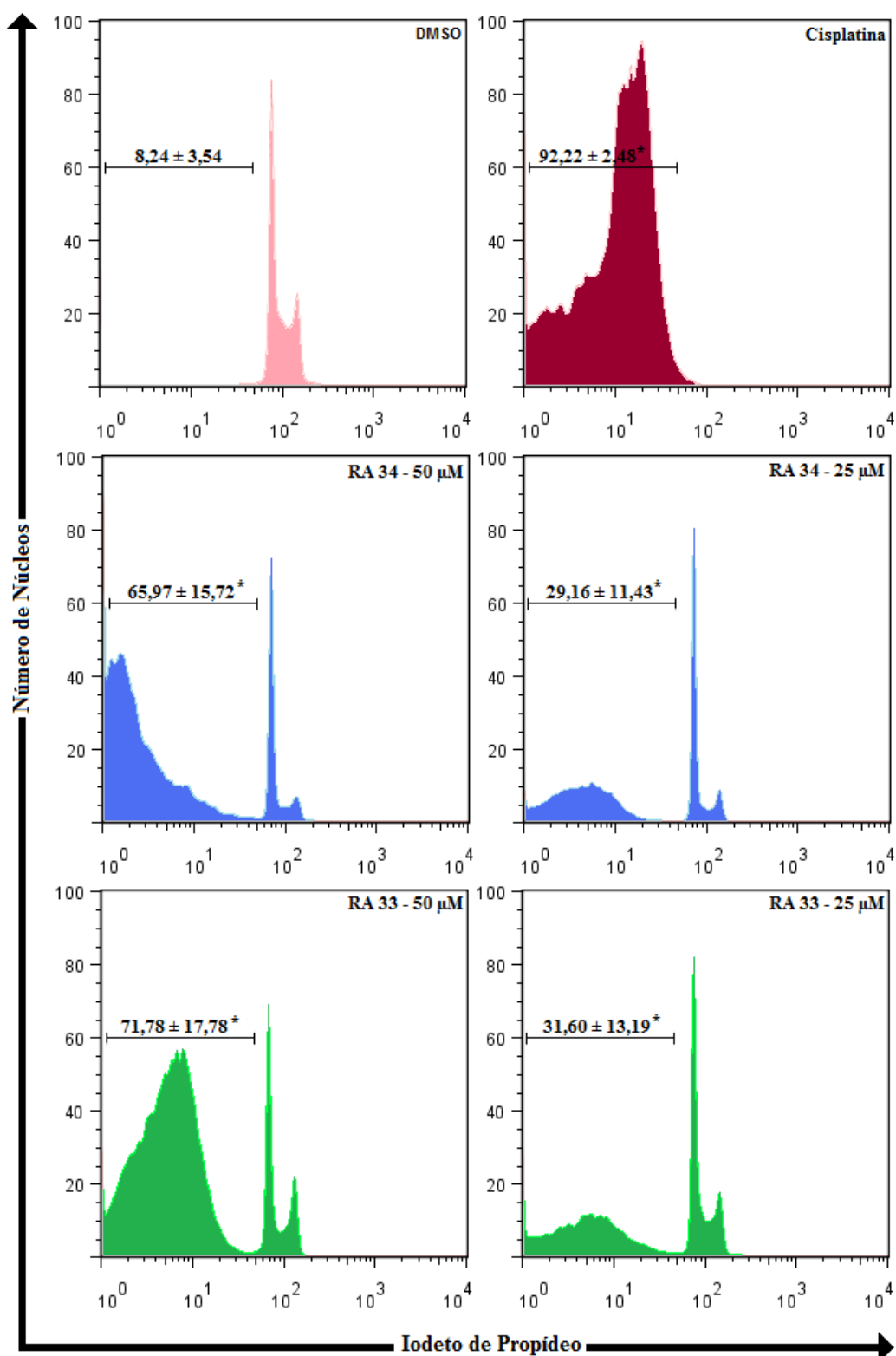


Figura 4. Avaliação do conteúdo de DNA sub-diplóide de células HL 60 tratadas com os enantiômeros RA33 e RA34. Células foram incubadas em diferentes concentrações (50 μM, 25 μM) dos enantiômeros RA33 e RA34 durante 24 horas, e posteriormente, marcadas com iodeto de propídeo e quantificadas por citometria de fluxo. Dados representativos três experimentos independentes (* p<0,05, teste *T-Student*).

5.5. Avaliação da inibição de caspases na fragmentação de DNA induzida pelos compostos ativos

O aumento do conteúdo de DNA subdiploide, observada pela indução de fragmentação do DNA em células HL-60 tratadas com as duas substâncias sugere que as mesmas possuem um potencial pro-apoptótico. Para investigar se RA33 e RA34 induzem morte por apoptose, foi usada como estratégia inicial a inibição geral da atividade caspase utilizando-se o inibidor Z-VAD-FMK. Como a fragmentação do DNA celular é também um fenômeno que pode ser induzido por caspases, para estes experimentos foi utilizada a sua quantificação. Desta forma, células HL 60 foram pre-tratadas com este inibidor e posteriormente incubadas com RA33 e RA34 por 24 horas, sendo o conteúdo de DNA celular avaliado por citometria de fluxo.

Como é possível observar na figura 5, células HL 60 previamente incubadas com o inibidor geral de caspases e tratadas com RA33 e RA34 por 24 horas apresentaram uma redução significativa ($p < 0,05$, teste *T-Student*) dos valores da fragmentação do DNA celular. O percentual de células com o DNA fragmentado foi semelhante à cultura controle (tratadas com DMSO). Este efeito também pode ser observado para a cisplatina, que foi usada como controle positivo.

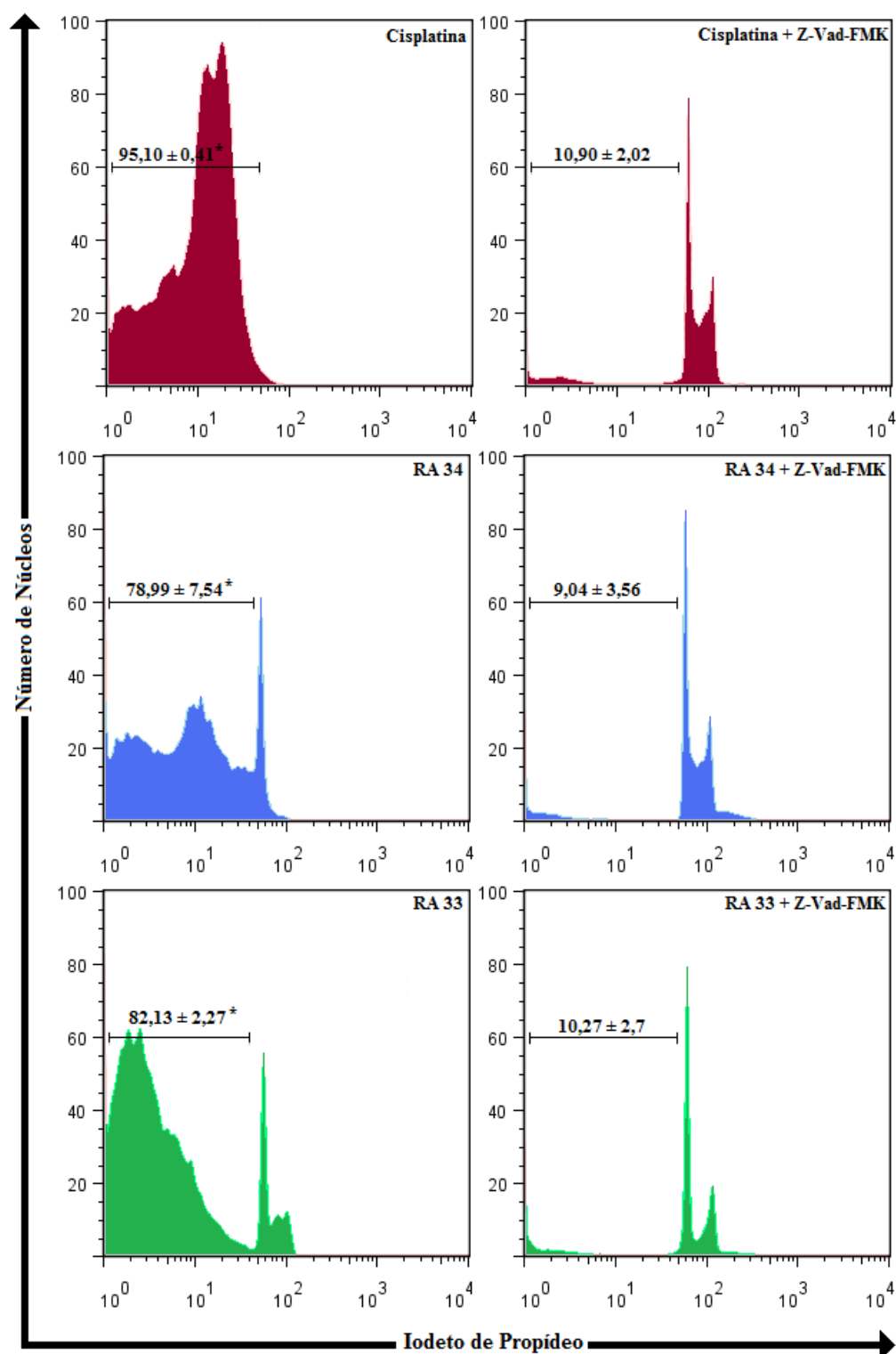


Figura 5. Avaliação do conteúdo de DNA sub-diplóide de células HL 60 pré-tratadas com Z-VAD-FMK e tratadas com os enantiômeros RA33 e RA34. Células foram pré-incubadas com 40 μ M de Z-VAD-FMK por 45 e posteriormente incubadas com os enantiômeros RA33 e RA34 na concentração de 50 μ M. Dados representativos de três experimentos independentes (* $p < 0,05$, teste *T-Student*).

5.6. Avaliação da morfologia nuclear na linhagem HL 60

As células tratadas com os enantiômeros RA33 e RA34 foram avaliadas quanto à morfologia dos núcleos para determinar a presença de condensação e fragmentação de DNA, características importantes da apoptose, através da microscopia de fluorescência. Para análise das células marcadas com os corantes, foram avaliados três campos onde foram contadas com núcleo normal (células viáveis), células com núcleo condensado, células com núcleo fragmentado e células mortas (dupla marcação).

Foi realizada uma análise qualitativa das lâminas de dois experimentos independentes. As células tratadas com o veículo DMSO não apresentaram qualquer alteração nuclear relevante, sendo encontrada predominância de células viáveis, semelhantes ao controle de células somente com meio RPMI. As células tratadas com os enantiômeros RA33 e RA34 apresentaram um aumento de células com núcleos condensados, bem como de células com núcleo fragmentado ou de células já mortas. A cisplatina apresentou predominância de células mortas e de células com DNA fragmentado. Imagens representativas podem ser vistas na figura 6.

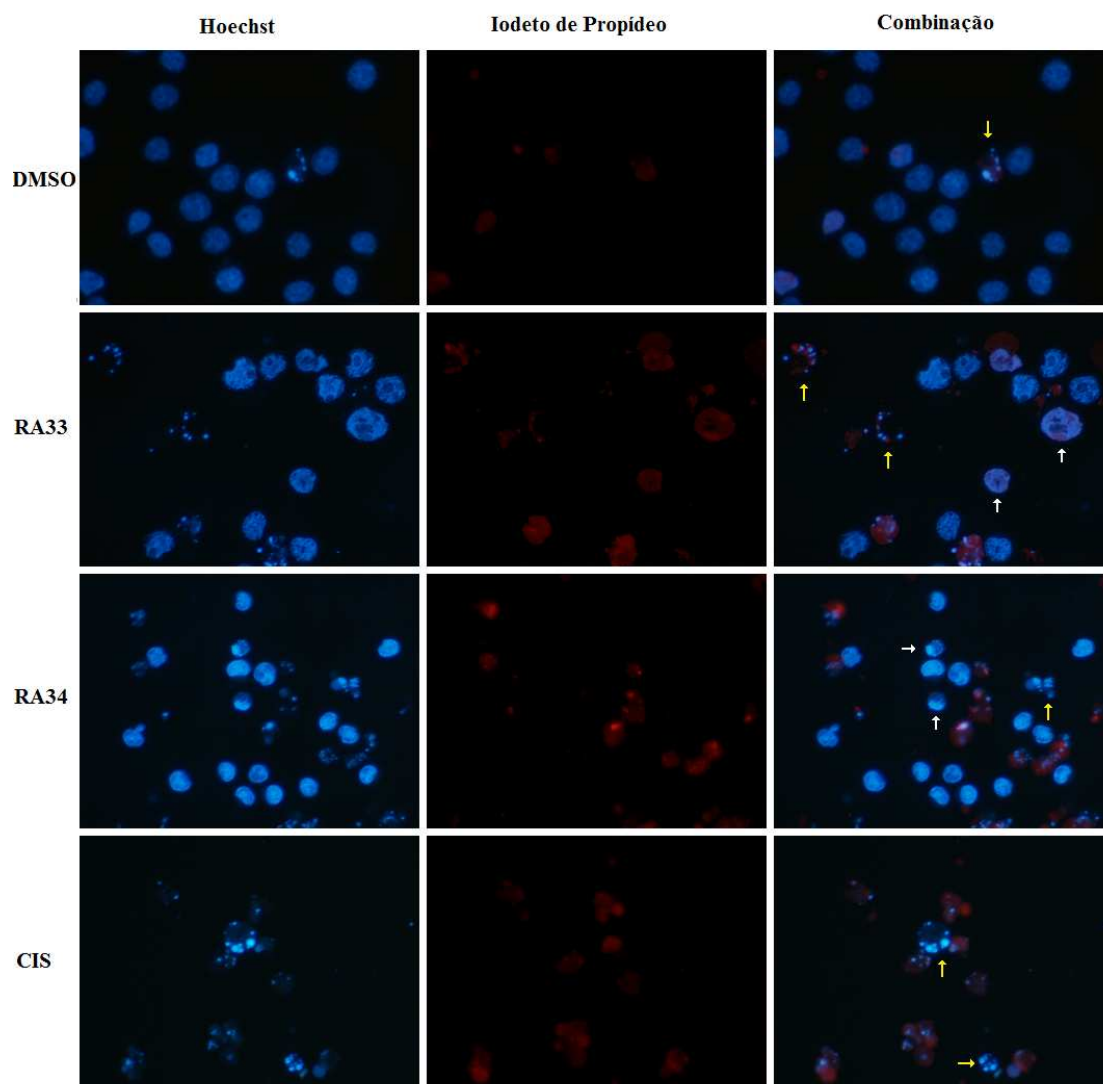


Figura 6. Avaliação da morfologia nuclear de células tratadas com os enantiômeros RA33 e RA34 por microscopia de fluorescência. As células foram tratadas com 50 μ M dos enantiômeros e cisplatina por 24 horas. A dupla marcação das células com Hoechst 33342 (Hst) e iodeto de propídeo (PI) distingue algumas características típicas do apoptose tais como condensação (setas brancas) e fragmentação de DNA (setas amarelas). Imagens representativas de dois experimentos independentes (aumento 40X).

5.7. Avaliação da externalização de fosfatidilserinas na linhagem HL 60

A externalização das fosfatidilserinas foi avaliada por citometria de fluxo após tratamento das células com as substâncias RA33 e RA34 (50 μ M) por 24 horas. Quando há morte celular por apoptose ocorre uma inversão da disposição de fosfatidilserinas da membrana celular, de forma que estas que se encontram fisiologicamente no interior do citoplasma são dispostas no exterior da membrana plasmática, o que permite a sua marcação com Anexina-V conjugada ao fluorocromo FITC. Para determinar a presença de células necróticas foi feito simultaneamente marcação com iodeto de propídeo, que é impermeável em células viáveis, que apresentam a membrana plasmática íntegra, mas marca o DNA de células que perderam a integridade da membrana.

A classificação das células foi feita da seguinte forma: células sem marcação ou células vivas (-AV/-IP); células anexina-V positivo e iodeto de propídeo negativo ou em apoptose (+AV/-IP); células anexina-V positivo e iodeto de propídeo positivo ou em apoptose tardia (+AV/+IP) e, finalmente, células marcadas somente com iodeto de propídeo que são consideradas necróticas (-AV/+IP).

As substâncias RA33 ($20,49 \pm 3,09\%$) e RA34 ($22,16 \pm 3,37\%$) aumentaram significativamente ($p < 0,05$, teste *T-Student*) o número de células duplo marcado com anexina V e PI, quando comparadas com o controle de DMSO ($5,73 \pm 0,38\%$). A cisplatina ($88,44 \pm 3,93\%$) foi o composto com maior proporção de células duplo marcado ($p < 0,05$, teste *T-Student*). Todas as substâncias induziram apoptose tardia na linhagem HL 60 após incubação de 24 horas.

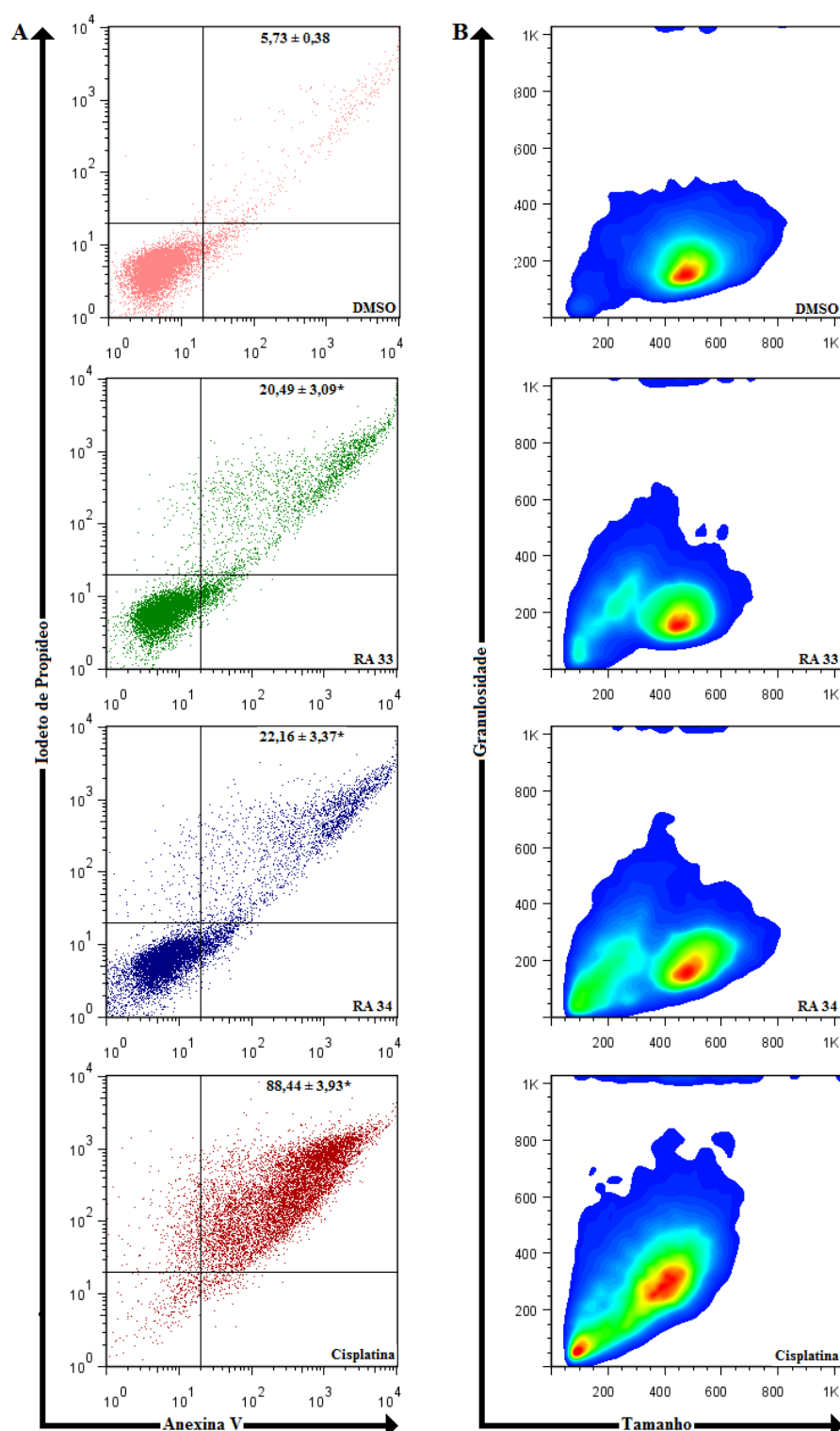


Figura 7. Avaliação da exposição de fosfatidilserinas e marcação do DNA em células HL 60 tratadas com enantiômeros RA33 e RA34. Células foram incubadas com os enantiômeros RA33 e RA34 na concentração de 50 μ M das durante 24 horas. A) Células marcadas com anexina V-FITC e iodeto de propídeo. B) Células distribuídas quanto seu tamanho e granulosidade. As análises foram feitas por citometria de fluxo a partir de três experimentos independentes (* $p < 0,05$, teste *T-Student*).

5.8. Avaliação da ativação de caspase-3 na linhagem HL 60

A ativação de caspase-3, principal caspase efetora na apoptose, foi avaliada para a linhagem HL 60 tratada com os enantiômeros RA33 e RA34 (concentração de 50 μ M) por espectrofotometria de fluorescência após um período de incubação de 24 horas. Para essa determinação é utilizado um substrato fluorescente, o 7-amino-4-metilcumarina - AMC ligado ao Z-DEVD, que quando é clivado pela caspase-3 ativada, leva a liberação do AMC que emite fluorescência, passível de ser quantificado por espectrofotometria de fluorescência. Os resultados foram expressos em porcentagem e podem ser observados na Figura 6.

O tratamento com as substâncias aumentou significativamente ($p < 0,05$, teste *T-Student*) a atividade de caspase-3 quando comparados ao controle de DMSO. Não houve diferenças significativas ($p > 0,05$, teste *T-Student*) de ativação desta protease entre os enantiômeros RA34 ($435,78 \pm 144,04$ %) e RA33 ($247,65 \pm 24,58$ %). Estes resultados demonstram que essas substâncias ativam a principal protease envolvida no fenômeno de apoptose na linhagem HL 60.

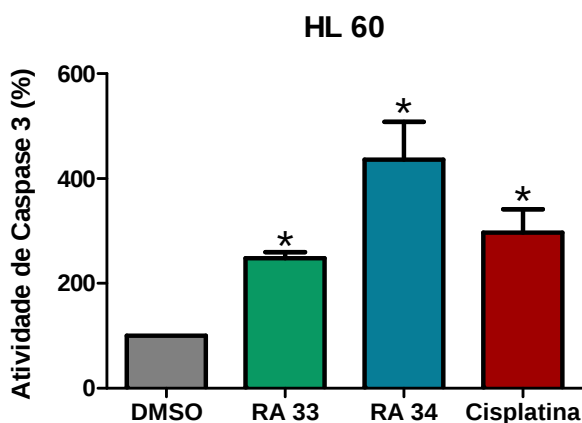


Figura 8. Avaliação da ativação de caspase-3 em células HL 60 pelos enantiômeros RA33 e RA34. As células foram tratadas com os enantiômeros RA33 e RA34 na concentração de 50 μ M e incubadas por 24 horas. A fluorescência gerada pela exposição ao substrato Z-DEVD-AMC foi quantificada no espectrofotômetro de fluorescência. Dados representativos de três experimentos independentes (* $p < 0,05$, teste *T-Student*).

6. DISCUSSÃO

A descoberta de novos compostos antitumorais há muitos anos tem sido feita a partir de ensaios bioquímicos *in vitro*, que buscam aleatoriamente substâncias ativas em vastas bibliotecas químicas, sendo esta prática responsável pela identificação de inúmeros compostos (Bleicher et al, 2003). Atualmente um dos ensaios mais utilizados na triagem inicial de novas estruturas químicas é o ensaio de MTT, que avalia a viabilidade celular através da capacidade metabólica das células em reduzir o MTT ao cristal insolúvel formazam por ação da enzima mitocondrial succinato desidrogenase. Esta enzima mantém-se funcional apenas em células viáveis após o tratamento com substâncias citotóxicas e os cristais de formazam podem ser quantificados (Monks et al, 1991; Ferraz et al, 2009). Para a identificação da atividade citotóxica neste estudo, foram usadas inicialmente células Jurkat (T-cell lymphoblastica aguda), HL 60 (Leucemia promielóide aguda), HL 60 Bcl-X_L (HL 60 com expressão ectópica da proteína ectópica Bcl- X_L), HL 60 Bcl-2 (HL 60 com expressão ectópica da proteína Bcl- X_L) e HL 60 Bcr.Abl (HL 60 com expressão ectópica da proteína Bcr.Abl), sendo todas estas linhagens tumorais de tecido hematopoiético (Brumatti et al, 2003). Por expressarem proteínas anti-apoptóticas estas linhagens são resistentes a alguns fármacos antitumorais e podem ser utilizadas como um modelo interessante para a triagem de substâncias com potencial em modular as vias de apoptose. Em contra partida, como modelo indicativo da toxicidade em células normais para as amostras foram utilizadas células mononucleares do sangue periférico de doadores saudáveis conforme descrito por Souza-Fagundes et al, (2002). Com base nestes modelos, os novos compostos são testados em concentrações que variam entre 01-100 µM, sendo selecionados aqueles compostos que alcançam efeitos citotóxicos entre 30-50% da viabilidade celular, sendo adotados para este estudo como ponto de corte, a redução de 50% da viabilidade celular para o tratamento com 50 µM do composto testado (Keseru & Makara, 2006).

A linhagem HL 60 demonstrou ser mais susceptível ao tratamento com as substâncias testadas em relação às linhagens que expressavam ectopicamente fatores anti-apoptóticos, resultados já esperados devido à resistência à morte celular destas linhagens descrita por Brumatti et al (2003), porém a linhagem Jurkat se comportou de maneira semelhante a HL 60 frente às substâncias ativas. Na triagem inicial foram identificados quatro compostos inéditos que induziram redução de viabilidade maior que 50%. A substância mais ativa foi a RA34 ((S)-2,2-dimetil-4-(3-

nitrofenoxi)metiloxazolidina-3-carboxilato de *terc*-butila), seguidas pelos compostos RA33 ((R)-2,2-dimetil-4-(3-nitrofenoxi)metiloxazolidina-3-carboxilato de *terc*-butila), RA36 ((S)-4-((3-hidroxifenoxi)metil)-2,2-dimetiloxazolidina-3-carboxilato de *terc*-butila). As substâncias RA33, RA34, RA36 e RA02 reduziram a viabilidade da linhagem HL 60 em 87,76%, 82,65%, 58,59% e 50,43%, respectivamente, e para a linhagem Jurkat, 83,86%, 67,23%, 55,41% e 58,4%, respectivamente. Um fato relevante sobre as substâncias mais ativas, RA33 e RA34, é que estes compostos são enantiômeros R e S, imagens especulares uma da outra, sendo quimicamente relacionadas com as substâncias RA02 e principalmente com os enantiômeros RA35 e RA36, que apresentam apenas uma substituição do grupamento Nitro (NO₂) pelo grupamento hidroxila (OH) no anel aromático (Apêndice 1). Dentre as substâncias mais ativas na concentração de 50 µM, se comparados o enantiômero S (RA34) apresenta uma tendência a ser mais citotóxico do que o enantiômero R (RA33), sendo esta diferença significativa apenas na linhagem HL 60 Bcl-2 ($p < 0,05$, teste *T-Student*). A substância RA36 apresentou atividade apenas nas linhagens HL 60 e Jurkat, enquanto seu enantiômero RA35 não apresentou atividade significativa em nenhuma linhagem. Estes dados demonstram o forte caráter isômero dependente dessa classe de substâncias, apresentando os isômeros S uma maior atividade biológica. Também é importante ressaltar que substâncias que apresentam o mesmo grupamento nitrofenox ligado a um grupo éter (RA02, RA08, RA09, RA13 e RA15) não apresentaram atividade citotóxica relevante, denotando a importância dos grupamentos Boc (Tert-Butil) e o anel de oxazolidina nesta nova classe de compostos. A linhagem HL 60 Bcr.Abl demonstrou ser a mais resistente a todas as substâncias, incluindo o controle de cisplatina, e as substâncias RA33 e RA34 reduziram ambas aproximadamente 50% da viabilidade celular na concentração de 50 µM. Esta concentração apesar de superior às encontradas para fármacos de uso clínico é compatível às concentrações encontradas em estudos recentes de identificação de novos compostos com atividade citotóxica em células tumorais e avaliação da sua relação de estrutura-atividade (Chandrappa et al, 2008; Prasad et al, 2009; Ananda Kumar et al, 2009). As ponderações sobre uma possível relação de estrutura atividade levou a eleição das substâncias RA33, RA34, RA35 e RA36 como as substâncias promissoras para escolhas de um composto ligante, ou Hit passível de ser melhorado quimicamente e chegar a um composto protótipo.

A comparação entre as atividades citotóxicas em diferentes linhagens para cada uma das substâncias pôde ser feita através da determinação da IC₅₀. As substâncias

RA33, RA34 e RA36 apresentaram atividade concentração-dependente nas linhagens, HL 60 e Jurkat. Na linhagem HL 60, os enantiômeros RA35 e RA36, mostraram diferenças relevantes nas concentrações de IC_{50} , apresentando a substância RA36 uma concentração de $75,25 \pm 3,82 \mu M$ e a substância RA35 valor superior a $100 \mu M$, independentemente da linhagem. Os enantiômeros RA33 e RA34 apresentaram valores de IC_{50} significativamente diferentes com concentrações de $44,82 \pm 5,30 \mu M$ e $12,22 \pm 2,13 \mu M$, respectivamente, comprovando ser a atividade destas substâncias isômero-dependente. Uma observação importante é que a substituição do grupamento hidroxila presente no composto RA36 pelo grupo nitro presente no composto RA34 levou a um aumento de seis vezes na atividade citotóxica, demonstrando o potencial químico desta classe apesar de todas as substâncias terem apresentado valores de IC_{50} superiores aos encontrados na cisplatina ($1,79 \pm 1,62 \mu M$). É importante ressaltar que as diferenças encontradas entre os valores da triagem e os valores de IC_{50} podem ser explicados pelos diferentes modos de preparação dos compostos e quantidade final de dimetilsulfóxido.

A atividade das substâncias para a linhagem Jurkat foi semelhante ao perfil de atividade na linhagem HL 60, porém as concentrações foram superiores nas linhagens que expressavam ectopicamente proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 e Bcl- X_L . O enantiômero RA33 apresentou valores de IC_{50} superiores a $100 \mu M$, nas linhagens HL 60 Bcl-2 e HL 60 Bcl- X_L . O enantiômero RA34, apresentou perda da atividade citotóxica na linhagem HL 60 Bcl-2 (>100) quando comparada à HL 60 ($12,22 \pm 2,13 \mu M$), porém não houve mudança significativa quando comparado à linhagem HL 60 Bcl- X_L . A substância RA36 apresentou um comportamento semelhante a RA34, mantendo o perfil citotóxico na linhagem HL 60 Bcl- X_L , mas perdendo a atividade na linhagem HL 60 Bcl-2, sugerindo uma modulação desta via pelas substâncias. As proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl- X_L regulam o potencial de membrana bem como a homeostase das mitocôndrias e do retículo endoplasmático, além de interferirem no crescimento celular por gerarem um aumento de células em G0, o que contribui para o atraso no ciclo celular, porém fenômenos específicos têm sido relatados em diferentes tipos de tumores (Vander Heiden & Thompson, 1999; Janumyan et al, 2003).

Em células normais, Bcl-2 se associa preferencialmente com Bax, enquanto Bcl- X_L é o alvo preferencial de Bak, quando essas proteínas pró-apoptóticas se ligam às anti-apoptóticas elas criam poros nas membranas da mitocôndria e levam a liberação de proteínas pró-apoptóticas no citoplasma (Citocromo C, Apaf-1 e AIF) ocasionando a morte celular por apoptose (Willis et al, 2005). Embora Bax e Bak circunstancialmente

apresentem as mesmas funções, existem diferenças que influenciam no processo de regulação de vida e morte celular (Vander Heiden & Thompson, 1999; Janumyan et al, 2003). Essas diferenças residem, principalmente, na distribuição destas proteínas nas células, sendo a proteína Bax amplamente distribuída no citoplasma e a proteínas Bak associada à membrana externa da mitocôndria e do retículo endoplasmático (Willis et al, 2005). Após um estímulo citotóxico as proteínas Bax mudam sua conformação e são translocadas para as membranas da mitocôndria e do retículo endoplasmático, onde vão formar canais que levam a permeabilização da membrana (Hengartner, 2000; Wei et al, 2001; Willis et al, 2005). Com base nos dados das diferentes IC_{50} s dos enantiômeros RA33 e RA34 para a inibição da proliferação das linhagens HL 60 e HL 60 Bcl-2, e na similaridade das IC_{50} s entre a linhagem HL 60 e HL 60 Bcl- X_L , levantamos a hipótese de que o sinal de morte gerado por essas substâncias vem da mobilização e translocação da proteína Bax, possivelmente com o envolvimento da via apoptótica mitocondrial no mecanismo de morte destas células. Estudos para analisar a expressão e translocação de proteínas da família Bcl-2 serão necessários para confirmação desta hipótese.

O achado na linhagem HL60 Bcl-2 é relevante porque a super expressão de Bcl-2 tem sido associada a diversos tipos de câncer e também é um dos principais fatores de resistência a quimioterápicos através da supressão de estímulos apoptóticos e prevenção da morte celular por apoptose (Huang, 2000). Já os dados encontrados na linhagem HL 60 Bcl- X_L são interessantes devido ao envolvimento da proteína Bcl- X_L em processos de metástases em cânceres de mama, dado a seu papel na resistência a morte por amorfose (morte celular programada que ocorre a após ruptura do citoesqueleto de actina), esta premissa pode sinalizar para uma possível ação anti-metastática da substância RA34 dado que a expressão ectópica da proteína Bcl- X_L não alterou significativamente o seu efeito citotóxico (Fernandez et al, 2000; Martin et al, 2004).

Baseado nos resultados obtidos, os enantiômeros RA33 e RA34 foram eleitos como substâncias “Hit” (ligante do alvo selecionado, que é positivo no ensaio teste), com atividade citotóxica para as células tumorais. Estes compostos são passíveis de alterações na sua estrutura molecular para melhoramento da atividade farmacológica e construção de novos compostos “LEAD”. Um contraponto importante é que compostos que afetam células de origem mielocítica podem também afetar a funcionalidade de leucócitos normais, que são os reguladores e efetores da resposta imune adquirida, e

levar á grave imunossupressão causada por diversos medicamentos quimioterápicos (Makin & Hickman, 2000).

Atualmente, modelos *in vitro* com capacidade de prever a toxicidade de novos compostos e seu impacto nas células do sistema imune têm sido largamente utilizados como uma alternativa aos ensaios *in vivo* em etapas iniciais do desenvolvimento de novas substâncias (Souza-Fagundes et al, 2002; Carfi et al, 2007). Desta forma, para comprovar se a citotoxicidade das substâncias RA33 e RA34 estava relacionada ao seu potencial antitumoral ou a uma citotoxicidade inespecífica, foram realizados experimentos utilizando-se um modelo de células normais. Desta forma, foram utilizadas as células mononucleares do sangue periférico humano – PBMC, que compreendem linfócitos e monócitos que são fundamentais para a resposta imune adaptativa. Os experimentos foram procedidos com incubação de 48 horas, tempo igual ao realizado com as células tumorais.

Os resultados apresentados nos experimentos com PBMC demonstraram não haver diferenças significativas entre as IC_{50} dos enantiômeros RA33 ($105,51 \pm 68,67 \mu M$), RA34 ($64,83 \pm 13,12 \mu M$) após 48 horas de incubação. Contudo, é possível observar que as substâncias apresentaram menor toxicidade em relação ao controle de cisplatina ($28,07 \pm 17,22 \mu M$). Observou-se uma grande variabilidade entre os experimentos, já que os ensaios foram realizados com sangues de diferentes doadores. Esse resultado evidencia a grande variabilidade individual encontrada em ensaios realizados em humanos, evocando a idéia de farmacogenética onde a resposta um mesmo medicamento pode levar a um efeito terapêutico em uma paciente ou causar efeitos colaterais em outros (Pirmohamed, 2001). Quando os valores das IC_{50} dos compostos são comparados com aqueles encontrados para células HL 60, a substância RA34 é cinco vezes menos citotóxica no PBMC do que nas linhagens leucêmicas, sendo essa diferença para a substância RA33 de apenas duas vezes. Para a linhagem Jurkat, a diferença encontrada para o PBMC foi de quatro vezes para a substância RA34 e três vezes para RA33. Esses dados apontam o enantiômero S, RA34, como o mais promissor nos ensaios biológicos por apresentar uma maior diferença entre células normais que o seu enantiômero R. No campo de descoberta de novos fármacos uma maior diferença entre atividade citotóxica em células tumorais e normais é fundamental quando se trata de um novo protótipo ou para uma nova geração de substâncias similares, o que denota o caráter inovador dessas moléculas (Carfi et al, 2007). Apesar

da comparação entre os experimentos com células normais e tumorais evidenciar uma interessante diferença para os novos compostos, a diferença presente para a cisplatina foi de 15 vezes para HL 60 e doze vezes para Jurkat quando comparados com PBMC, o que lança um desafio para a química farmacêutica de sintetizar uma nova geração de compostos que amplie essa margem para a realização dos testes em animais.

Ademais, estes enantiômeros também foram avaliados em outras linhagens de diferentes tumores humanos e linhagens de células não tumorais murinas. Em células humanas, o enantiômero RA34 reduziu a viabilidade celular em linhagem de tumor de mama (MCF-7) com IC_{50} de $29,07 \pm 14,55 \mu M$, em linhagem de carcinoma renal (TK-10) com valor de IC_{50} de $40 \mu M$ e em linhagem de melanoma (UACC) com valor de IC_{50} de $22,78 \pm 3,24 \mu M$. Já em células murinas normais como BHK-21 (células dos rins) e CHO (células dos ovários), os enantiômeros RA33 e RA34 apresentaram baixa citotoxicidade com valores de IC_{50} superiores a $100 \mu M$. Estes dados estão apresentados no Apêndice 3 e foram obtidos a partir da colaboração com o Laboratório de Substâncias Antitumorais – UFMG e Laboratório de Química de Produtos Naturais – FIOCRUZ.

A maioria dos medicamentos quimioterápicos utilizados regularmente na clínica induz prioritariamente morte celular por apoptose (Hickman, 1992; Makin & Hickman, 2000). É amplamente divulgado que células tumorais apresentam aberrações na expressão de proteínas anti-apoptóticas, que confere a essas células resistência a morte celular apesar de terem perdido o controle de divisão celular. (Koeffler et al, 1986; Nora et al, 1999; Fernandez et al, 2000). Publicações que ressaltam o potencial pró-apoptótico das substâncias e, por conseguinte, se propõem eliminar essas células através da restauração das vias apoptóticas tem grande espaço nos periódicos da área (Souza-Fagundes, 2003; Ferraz et al, 2009).

Para averiguar se o fenômeno de apoptose foi desencadeado pelo tratamento com os novos compostos, avaliaram-se inicialmente os eventos nucleares que são característicos do final da apoptose. Primeiramente, foi avaliada a presença da fragmentação do DNA celular por meio da quantificação do conteúdo de DNA sub-diplóide após o tratamento com as substâncias teste nas células. Esta análise pode ser realizada por marcação como PI e análise por citometria de fluxo (Nicoletti et al, 1991; Nagata, 2000). Esta técnica também permite fazer inferências com relação ao ciclo

celular. As análises dos resultados gerados foram representadas em histogramas que em células normais geralmente apresentam um perfil com dois picos distintos separados por uma região de platô, no formato da letra “M”, que representam o ciclo celular. O primeiro pico representa as células na fase G0/G1, quiescência e início da divisão, o platô indica as células que estão na fase S, síntese e replicação de DNA, e o último pico representa a fase G2/Mitose, fase final e divisão. Células normais que estão nas fases “G0” e “G1” apresentam conteúdo diplóide de DNA (2n) e células nas fases “G2” e mitose apresentam duas vezes o conteúdo normal de DNA (4n), porém células apoptóticas, apresentam conteúdo de DNA sub-diplóide, ou seja, menor do que encontrado em “G0” como resultado do fenômeno de fragmentação de DNA (Nicoletti et al, 1991)

As substâncias RA34 e RA33 induziram a fragmentação de DNA de maneira concentração dependente na linhagem HL 60 após 24 horas de tratamento. Apesar de não haver diferenças significativas entre o conteúdo de DNA sub-diplóide observado após tratamento com as substâncias RA33 e RA34, o enantiômero S apresentou uma redução substancial de células na fase S e G2/Mitose, atividade esta característica de substâncias que agem durante a divisão celular, gerando dano do DNA e conseqüentemente induzindo apoptose (Gonzalez et al, 2001; Karpinich et al, 2002). O perfil do histograma é um forte indicativo de atividade preferencial para células em divisão celular, a primeira e principal estratégia para descoberta de novas substâncias (Goodman et al, 1984; Gibbs, 2000). Uma observação relevante é que o pico característico de células da fase G0/G1 foi preservado nos tratamentos com ambas os enantiômeros, o que não foi observado no controle de cisplatina. A cisplatina tem como mecanismo de ação a ligação a moléculas de DNA, inibindo assim a transcrição gênica e a replicação celular, induzindo apoptose em células em qualquer fase do ciclo. As substâncias não induziram fragmentação de DNA na linhagem Jurkat no tempo de 24 horas. Essa maior resistência á apoptose da linhagem Jurkat em comparação à HL 60 também foi encontrada no trabalho de Kizawa e colaboradores (Kizawa et al, 2006). Um estudo realizado por Karpinich e colaboradores demonstrou que a linhagem Jurkat não expressa corretamente duas proteínas pró-apoptóticas P53 e Bax, proteínas fundamentais para indução de apoptose desencadeada por dano no DNA, o que justifica a maior resistência a fragmentação de DNA mediado por substâncias citotóxicas após período de 24 horas (Karpinich et al, 2006). A linhagem HL 60 apresenta grandes

depleções no gene de p53, não expressando também a proteína p53, porém expressa normalmente a proteína Bax, principal proteína pró-apoptótica da família Bcl-2, que transloca o sinal de morte para a mitocôndria, desencadeando a liberação do citocromo C que culmina na ativação das caspases 9 e 3, e finalmente, apoptose. (Koeffler et al, 1986; Shimizu & Pommier, 1997; Brumatti et al, 2003). Esses dados, tomados em conjunto com os de citotoxicidade, apontam para uma atividade pró-apoptótica dependente da proteína Bax e ativação da via intrínseca da apoptose pelos compostos RA33 e RA34, o que explica os valores superiores de IC₅₀ encontrados na linhagem HL 60 Bcl-2 quando comparados com a linhagem HL 60 neste trabalho.

O processo de fragmentação de DNA é desencadeado pelas enzimas CAD (DNAase Ativada por Caspase) que são ativadas pelas proteases efetoras da apoptose, como caspase 3, e levam a degradação do DNA em fragmentos de aproximadamente 180 pares de bases (Nagata, 2000). Logo após um sinal pró-apoptótico, as caspases iniciadoras, tais como 8, 9 e 10 são ativadas. Por sua vez, as caspases iniciadoras ativam as caspases efetoras, tais como caspase 3, 6 e 7 que são responsáveis pela maioria das alterações morfológicas relacionadas ao fenômeno de apoptose (Wang et al, 2005). A inibição dessas proteases por ferramentas experimentais tais como a substância Z-VAD-FMK leva ao bloqueio da morte por apoptose (Van Noorden, 2001). Para avaliar se o processo de fragmentação de DNA desencadeado pelas substâncias RA33 e RA34 tinha relação com a ativação de caspases, as células da linhagem HL 60 foram previamente tratadas com Z-VAD-FMK, um inibidor inespecífico de caspases. Como esperado, as células tratadas com enantiômeros RA33 e RA34 apresentaram índices superiores a 50% de fragmentação de DNA na concentração de 50µM, porém os grupos pré-tratados com o Z-VAD-FMK mostraram níveis de conteúdo sub-diplóide semelhantes ao controle de DMSO. Esse dado indica que a fragmentação de DNA induzida pelos enantiômeros RA33 e RA34 depende da ativação das caspases no interior da célula. Portanto, os dois compostos induzem morte celular por ativação da via clássica da apoptose, sendo sua atividade caspase-dependente.

Outra característica nuclear importante encontrada na apoptose é a condensação de DNA que também é dependente de caspase (Oberhammer et al, 1994). A avaliação dos núcleos celulares através da dupla marcação com Hoechst e PI revelou células apoptóticas quando submetidas ao tratamento com os enantiômeros RA33 e RA34. Ambos os marcadores se ligam ao DNA para emitir fluorescência (REF sigma), porém

existem duas diferenças importantes entre elas: (1) na primeira, esses marcadores emitem fluorescência em comprimentos de onda distintos; (2) o Hst é permeável a membrana plasmática, marcando livremente quaisquer células da cultura o que não acontece com o PI que é capaz de entrar apenas nas células cuja membrana celular não esteja mais íntegra. Essa característica é utilizada para diferenciar as células apoptóticas de células necróticas (Belloc et al, 1994).

Durante a avaliação das lâminas não foi observado aumento no processo de condensação ou fragmentação de DNA em células tratadas com o veículo de DMSO, sendo encontradas poucas células mortas, característica normal de culturas de células não aderentes. Os enantiômeros RA33 e RA34 induziram condensação de DNA na linhagem HL 60 após o tempo de 24 horas de tratamento na maioria das células no campo avaliado, havendo também um aumento no número de células com dupla marcação e com o DNA fragmentado, indicando a presença de células em apoptose tardia (Thuret et al, 2003). As células tratadas com a cisplatina apresentaram, em sua maioria, dupla marcação e com grande número de células com o DNA fragmentado, dados coerentes com os encontrados no ensaio de fragmentação de DNA e anexina V/PI pela citometria de fluxo que indicam apoptose tardia (Thuret et al, 2003).

No processo de morte por apoptose, a degeneração celular leva a alterações celulares peculiares ao nível nuclear e citoplasmático. Uma destas alterações inclui a exposição das fosfatidilserinas do folheto interno da membrana citoplasmática para o exterior celular. Desta forma, células apoptóticas, bem como restos celulares podem ser fagocitados por células do sistema imune, sendo a externalização das fosfatidilserinas o principal mecanismo de sinalização celular para esse processo (Fadok et al, 1998; Schlegel & Williamson, 2001). A inversão do folheto pelos fosfolípidos de membrana é gerado pela destruição de proteínas envolvidas na manutenção das fosfatidilserinas no folheto interno pela ação das proteases caspases, e por isso, podendo ser prevenidos pela super-expressão de proteína anti-apoptóticas tais como Bcl-2 (Martin et al, 1995). A avaliação da exposição de fosfatidilserinas pode ser utilizada na identificação de células em processo de apoptose sendo esse fenômeno anterior aos fenômenos nucleares descritos anteriormente. A perda de integridade da membrana plasmática é também uma das características de células que se encontram em apoptose tardia ou necrose, se constituindo em marcadores importantes para diferenciar os diferentes tipos de morte celular. Os protocolos de análise baseiam-se na capacidade da anexina V se ligar na

fosfatidilserinas do folheto externo das células apoptóticas e em células necróticas. Para diferenciação entre células apoptóticas e necróticas, ainda é utilizado o iodeto de propídeo que marca o núcleo de células que tenham perdido a integridade da membrana, como células em necrose ou apoptose tardia (Martin et al, 1995). Desta forma, nos experimentos realizados as células sem marcação são consideradas vivas (-AV/-IP), aquelas marcadas anexina-V e iodeto de propídeo negativo são consideradas em apoptose precoce (+AV/-IP), células marcadas anexina-V positivo e Iodeto de Propídeo Positivo são consideradas em apoptose tardia (+AV/+IP) e, finalmente, células marcadas somente com iodeto de propídeo são consideradas necróticas (-AV/+IP). Após 24 horas de incubação, os enantiômeros aumentaram significativamente o número de células duplo marcadas, o que é característica de células em apoptose tardia, dado esse que confere com aqueles encontrados nos ensaios de fragmentação de DNA. Alguns autores consideram a dupla marcação como sendo indicativo de células mortas ou em necrose, porém os resultados demonstram que após tratamento de células HL 60 com a cisplatina houve a ocorrência de dupla marcação, de maneira similar ao observado após tratamento com RA33 e RA34 em células HL 60 (Bartkowiak et al, 1999; Freire et al, 2003). Como a cisplatina é um fármaco que sabidamente induz apoptose em células HL 60 é razoável sugerir que é este o mecanismo envolvido na citotoxicidade dos dois enantiômeros (He & Zhang, 2001; Floros et al, 2003; Cipak et al, 2003). Novos experimentos são necessários para determinação do tempo de inversão das fosfatidilserinas no folheto interno para o externo das células tratadas, porém os dados encontrados corroboram com a atividade pró-apoptótica dessas moléculas.

Os principais fenômenos que caracterizam a apoptose são desencadeados devido a ativação das caspases, reguladoras e efetoras, sendo a mais importante a proteína efetora caspase-3, que reconhece e cliva especificamente uma sequência de aminoácidos, Asp-Glu-Val-Asp, sendo ativada tanto pela via intrínseca quanto pela via extrínseca da apoptose. Essas enzimas mantêm-se normalmente no citoplasma das células sob a forma de pró-enzima e são especialmente ativadas na presença de algum estímulo pró-apoptótico. Um dos principais alvos da Caspase-3 é a ICAD (inibidor da caspase-activated DNase) que quando clivada libera CAD (caspase-activated DNase), que age sobre o DNA internucleossômico causando a sua fragmentação, fenômeno presente em células tratadas com os enantiômeros RA33 e RA34. A avaliação da ativação de caspase-3 foi realizada utilizando método fluorescência utilizando o substrato Z-DEVD-AMC, que quando clivado pela forma ativa da caspase-3 libera uma

substância fluorescente AMC que poder ser quantificada, sendo sua concentração proporcional a quantidade de substrato clivado pela enzima. Através desse método foi possível comparar as células tratadas com diferentes substâncias e compará-las ao controle de células. No tempo de 24 horas, na concentração de 50 μ M, a substância RA34 apresentou o maior aumento na atividade da enzima caspase-3, sendo quatro vezes superior ao controle DMSO enquanto a substância RA33 apresentou um valor duas vezes e meio superior ao encontrado no controle de DMSO. Ambos os valores não apresentaram diferenças significativas com o controle de cisplatina.

Com base nesses dados é possível que os compostos RA33 e RA34 induzam a ativação de caspase-3, provavelmente pela ativação da via intrínseca da apoptose, causando a exposição de fosfatidilserinas e induzindo a fragmentação do DNA em células HL 60. Portanto, esse trabalho apresenta a descoberta de um novo composto com atividade citotóxica e pró-apoptótica.

7.0. RESUMO DOS RESULTADOS

As duas estratégias de triagem de substâncias sintéticas, triagem aleatória e triagem direcionada, utilizadas para identificação de compostos bioativos demonstraram ser úteis para o processo de inovação farmacêutica.

A partir da triagem aleatória de 38 substâncias sintéticas foi possível identificar quatro enantiômeros de estrutura química inédita, com atividade citotóxica para células leucêmicas. Dos quatro enantiômeros identificados, dois denominados RA33 e RA34, apresentaram maior citotoxicidade.

Quando avaliados em células mononucleares do sangue periférico, RA33 e RA34 apresentaram menor toxicidade quando comparados às células leucêmicas, semelhante a cisplatina, fármaco de uso clínico. Estes achados caracterizam estes enantiômeros como compostos “hit”, que podem ser quimicamente modificados e aperfeiçoados.

O efeito citotóxico dos dois compostos está associado à indução da morte por apoptose, especificamente pela ativação da via clássica (caspase-dependente), possivelmente pela ativação da via intrínseca da apoptose.

8.0. CONCLUSÃO

Este estudo identificou dois enantiômeros inéditos da classe dos éteres alquil-glicídicos com atividade citotóxica e pró-apoptótica a partir da triagem aleatória de substâncias sintéticas. Estes compostos serão utilizados como ferramentas farmacológicas e modelo para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais.

9. PERSPECTIVAS

Este trabalho abre duas grandes perspectivas científicas, sendo uma na área de química farmacêutica e a outra na farmacologia. Na área de química farmacêutica, abre-se perspectiva para modificações químicas estruturais dos enantiômeros RA33 e RA34, visando a síntese de uma nova geração compostos com melhor atividade citotóxica para células tumorais, com menor citotoxicidade para células normais. Espera-se que nos próximos dois anos uma nova geração de compostos esteja pronta para os testes farmacológicos.

No campo da farmacologia, futuras pesquisas trabalharão em duas frentes: a primeira frente são os estudos *in vitro*, que irão testar os diferentes compostos para determinar a relação de estrutura atividade das moléculas e encontrar o melhor protótipo para os testes em animais. Outro ponto é a caracterização do mecanismo pela qual a apoptose é desencadeado através de análises da vias intrínsecas, extrínsecas e estresse do retículo endoplasmático ou outras vias de morte que possam estar envolvidas. A determinação do mecanismo de ação também será um grande desafio para os estudos *in vitro*, dado o ineditismo das moléculas, porém avaliações sobre o impacto em moléculas da família Bcl-2, topoisomerases, polimerases e telomerases sejam os primeiros alvos de análise. A segunda frente são os estudos *in vivo*, que dará seqüência aos ensaios pré-clínicos dessa nova classe e determinará a atividade antitumoral desses compostos em modelos animais de tumores. É importante ressaltar que durante essa fase os estudos toxicológicos deverão testar a segurança destes compostos nos animais e em diferentes modelos.

10. REFERÊNCIAS

- Alnemri, E.S.; Livingston, D.J.; Nicholson, D.W.; Salvesen, G.; Thornberry, N.A.; Wong, W.W.; Yuan, J.. Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature. **Cell**, 87(2): 171-171, 1996.
- Ananda, C. S.; Prasad, S.; Vinaya, K.; Chandrappa, S.; Thimmegowda, N.; Ranganatha, S.; Swarup, S.; Rangappa, K.. Synthesis and antiproliferative activity of substituted diazaspiro hydantoins: a structure–activity relationship study. **Investigational New Drugs**, 27(2): 131-139, 2009
- Ambrosini, G.; Adida, C.; Altieri, D. C.. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. **Nature Medicine**, 3(8): 917-21, 1997.
- Baguley, B. C.; Marshall E. S.. In vitro modelling of human tumour behaviour in drug discovery programmes. **European Journal of Cancer**, 40(6): 794-801, 2004.
- Bajorath, J.. Integration of virtual and high-throughput screening. **Nature Reviews Drug Discovery**, 1(11): 882-894, 2002.
- Bartkowiak, D.; Hogner, S.; Baust, H.; Nothdurft, W.; Rottinger, E. M.. Comparative analysis of apoptosis in HL 60 detected by annexin-V and fluorescein-diacetate. **Cytometry**, 37(3): 191-6, 1999.
- Beraldo, H.. Semicarbazonas e tiosemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos, **Química Nova**, 27(3):461-471, 2004 .
- Belloc, F.; Dumain, P.; Boisseau, M. R.; Jalloustre, C.; Reiffers, J.; Bernard, P.; Lacombe, F.. A flow cytometric method using Hoechst 33342 and propidium iodide for simultaneous cell cycle analysis and apoptosis determination in unfixed cells. **Cytometry**, 17(1): 59-65, 1994.
- Bleicher, K.H.; Bohm, H.J.; Muller, K.; Alanine, A.I.. Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. **Nature Reviews Drug Discovery**, 2(5): 369-378, 2003.
- Braña, M.; Sánchez-Migallón, A.. Anticancer drug discovery and pharmaceutical chemistry: a history. **Clinical and Translational Oncology**, 8(10): 717-728, 2006.
- Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**, 2009.

Brumatti, G.; Weinlich, R.; Chehab, C. F.; Yon, M.; Amarante-Mendes, G. P.. Comparison of the anti-apoptotic effects of Bcr-Abl, Bcl-2 and Bcl-x(L) following diverse apoptogenic stimuli. **FEBS Letters**, 541(1-3): 57-63, 2003.

Butcher, E. C.. Can cell systems biology rescue drug discovery? **Nature Reviews Drug Discovery**, 4(6): 461-467, 2005.

Carfi, M.; Gennari, A.; Malerba, I.; Corsini, E.; Pallardy, M.; Pieters, R.; Van Loveren, H.; Vohr, H. W.; Hartung, T.; Gribaldo, L.. In vitro tests to evaluate immunotoxicity: a preliminary study. **Toxicology**, 229(1-2): 11-22, 2007.

Carmeliet, P.; Jain, R.K.. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**, 407(6801): 249-257, 2000.

Chandrappa, S.; Benaka Prasad, S.; Vinaya, K.; Ananda Kumar, C.; Thimmegowda, N.; Rangappa, K.. Synthesis and in vitro antiproliferative activity against human cancer cell lines of novel 5-(4-methyl-benzylidene)-thiazolidine-2,4-diones. **Investigational New Drugs**, 26(5): 437-444, 2008.

Chari, N.; Pinaire, N.; Thorpe, L.; Medeiros, L.; Routbort, M.; McDonnell, T.. The p53 tumor suppressor network in cancer and the therapeutic modulation of cell death. **Apoptosis**, 14(4): 336-347, 2009.

Cheng, X.; Hung, M.C.. Hung. Breast cancer brain metastases. **Cancer and Metastasis Reviews**, 26(3): 635-643, 2007.

Cipak, L.; Rauko, P.; Miadokova, E.; Cipakova, I.; Novotny, L.. Effects of flavonoids on cisplatin-induced apoptosis of HL-60 and L1210 leukemia cells. **Leukemia Research**, 27(1): 65-72, 2003.

Desjardins, P.; Ledoux S.. The Role of Apoptosis in Neurodegenerative Diseases. **Metabolic Brain Disease**, 13(2): 79-96, 1998.

Dias, D. F. ; Roux, C. ; Durand, P. ; Iorga, B. ; Badet-Denisot, M. A. ; Badet, B. ; Alves, R. J.. Design, synthesis and in vitro evaluation on glucosamine-6P synthase of aromatic analogs of 2-aminoheptitols-6P. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 21(4), 680-685, 2010.

Dobrovic, A.; Peters, G.B.; Ford, J.H.. Review: Molecular analysis of the Philadelphia chromosome. **Chromosoma**, 100(8): 479-486, 1991.

Drexler, H.G.; Quentmeier, H.; MacLeod, R.A.F.. Cell line models of leukemia. **Drug Discovery Today: Disease Models**, 2(1): 51-56, 2005.

Earnshaw, W.C.; Martins, L.M.; Kaufmann, S.H.. Mammalian caspases: Structure, Activation, Substrates, and Functions During Apoptosis. **Annual Review of Biochemistry**, 68: 383-424, 1999.

Fadok, V.A.; Bratton, D.L.; Frasch, S.C.; Warner, M.L.; Henson, P. M.. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. **Cell Death and Differentiation**, 5(7): 551-62, 1998.

Falconnet, D.; Csucs, G.; Grandin, M.H.; Textor, M.. Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays. **Biomaterials**, 27(16): 3044-3063, 2006.

Fernandez, Y.; Espana, L.; Manas, S.; Fabra, A.; Sierra, A.. Bcl-xL promotes metastasis of breast cancer cells by induction of cytokines resistance. **Cell Death and Differentiation**, 7(4): 350-9, 2000.

Ferraz, K.S.; Ferandes, L.; Carrilho, D.; Pinto, M.C.X.; Leite, M.F.; Souza-Fagundes, E.M.; Speziali, N.L.; Mendes, I.C.; Beraldo, H.. 2-Benzoylpyridine-N(4)-tolyl thiosemicarbazones and their palladium(II) complexes: cytotoxicity against leukemia cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 17(20): 7138-44, 2009.

Fesik, S.W.. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. **Nature Reviews Cancer**, 5(11): 876-885, 2005.

Fischer, U.; Schulze-Osthoff, K.. Apoptosis-based therapies and drug targets. **Cell Death and Differentiation**, 12 Suppl 1: 942-61, 2005.

Fleischer, A.; Ghadiri, A.; Dessauge, F.; Duhamel, M.; Rebollo, M.P.; Alvarez-Franco, F.; Rebollo, A.. Modulating apoptosis as a target for effective therapy. **Molecular Immunology**, 43(8): 1065-79, 2006.

Floros, K.V.; Thomadaki, H.; Lallas, G.; Katsaros, N.; Talieri, M.; Scorilas, A.. Cisplatin-induced apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells: differential expression of BCL2 and novel apoptosis-related gene BCL2L12. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1010: 153-8, 2003.

Fokas, E.; Engenhardt-Cabillic, R.; Daniilidis, K.; Rose, F.; An, H.X.. Metastasis: the seed and soil theory gains identity. **Cancer and Metastasis Reviews**, 26(3): 705-715, 2007.

Freire, A.C.; Assis, C.F.; Frick, A.O.; Silva Melo, P.; Haun, M.; Aoyama, H.; Duran, N.; Sauer, M.M.; Kallas, E.G.; Ferreira, C.V.. Influence of protein phosphatase inhibitors on HL60 cells death induction by dehydrocrotonin. **Leukemia Research**, 27(9): 823-9, 2003.

Fu, Y.; Li, S.; Zu, Y.; Yang, G.; Yang, Z.; Luo, M.; Jiang, S.; Wink, M.; Efferth, T.. Medicinal chemistry of paclitaxel and its analogues. **Current Medicinal Chemistry**, 16(30): 3966-85, 2009.

Gazzinelli, G.; Katz, N.; Rocha, R.S.; Colley, D.G.. Immune responses during human schistosomiasis mansoni. X. Production and standardization of an antigen-induced mitogenic activity by peripheral blood mononuclear cells from treated, but not active cases of schistosomiasis. **Journal Immunology**, 130(6): 2891-5, 1983.

Gibbs, J.B.. Mechanism-based target identification and drug discovery in cancer research. **Science**, 287(5460): 1969-73, 2000.

Gonzalez, V.M.; Fuertes, M. A.; Alonso, C.; Perez, J. M.. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? **Molecular Pharmacology**, 59(4): 657-63, 2001.

Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica, 11^a edição, McGraw-Hill Interamericana do Brasil, Rio de Janeiro, pp. 1191-1194, 2006.

Green, D.R.; Reed, J.C.. Mitochondria and apoptosis. **Science**, 281(5381): 1309-12, 1998.

Gupta, P.B.; Onder, T.T.; Jiang, G.; Tao, K.; Kuperwasser, C.; Weinberg, R.A.; Lander, E.S.. Identification of Selective Inhibitors of Cancer Stem Cells by High-Throughput Screening. **Cell**, 138(4): 645-659, 2009.

He, D.M.; Zhang H.. Effect of Inhibition of Telomerase on Cisplatin-Induced Apoptosis in HL-60 Cells. **Journal of experimental hematology**, 9(3): 215-219, 2001.

Hendzel, M. J.; Nishioka, W. K.; Raymond, Y.; Allis, C. D.; Bazett-Jones, D. P.; Th'ng, J.P.. Chromatin condensation is not associated with apoptosis. **The Journal of biological chemistry**, 273(38): 24470-8, 1998.

Hengartner, M.O.. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, 407(6805): 770-776, 2000.

Hickman, J.A.. Apoptosis induced by anticancer drugs. **Cancer and Metastasis Reviews**, 11(2): 121-139, 1992.

Huang, Z.. Bcl-2 family proteins as targets for anticancer drug design. **Oncogene**, 19(56): 6627-31, 2000.

Janumyan, Y.M.; Sansam, C.G.; Chattopadhyay, A.; Cheng, N.; Soucie, E.L.; Penn, L.Z.; Andrews, D.; Knudson, C.M.; Yang, E.. Bcl-xL/Bcl-2 coordinately regulates apoptosis, cell cycle arrest and cell cycle entry. **The EMBO Journal**, 22(20): 5459-70, 2003.

Karpinich, N.O.; Tafani, M.; Rothman, R.J.; Russo, M.A.; Farber, J.L.. The course of etoposide-induced apoptosis from damage to DNA and p53 activation to mitochondrial release of cytochrome c. **The Journal of biological chemistry**, 277(19): 16547-52, 2002.

Karpinich N.O.; Tafani M.; Schneider T.; Russo M.A.; Farber J.L.. The course of etoposide-induced apoptosis in Jurkat cells lacking p53 and Bax. **Journal of Cellular Physiology**, 208(1): 55-63, 2006.

Kerr, J.F.; Wyllie, A. H.; Currie, A.R.. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, 26(4): 239-57, 1972.

Keseru, G.M.; Makara, G.M.. Hit discovery and hit-to-lead approaches. **Drug Discovery Today**, 11(15-16): 741-748, 2006.

Kizawa, Y.; Furuya, M.; Saito, K.; Masuko, T.; Kusama, T.. Effects of Dexamethasone and Aminophylline on Survival of Jurkat and HL-60 Cells. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, 29(2): 281-285, 2006.

Koeffler, H.P.; Miller, C.; Nicolson, M.A.; Ranyard, J.; Bosselman, R.A.. Increased expression of p53 protein in human leukemia cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 83(11): 4035-9, 1986.

Langer, T.; Hoffmann, R.; Bryant, S.; Lesur, B.. Hit finding: towards “smarter” approaches. **Current Opinion in Pharmacology**, 9(5): 589-593, 2009.

Lessene, G.; Czabotar, P.E.; Colman, P.M.. BCL-2 family antagonists for cancer therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, 7(12): 989-1000, 2008.

Liao, D.; Johnson, R.. Hypoxia: A key regulator of angiogenesis in cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, 26(2): 281-290, 2007.

Lombardino, J.G.; Lowe, J.A.. The role of the medicinal chemist in drug discovery - then and now. **Nature Reviews Drug Discovery**, 3(10): 853-862, 2004.

Makin, G.; Hickman, J.A.. Apoptosis and cancer chemotherapy. **Cell and Tissue Research**, 301(1): 143-152, 2000.

Martin, S.J.; Reutelingsperger, C.P.; McGahon, A.J.; Rader, J.A.; Van Schie, R.C.; LaFace, D.M.; Green, D.R.. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. **Journal of Experimental Medicine**, 182(5): 1545-56, 1995.

Martin, S.S.; Ridgeway, A.G.; Pinkas, J.; Lu, Y.; Reginato, M.J.; Koh, E.Y.; Michelman, M.; Daley, G.Q.; Brugge, J.S.; Leder, P.. A cytoskeleton-based functional genetic screen identifies Bcl-xL as an enhancer of metastasis, but not primary tumor growth. **Oncogene**, 23(26): 4641-4645, 2004.

Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A. et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, 83(11): 757-66, 1991.

Nagata, S.. Apoptotic DNA Fragmentation. **Experimental Cell Research**, 256(1): 12-18, 2000.

Nicoletti, I.; Migliorati, G.; Pagliacci, M. C.; Grignani, F.; Riccardi, C.. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Journal of Immunology Methods**, 139(2): 271-9, 1991.

Navone, N.M.; Labate, M.E.; Troncoso, P.; Pisters, L.L.; Conti, C.J.; Eschenbach, A.C.V.; Logothetis C.J.. p53 mutations in prostate cancer bone metastases suggest that selected p53 mutants in the primary site define foci with metastatic potential. **The Journal of urology**, 161(1): 304-308, 1999.

Oberhammer, F.A.; Hochegger, K.; Froschl, G.; Tiefenbacher, R.; Pavelka, M.. Chromatin condensation during apoptosis is accompanied by degradation of lamin A+B, without enhanced activation of cdc2 kinase. **Journal of Cell Biology**, 126(4): 827-37, 1994.

Pantel, K.; Brakenhoff, R.H.. Dissecting the metastatic cascade. **Nature Reviews Cancer**, 4(6): 448-456, 2004.

Pérez-Tomás R, Montaner B, L Esther, Soto-Cerrato V.. **Biochemical Pharmacology**, 66: 1447-1452, 2003.

Pirmohamed, M.. Pharmacogenetics and pharmacogenomics. **British Journal of Clinical Pharmacology**, 52(4): 345-7, 2001.

Prasad, B.S.; Vinaya, K.; Ananda Kumar, C.; Swarup, S.; Rangappa, K.. Synthesis of novel 6-fluoro-3-(4-piperidinyl)-1,2-benzisoxazole derivatives as antiproliferative agents: A structure–activity relationship study. **Investigational New Drugs**, 27(6): 534-542, 2009.

Schlegel, R. A.; Williamson, P.. Phosphatidylserine, a death knell. **Cell Death and Differentiation**, 8(6): 551-63, 2001.

Sellers, W. R.; Fisher, D. E.. Apoptosis and cancer drug targeting. **The Journal of clinical investigation**, 104(12): 1655-61, 1999.

Shimizu, T.; Pommier, Y.. Camptothecin-induced apoptosis in p53-null human leukemia HL60 cells and their isolated nuclei: effects of the protease inhibitors Z-VAD-FMK and dichloroisocoumarin suggest an involvement of both caspases and serine proteases. **Leukemia**, 11(8): 1238-44, 1997.

Souza-Fagundes, E. M.; Gazzinelli, G.; Parreira, G.G.; Martins-Filho, O.A.; Amarante-Mendes, G. P.; Correa-Oliveira, R.; Zani, C.L.. In vitro activity of labdane diterpene from *Alomia myriadenia* (Asteraceae): immunosuppression via induction of apoptosis in monocytes. **International Immunopharmacology**, 3(3): 383-92, 2003.

Souza-Fagundes, E.M.; Queiroz, A.B.; Martins Filho, O.A.; Gazzinelli, G.; Correa-Oliveira, R.; Alves, T.M.; Zani, C.L.. Screening and fractionation of plant extracts with antiproliferative activity on human peripheral blood mononuclear cells. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 97(8): 1207-12, 2002.

Thompson, C.B.. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science**, 267(5203): 1456-62, 1995.

Thuret, G.; Chiquet, C.; Herrag, S.; Dumollard, J.M.; Boudard, D.; Bednarz, J.; Campos, L.; Gain, P.. Mechanisms of staurosporine induced apoptosis in a human corneal endothelial cell line. **British Journal of Ophthalmology**, 87(3): 346 52, 2003.

Tuschl, H.; Schwab, C.E.. The use of flow cytometric methods in acute and long-term in vitro testing. **Toxicology in Vitro**, 19(7): 845-852, 2005.

Van Noorden, C.J.F.. The history of Z-VAD-FMK, a tool for understanding the significance of caspase inhibition. **Acta Histochemica**, 103(3): 241-251, 2001.

Vander Heiden, M.G.; Thompson, C.B.. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? **Nature Cell Biology**, 1(8): E209-16, 1999.

Vermes, I. Haanen, C.; Steffens-Nakken, H.; Reutellingsperger, C.. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **Journal of Immunological Methods**, 184(1): 39-51, 1995.

Vousden, K. H.; Lane D.P.. p53 in health and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 8(4): 275-283, 2007.

Wang, Z.B.; Liu, Y.Q.; Cui, Y.F.. Pathways to caspase activation. **Cell Biology International**, 29(7): 489-496, 2005.

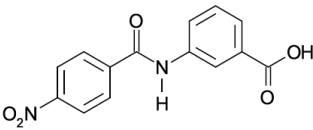
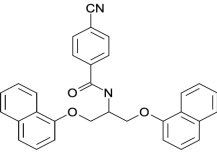
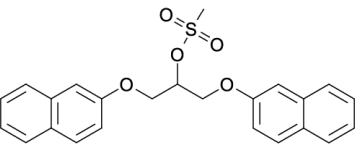
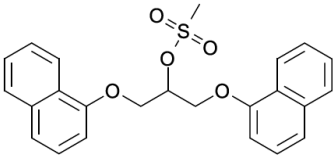
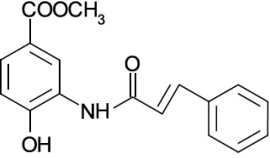
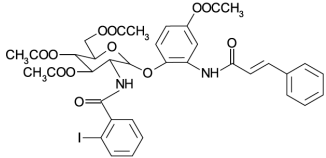
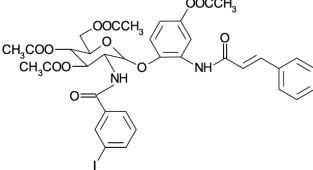
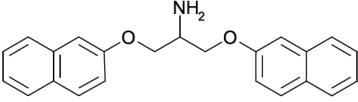
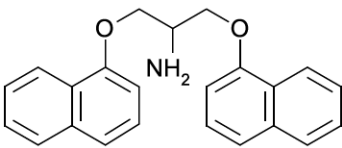
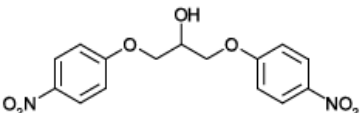
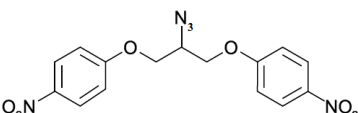
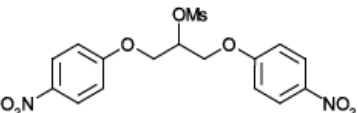
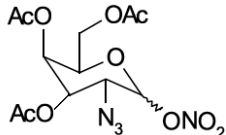
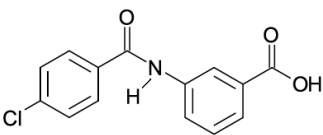
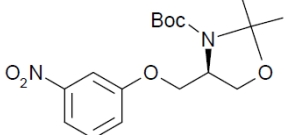
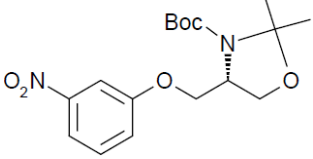
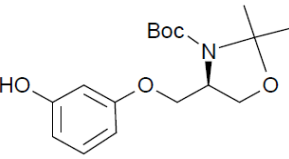
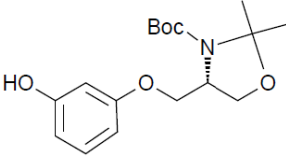
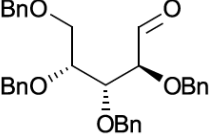
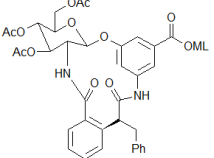
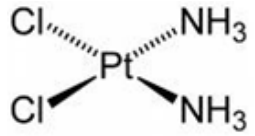
Wei, M.C.; Zong, W.X.; Cheng, E.H.; Lindsten, T.; Panoutsakopoulou, V.; Ross, A. J.; Roth, K.A.; MacGregor, G.R.; Thompson, C.B.; Korsmeyer, S.J.. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. **Science**, 292(5517): 727-30, 2001.

Willis, S.N.; Chen, L.; Dewson, G.; Wei, A.; Naik, E.; Fletcher, J.I.; Adams, J.M.; Huang, D.C.. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. **Genes & development**, 19(11): 1294-305, 2005.

APÊNDICE 1 – Substâncias Sintéticas da Química Farmacêutica

Tabela 2. Código, estrutura e peso molecular das substâncias químicas testadas pertencentes à biblioteca de substâncias sintéticas.

RA 01 - 649,21 g/mol	RA 02 - 195,17 g/mol	RA 03 - 521,57 g/mol
RA 04 - 278,05 g/mol	RA 05 - 264,19 g/mol	RA 06 - 507,53 g/mol
RA 07 - : 245,23	RA 08 - 334,27 g/mol	RA 09 - 397,34 g/mol
RA 10 - 448,49 g/mol	RA 11 - 425,43 g/mol	RA 12 - 590,66 g/mol
RA 13 - 412,33 g/mol	RA 14 - 419,42 g/mol	RA 15 - 291,22 g/mol
RA 16 - 337 g/mol	RA 17 - 542 g/mol	RA 18 - 231 g/mol

RA 19 – 286 g/mol	RA 20 – 472 g/mol	RA 21 – 422 g/mol
		
RA 22 – 434 g/mol	RA 23 – 297,31 g/mol	RA 24 - 814,58 g/mol
		
RA 25 – 814,58 g/mol	RA 26 - 343 g/mol	RA 27 - 331 g/mol
		
RA 28 - 334,27 g/mol	RA 29 – 259,30 g/mol	RA 30 - 337 g/mol
		
RA 31 - 419,42 g/mol	RA 32 - 275,69 g/mol	RA 33 -352,14 g/mol
		
RA 34 - 352,14 g/mol	RA 35 - 346,16 g/mol	RA 36 - 346,16 g/mol
		
RA 37 - 510,24 g/mol	RA 38 – 688 g/mol	Cisplatina - 300.05 g/mol
		

Os compostos representados pertencem à classe de éteres alquil-glicídicos (RA02, RA08, RA09, RA11, RA13, RA15, RA20, RA21, RA22, RA26, RA27, RA28, RA29, RA30, RA33, RA34, RA35 e RA 36), de derivados de carboidratos (RA01, RA03, RA06, RA12, RA14, RA17, RA24, RA25, RA31, RA37 e RA38), de derivados do ácido benzóico (RA16, RA18, RA19, RA23 e RA32) e compostos pertencentes a classes diversas (RA04, RA05, RA07 e RA10).

APÊNDICE 2 – Triagem inicial de substâncias sintéticas

Tabela 3. Efeito de compostos sintéticos na viabilidade de diferentes células leucêmicas

Substância	HL 60	HL60 Bcl-X _L	HL60 Bcl-2	HL60 Bcr.abl	Jurkat
Cisplatina	9,44 ± 4,88	34,88 ± 17,76	46,38 ± 11,68	96,77 ± 3,25	49,37 ± 5,76
RA01	88,12 ± 20,95	91,81 ± 15,05	94,43 ± 9,25	88,11 ± 23,69	78,86 ± 48,04
RA02	49,57 ± 22,68	89,53 ± 8,35	79,80 ± 14,67	93,06 ± 22,78	41,36 ± 24,91
RA03	81,21 ± 9,48	93,13 ± 5,39	90,16 ± 12,80	72,44 ± 22,53	72,21 ± 32,85
RA04	91,52 ± 13,64	93,95 ± 2,56	93,72 ± 9,78	93,67 ± 12,39	88,04 ± 25,23
RA05	86,86 ± 20,08	99,30 ± 2,29	98,83 ± 14,00	93,57 ± 14,53	81,09 ± 18,79
RA06	66,68 ± 12,44	84,47 ± 9,62	78,75 ± 1,65	63,29 ± 20,65	65,11 ± 8,11
RA07	107,73 ± 11,05	109,07 ± 6,50	100,56 ± 16,86	92,35 ± 18,11	83,89 ± 23,81
RA08	97,17 ± 15,60	107,14 ± 15,73	89,99 ± 7,85	98,18 ± 17,66	77,08 ± 19,39
RA09	81,05 ± 18,90	81,53 ± 16,68	80,91 ± 6,14	95,44 ± 8,43	104,44 ± 25,9
RA10	97,29 ± 13,03	100,11 ± 9,94	97,86 ± 3,73	102,2 ± 7,33	95,31 ± 22,99
RA11	71,99 ± 15,19	69,28 ± 8,97	72,85 ± 6,43	81,57 ± 5,66	79,84 ± 15,26
RA12	95,65 ± 11,80	93,81 ± 17,41	93,69 ± 3,10	104,65 ± 2,56	91,15 ± 13,07
RA13	81,70 ± 9,99	94,06 ± 16,89	87,40 ± 10,01	90,99 ± 4,63	84,71 ± 6,65
RA14	72,75 ± 12,15	83,70 ± 18,46	80,41 ± 9,04	91,10 ± 4,58	66,20 ± 0,94
RA15	105,41 ± 13,62	98,16 ± 12,90	95,06 ± 9,51	90,50 ± 9,58	88,99 ± 14,04
RA16	114,44 ± 6,54	101,40 ± 7,6	117,13 ± 22,85	109,71 ± 26,14	95,55 ± 19,67
RA17	107,07 ± 8,51	100,81 ± 10,03	106,44 ± 11,36	103,20 ± 28	81,48 ± 29,93
RA18	103,23 ± 11,91	101,30 ± 1,23	105,41 ± 6,86	100,57 ± 8,16	85,57 ± 18,56
RA19	92,39 ± 39,07	79,76 ± 33,31	103,5 ± 39,15	85,63 ± 29,95	75,08 ± 29,18
RA20	93,39 ± 17,81	82,41 ± 20,99	85,09 ± 25,70	87,41 ± 5,35	75,59 ± 17,19
RA21	126,62 ± 4,3	100,92 ± 7,41	119,19 ± 12,68	99,83 ± 22,62	95,84 ± 26,30
RA22	121,99 ± 5,58	104,79 ± 10,47	112,62 ± 9,52	88,66 ± 17,67	87,55 ± 17,31
RA23	119,39 ± 12,25	106,62 ± 5,65	124,60 ± 12,15	103,36 ± 33,70	90,21 ± 22,92
RA24	120,83 ± 21,04	111,40 ± 19,54	135,77 ± 40,43	109,34 ± 0,75	94,25 ± 4,46
RA25	106,02 ± 22,38	94,03 ± 9,29	126,07 ± 18,34	105,17 ± 25,61	84,31 ± 15,35
RA26	89,85 ± 21,58	95,18 ± 4,44	108,14 ± 7,39	93,16 ± 8,70	85,64 ± 19,41
RA27	89,72 ± 26,65	93,50 ± 2,57	114,63 ± 15,26	91,73 ± 3,37	85,84 ± 8,42
RA28	83,25 ± 26,37	86,41 ± 8,81	104,69 ± 8,98	78,44 ± 12,69	82,23 ± 4,61
RA29	96,71 ± 24,16	94,15 ± 1,73	107,97 ± 14,36	87,51 ± 11,13	76,78 ± 8,05
RA30	104,4 ± 9,57	100,44 ± 3,96	117,65 ± 24,87	90,91 ± 23,78	75,79 ± 17,5
RA31	103,38 ± 9,12	103,66 ± 10,32	117,21 ± 3,37	87,11 ± 19,93	84,05 ± 9,52
RA32	74,66 ± 19,97	75,04 ± 16,58	63,74 ± 10,01	76,24 ± 11,57	55,31 ± 19,08
RA33	17,35 ± 11,42	56,71 ± 15,72	47,15 ± 2,25	48,87 ± 6,70	32,77 ± 0,07
RA34	12,24 ± 3,29	29,26 ± 7,67	11,82 ± 1,54	49,60 ± 16,54	16,14 ± 0,89
RA35	70,84 ± 18,32	77,34 ± 13,24	76,41 ± 6,43	74,31 ± 10,65	76,96 ± 16,74
RA36	41,41 ± 10,44	76,37 ± 13,16	84,57 ± 21,95	76,45 ± 6,96	44,29 ± 7,25
RA37	81,70 ± 5,79	92,89 ± 9,75	95,29 ± 5,69	103,07 ± 11,55	79,74 ± 14,23
RA38	79,68 ± 9,51	87,41 ± 12,78	89,64 ± 15,59	85,87 ± 10,15	63,69 ± 12,00

As linhagens foram tratadas com diferentes substâncias na concentração de 50 µM e os resultados representam a porcentagem de células viáveis após incubação de 48 horas em atmosfera de 5% CO₂. A viabilidade celular foi avaliada por MTT. Dados representativos de três experimentos independentes.

APÊNDICE 3 – Atividade citotóxica de compostos sintéticos em células de tumores sólidos

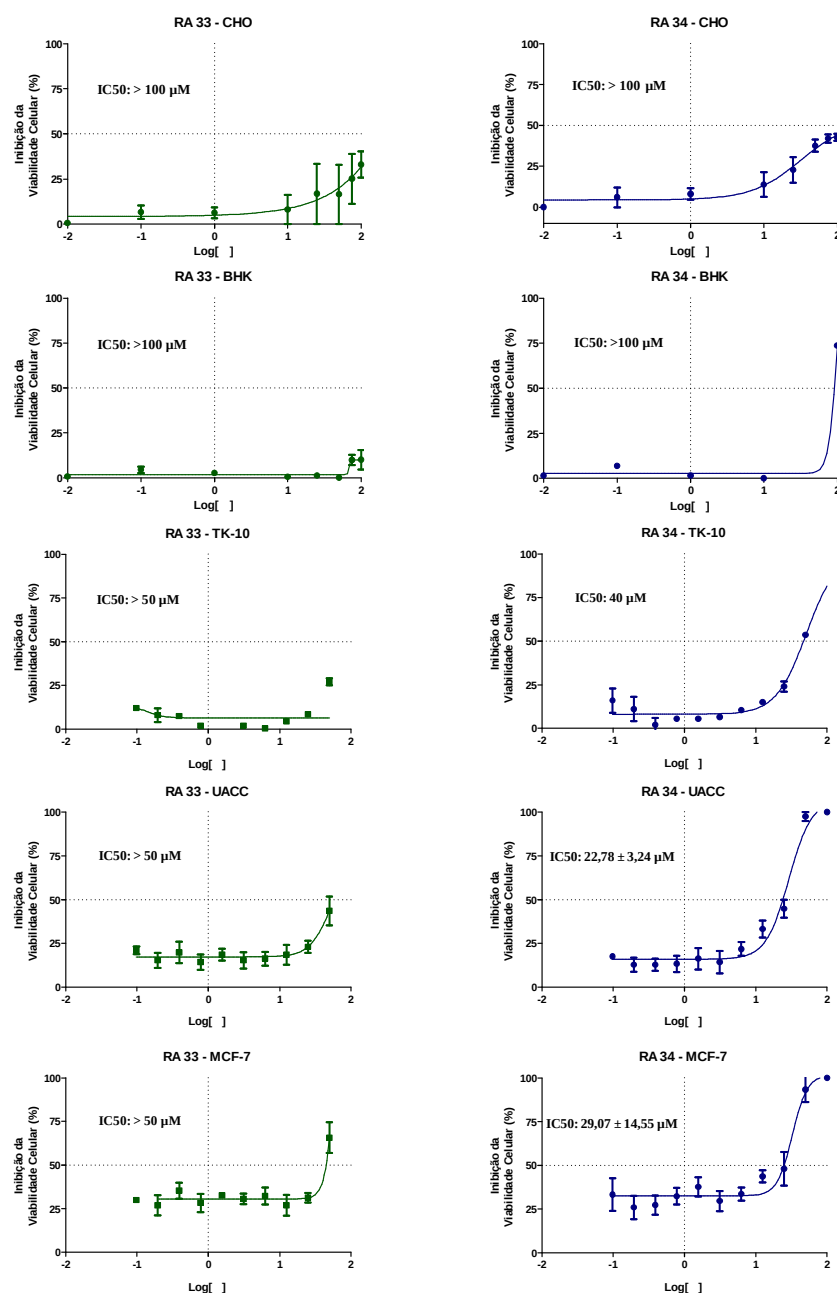


Figura 9. Curvas representativas da concentração inibitória de 50% do crescimento celular dos enantiômeros RA 33 e RA 34 em linhagens aderentes. As linhagens foram tratadas com diferentes concentrações dos enantiômeros por 48 horas e a viabilidade das células foi determinada pelo ensaio de MTT. Dados representativos de pelo menos dois experimentos independentes realizados em triplicata.

ANEXO 1 – Produção Acadêmica

Artigos completos publicados em periódicos

Ferraz, Karina S.O. ; Fernandes, Lucas; Carrilho, Diego ; Pinto, M. C. X. ; Leite, Maria de Fátima ; Souza Fagundes, Elaine M. ; Speziali, Nivaldo L. ; Mendes, Isolda C. ; Beraldo, Heloisa . 2-Benzoylpyridine-N(4)-tolyl thiosemicarbazones and their palladium(II) complexes: Cytotoxicity against leukemia cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 17, p. 7138-7144, 2009.

Resumos publicados em anais de congressos

Pinto, M. C. X. ; Cardoso, G. M. M.; Dias, D. F. ; Zani, C. L. ; Leite, M. F. ; Alves, R. J. ; Fagundes, E. M. S.. NEW SYNTHETIC COMPOUND AGAINST HUMAN CANCER CELL LINES: IDENTIFICATION OF POTENTIAL PROTOTYPE FOR NEW ANTICANCER DRUG. In: 7th International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2009, Ribeirão Preto - SP. 7th International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2009

Cardoso, G. M. M.; RODARTE, D. E. C.; Pinto, M. C. X.; Aragão, D. M. O. ; Guarize, L. ; Fontes, E. S. ; Fagundes, E. M. S.. Antileukemic potential of cecropia pachystachya in vitro. In: 7th International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2009, Ribeirão Preto - SP. 7th International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2009.

PINTO, M. C. X. ; Reis, D. C. ; Beraldo, H. ; Fagundes, E. M. S. Indentification of New Antimony Complex With Cytotoxicity and Pro-Apoptotic Effects. In: XVII Encontro de Pesquisa em Fisiologia e Farmacologia, 2009, Belo Horizonte-MG. XVII Encontro de Pesquisa em Fisiologia e Farmacologia, 2009.

Mendonça, D. V. C.; Pinto, M. C. X. ; Reis, D. C.; Beraldo, H.; Cardoso, G. M. M. ; Fagundes, E. M. S.. Atividade citotóxica e pró-apoptótica de hidroxoquinolinas complexadas com antimônio e bismuto em linhagens celulares leucêmicas. In: XVII Encontro de Pesquisa em Fisiologia e Farmacologia, 2009, Belo Horizonte. XVII Encontro de Pesquisa em Fisiologia e Farmacologia. Belo Horizonte, 2009.



2-Benzoylpyridine-*N*(4)-tolyl thiosemicarbazones and their palladium(II) complexes: Cytotoxicity against leukemia cells

Karina S. O. Ferraz^a, Lucas Ferandes^b, Diego Carrilho^b, Mauro C. X. Pinto^b, Maria de Fátima Leite^b, Elaine M. Souza-Fagundes^b, Nivaldo L. Speziali^c, Isolda C. Mendes^a, Heloisa Beraldo^{a,*}

^a Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, Brazil

^b Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, Brazil

^c Departamento de Física, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 July 2009

Revised 26 August 2009

Accepted 29 August 2009

Available online 4 September 2009

Keywords:

Thiosemicarbazones
Palladium(II) complexes
Leukemia

ABSTRACT

The palladium(II) complexes [Pd(2Bz4oT)Cl], [Pd(2Bz4mT)Cl], and [Pd(2Bz4pT)Cl] were prepared with *N*(4)-*ortho*-(H2Bz4oT), *N*(4)-*meta*-(H2Bz4mT), and *N*(4)-*para*-(H2Bz4pT) tolyl-thiosemicarbazones derived from 2-benzoylpyridine. The free thiosemicarbazones proved to be highly cytotoxic against Jurkat, HL60 and the resistant HL60.Bcl-X_L leukemia cell lines at nanomolar concentrations, but were much less cytotoxic to HepG2 human hepatoma cells. Upon coordination to palladium(II) the cytotoxic activity against all studied cell lines decreases. However, the high cytotoxicity of the free thiosemicarbazones against leukemia, together with their hepatotoxic profile similar to that of cisplatin suggest that *N*(4)-tolyl thiosemicarbazones have potential as chemotherapeutic drug candidates.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Today platinum drugs are among the most active and widely used clinical agents for the treatment of advanced cancer. However, their clinical utility is limited to a relatively narrow range of tumors, because of primary resistance and the development of resistance secondary to the initial treatment.¹ Efforts have been made by different groups to rationally design unconventional platinum complexes that could be used in cisplatin-resistant tumors. Hence, coordination of a variety of organic ligands with platinum(II) has been proposed as a strategy to overcome resistance to cisplatin and its analogs. Also, coordination of organic ligands to palladium(II) and to other transition and main group metals have been investigated as alternative strategies for overcoming resistance to cisplatin.

Thiosemicarbazones and their metal complexes present a wide range of pharmacological applications as antimicrobial, antitumoral and antiviral agents.² In many circumstances the activity increases upon coordination to metal ions.^{3–5} It has been shown that palladium(II) and platinum(II) complexes with thiosemicarbazones are active against cisplatin-resistant human tumor cell lines, probably because their mode of action involves inter-strand crosslinks

with DNA, instead of intra-strand crosslinks, which is the major coordination mode of cisplatin.⁶

In previous works we demonstrated that 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones and their palladium(II) and tin(IV) complexes present cytotoxic activity against MCF-7, TK-10 and UACC-62 human tumor cell lines and are able to induce cell death by apoptosis.^{7,8}

We recently started an investigation of the pharmacological profile of *N*(4)-tolyl-thiosemicarbazones.^{3,4} In the present work *N*(4)-*ortho*-(H2Bz4oT), *N*(4)-*meta*-(H2Bz4mT), and *N*(4)-*para*-(H2Bz4pT) tolyl-thiosemicarbazones derived from 2-benzoylpyridine (see Fig. 1) and their palladium(II) complexes have been evaluated for their in vitro antiproliferative activity against HepG2 (human hepatoma), Jurkat (immortalized line of T lymphocyte), HL60 (human promyelocytic leukemia) and HL60.Bcl-X_L (human promyelocytic leukemia ectopically expressing the anti-apoptotic protein Bcl-X_L that confers resistance to cytotoxic stimulus) human cancer cell lines.

We elected leukemia cells as a model considering that cisplatin increases the sensitivity of leukemia cells in combinatory therapy in patients.⁹ To investigate drug sensitivity and resistance, we simulated cell resistance behavior using the lineage HL60.Bcl-X_L since Bcl-X_L is often over-expressed in various human cancers. The stable expression of this anti-apoptotic protein in HL60 cells converted this apoptosis-sensitive line into a resistant line.^{10,11} A significant proportion of patients chronically treated with

* Corresponding author. Tel.: +55 31 34095740; fax: +55 31 34095700.
E-mail address: hberaldo@ufmg.br (H. Beraldo).

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](#)