

REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA

JAMILLY LOPES DE MACÊDO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO DOS COMPOSTOS
MESOIÔNICOS MIH 2.4BL E MIH 2.4Zn, PERTENCENTES AO GRUPO TIOLATO,
E SEUS POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO.**

RECIFE – PE

2017

REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA

JAMILLY LOPES DE MACÊDO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO DOS COMPOSTOS
MESOIÔNICOS MIH 2.4BL E MIH 2.4Zn, PERTENCENTES AO GRUPO TIOLATO,
E SEUS POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, ponto focal da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, como pré-requisito para obtenção do título de Doutor(a) em Biotecnologia, área de concentração: Biotecnologia em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Adrião
Gomes Filho.

RECIFE – PE

2017

TERMO DE APROVAÇÃO

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA – RENORBIO**

TESE DE DOUTORADO ELABORADA POR:

JAMILLY LOPES DE MACÊDO

Avaliação do potencial antineoplásico dos compostos mesoiônicos MIH 2.4BL e MIH 2.4Zn, pertencentes ao grupo tiolato, e seus possíveis mecanismos de ação.

BANCA EXAMINADORA:

Tese defendida e aprovada pela banca examinadora em: 18 de setembro de 2017.

Orientador:

Prof^a. Dr. Manoel Adrião Gomes Filho (UFRPE)

Examinadores:

Prof^a. Dra. Maria de Mascena Diniz Maia (UFRPE)

Prof. Dr. Petrônio Filgueiras de Athayde Filho (RENORBIO – UFPB)

Prof^a. Dra. Jaciana dos Santos Aguiar (UFPE)

Prof^a. Dra. Gardenia Carmen Gadelha Militão (UFPE)

Suplentes:

Prof. Dr. Severino Alves Júnior (RENORBIO – UFPE)

Prof^a. Dra. Ana Paula Silveira Paim (UFPE)

Recife, PE. _____ de 2017.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Jonas e Graça Lopes!
Se hoje sou uma pessoa melhor e preparada
para enfrentar os desafios que a vida oferece,
devo à educação que vocês me proporcionaram!*

*Vocês são os meus maiores motivos e
esta conquista é para vocês e por vocês!*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Manoel Adrião Gomes Filho, pela oportunidade a mim concedida, pela dedicação, orientação, confiança, amizade e determinação para buscar soluções sempre. Guardarei comigo todo aprendizado e levarei para a minha vida o seu exemplo de simplicidade e o seu jeito humano de ser.

Aos amigos e companheiros do laboratório FAMA, Luciana, Silvany, Érika, Isabela, Diogo e todos os demais colegas, pelas experiências compartilhadas, pelo companheirismo de sempre, pela amizade construída e, principalmente, pelas boas risadas. Amo vocês!

Aos meus orientadores do mestrado, prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza e a prof. Dr^a. Maria de Mascena Diniz Maia (Prof. Mana). Foram vocês quem primeiro me acolheram em Recife, me capacitaram e tiveram uma participação fundamental no meu processo de formação acadêmica.

Aos meus pais, Jonas e Graça Lopes, minha razão de viver! Sem todo carinho, dedicação, amor, orientação e doação de vocês, esta conquista teria sido muito mais difícil! Por vocês todo o meu amor e para vocês darei o meu melhor sempre!

Aos meus irmãos, Jôsanny, Janielly, Jacquelinny e Jimmy, que sempre me incentivam e se orgulham de mim e da história de sucesso que estamos construindo! Esta conquista é nossa! Amo vocês!

Ao meu amor, amigo e companheiro, Ricardo Castro, por cuidar de mim com muita doação e por compartilhar comigo as minhas alegrias e angústias, me incentivar e apoiar sempre! Este título também é seu, meu amor!

Aos meus amigos e familiares, que sempre me incentivaram e sempre se alegraram com as minhas conquistas.

À professora Dr^a. Aurea Wischral, por todo conhecimento compartilhado, pelas contribuições dadas para a realização deste trabalho e por sempre nos receber em sua casa com muito carinho e amizade.

Ao prof. Dr. Petrônio Figueiras de Athayde Filho, por fornecer os compostos de estudo deste trabalho e por suas contribuições sempre valiosas.

À professora Dr^a. Terezinha Gonçalves Silva, por ceder o espaço do Departamento de Antibióticos para realização dos experimentos com a citometria de fluxo e por todas as contribuições dadas.

Ao professor Dr. Severino Alves Júnior, por ceder o espaço do Departamento de Química para a realização da síntese e caracterização química dos compostos de estudo e por todas as orientações concedidas.

Aos amigos e colaboradores, Jeyce, Leandro, Helivaldo e Igor, que não mediram esforços para nos auxiliar e orientar durante a realização dos experimentos.

A todos que fazem parte do Programa de Pós-graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), ponto focal UFRPE, pela convivência e atenção com que sempre me atenderam.

À Fundação CAPES, pelo incentivo e apoio financeiro.

À todos vocês, muito obrigada!

**“Tudo que um sonho precisa
para ser realizado é alguém que
acredite que ele possa
ser realizado.”**

(Roberto Shinyashiki)

RESUMO

Os compostos mesoiônicos sintéticos, que pertencem ao grupo 1,3-tiazólio-5-tiolato, possuem capacidade de atravessar membranas celulares e interagir com diversas moléculas biológicas com afinidades distintas. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial antineoplásico de novos compostos mesoiônicos do grupo 1,3-tiazólio-5-tiolato, com ou sem enriquecimento por zinco, e seus possíveis mecanismos de ação. Para tal, os compostos foram inicialmente submetidos à caracterização química através da obtenção da curva de calibração, espectrofotometria de ultravioleta e visível (UV-vis), espectrometria de emissão óptica (ICP-OS), espectroscopia de fotoluminescência, ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia de infravermelho (FT-IR), raios X e análise termogravimétrica (TGA). Foram desenvolvidos estudos experimentais *in vitro*, utilizando linhagens celulares de carcinoma de colo de útero (HEp-2), carcinoma de cólon retal humano (HT-29), leucemia promielocítica aguda humana (HL-60), adenocarcinoma mamário humano (MCF7), carcinoma ductal de mama humano (T-47D), câncer de mama de rato (4T1) e uma linhagem de células transformadas de macrófagos murinos peritoneais (RAW 264.7). Pelo ensaio de coloração com o iodeto de propídeo, em citometria de fluxo, avaliou-se a viabilidade celular na linhagem HL-60. Para o teste de despolarização mitocondrial foi utilizada a rodamina 123 e para a avaliação do padrão de morte celular foi utilizada a Anexina V. A análise do ciclo celular e fragmentação do DNA foi realizada com o kit cell cycle Guava®. Posteriormente, foi realizada extração do RNA com Trizol, obtenção do cDNA com o kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (PROMEGA) e análise da expressão dos genes *BAX*, *BCL2*, *CASPASE 3*, *CASPASE 9* e *GAPDH* como controle de referência. Os resultados demonstraram que, considerando o tempo de exposição das células aos compostos, a menor concentração obtida da CI_{50} e o melhor índice de seletividade (IS), os compostos mesoiônicos MIH 2.4BI [3,5 µg/mL (3,0 – 4,0)] e MIH 2.4Zn [5,0 µg/mL (4,5 – 5,5)] apresentaram melhor atividade na linhagem celular HL-60, no tempo de 48h, promovendo inibição do crescimento de células cancerígenas com menor toxicidade em células saudáveis (RAW 264.7). Os compostos promoveram a despolarização mitocondrial na linhagem testada (HL-60), a morte celular por apoptose e parada do ciclo celular na fase G2. Contudo, as concentrações testadas dos compostos não promoveram fragmentação do DNA. Com relação à análise da expressão dos genes, observou-se que o gene *BAX* apresentou diferença significativa somente quando comparados a expressão na amostra BLC1 (MIH 2.4BI; 3,5 µg/mL) vs. BLC2 (MIH 2.4BI; 7,0 µg/mL) ($p < 0,05$) e quando comparados a expressão do gene na amostra BLC1 vs. ZNC1 (MIH 2.4Zn; 5,0 µg/mL) ($p < 0,05$). Para o gene *BCL2*, houve diferença significativa quando comparados a amostra BLC2 vs. ZNC2 (MIH 2.4Zn; 10,0 µg/mL) ($p < 0,01$) e a amostra ZNC1 vs. ZNC2 ($p < 0,05$). Em relação à expressão da *CASPASE 3*, observou-se diferença significativa ao comparar as amostras BLC2 vs. BLC1 ($p < 0,05$). E para a *CASPASE 9* houve diferença significativa quando comparadas as seguintes amostras: BLC1 vs. BLC2 ($p < 0,001$); BLC1 vs. ZNC1, BLC1 vs. ZNC2, BLC1 vs. doxorubicina e BLC1 vs. controle negativo ($p < 0,01$). Os compostos mesoiônicos sintéticos analisados apresentam potencial efeito antitumoral como candidatos ao tratamento antineoplásico, permitindo a continuidade dos estudos *in vitro* e *in vivo* para futura análise pré-clínica.

Palavras-Chaves: câncer, compostos mesoiônicos, citotoxicidade, apoptose, atividade antitumoral.

ABSTRACT

Synthetic mesoionic compounds, belonging to the 1,3-thiazolium-5-thiolate group, have an excellent ability to cross cell membranes and interact with several biological molecules with distinct affinities. The present work aimed to evaluate the antineoplastic potential of new mesoionic compounds of the 1,3-thiazolium-5-thiolate group, with or zinc enrichment, and their possible mechanisms of action. For this, the compounds were initially subjected to chemical characterization by obtaining the calibration curve, ultraviolet and visible spectrophotometry (UV-vis), optical emission spectrometry (ICP-OS), photoluminescence spectroscopy, nuclear magnetic resonance, infrared spectroscopy (FT-IR), X-ray and thermogravimetric analysis (TGA). In vitro experimental studies using cervical carcinoma (HEp-2) cell lines, human rectal colon carcinoma (HT-29), human acute promyelocytic leukemia (HL-60), human mammary adenocarcinoma (MCF7), carcinoma human breast cancer (T-47D), rat breast cancer (4T1) and a lineage of healthy transformed cells of murine peritoneal macrophages (RAW 264.7). For the staining with propidium iodide, in flow cytometry, the cell viability in the HL-60 strain was evaluated. For the mitochondrial depolarization test, rhodamine 123 was used and for the evaluation of the cell death pattern, Annexin V was used. Cell cycle analysis and DNA fragmentation were performed with the Guava® cell cycle kit. Subsequently, RNA extraction with Trizol was obtained, cDNA was obtained with ImProm-II™ Reverse Transcription System (PROMEGA) and expression analysis of *BAX*, *BCL2*, *CASPASE 3*, *CASPASE 9* and *GAPDH* genes as reference control. The results showed that, considering the time of exposure of the cells to the compounds, the lowest IC50 concentration and the best selectivity index (IS), the mesoionic compounds MIH 2.4BI [3.5 µg / mL (3.0-4.0)] and MIH 2.4Zn [5.0 µg / mL (4.5-5.5)] showed better activity in the HL-60 cell line, in 48 h time, promoting inhibition of the growth of cancer cells with lower toxicity in healthy cells (RAW 264.7). The compounds promoted mitochondrial depolarization in the tested lineage (HL-60), cell death by apoptosis and cell cycle arrest in G2 phase. However, the tested concentrations of the compounds did not promote DNA fragmentation. Regarding the analysis of gene expression, it was observed that the *BAX* gene presented significant difference only when compared to the expression in the sample BLC1 (MIH 2.4BI; 3.5 µg / mL) vs. BLC2 (MIH 2.4BI; 7.0 µg / mL) ($p < 0.05$) and when comparing the expression of the gene in the sample BLC1 vs. ZNC1 (MIH 2.4Zn; 5.0 µg / mL) ($p < 0.05$). For the *BCL2* gene, there was a significant difference when compared to the BLC2 sample. ZNC2 (MIH 2.4Zn; 10.0 µg / mL) ($p < 0.01$) and the ZNC1 sample. ZnC2 ($p < 0.05$). Regarding the expression of *CASPASE 3*, a significant difference was observed when comparing BLC2 vs. BLC1 ($p < 0.05$). And for *CASPASE 9* there was a significant difference when compared to the following samples: BLC1 vs. BLC2 ($p < 0.001$); BLC1 vs. ZNC1, BLC1 vs. ZNC2, BLC1 vs. doxorubicin and BLC1 vs. negative control ($p < 0.01$). The synthetic mesoionic compounds analyzed have a potential antitumor effect as candidates for antineoplastic treatment, allowing the continuity of in vitro and in vivo studies for future preclinical analysis.

Keywords: cancer, mesoionic compounds, cytotoxicity, apoptosis, antitumor activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Características das células tumorais.....	22
Figura 2:	Fases do ciclo celular.....	26
Figura 3:	Características morfológicas dos principais tipos de morte celular (PS = Fosfatidilserina; LC3 = proteína citoplasmática, que é considerada um marcador da macroautofagia).....	28
Figura 4:	Representação esquemática com as principais vias de ativação da apoptose (intrínseca e extrínseca).....	32
Figura 5:	Vias de sinalização molecular da necroptose.....	34
Figura 6:	Estrutura bicíclica do primeiro composto mesoiônico sintetizado por Fischer e Besthorn em 1882.....	38
Figura 7:	Estrutura química dos compostos mesoiônicos 1,3,4-tiadiazólio-2-tiolato.....	39
Figura 8:	Estrutura bicíclica I, do composto mesoiônico, intitulada “endotiadihidrotiadiazólio”, proposta por Busch, em 1895.....	39
Figura 9:	Estrutura bicíclica II, do composto mesoiônico, intitulada “endotiadihidrotiadiazólio”, proposta por Busch, em 1895.....	39
Figura 10:	Estruturas dos compostos mesoiônicos propostas Schönberg, em 1938.....	40
Figura 11:	Reação para obtenção de estrutura bicíclica (Sydnone) proposta por Earl e Mackney, em 1935.....	41
Figura 12:	Representação híbrida de ressonância de diversas formas canônicas das sidnonas, proposta por Barker e Ollis (1949-1957). 41	
Figura 13:	Representação híbrida da estrutura das sidnonas, envolvendo no anel desta estrutura a presença de um caráter aromático, proposta por Barker e Ollis (1949-1957).....	42
Figura 14:	Estrutura do composto mesoiônico proposta por Potts (1978).....	43
Figura 15:	Esquema representativo da estrutura básica de um composto mesoiônico.....	45
Figura 16:	Representação estrutural básica dos dois grupos distintos de compostos mesoiônicos com base na classificação proposta por Ollis e Ramsden (1976).....	45

Figura 17:	Tautomeria do composto 1,3-difenil-1,2,3,4-tetrazólio-5-tiolato e da desidroditizona, representando, respectivamente, os compostos mesoiônicos dos tipos A e B.....	46
Figura 18:	Exemplo para caracterização química dos compostos mesoiônicos do tipo A.....	47
Figura 19:	Reação de desidroditizona, apresentando o equilíbrio entre os tautômeros “19a” e “19b”.....	48
Figura 20:	Estrutura química dos principais compostos mesoiônicos.....	51
Figura 21:	Estrutura molecular do composto mesoiônico com base livre (MIH 2.4BI).....	73
Figura 22:	Curva de calibração em triplicata do MIH 2.4BI, em solvente metanol.....	74
Figura 23:	Perfil de absorbâncias nas bandas dos compostos MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn, obtido através de espectrofotometria de UV-vis.....	75
Figura 24:	Espectroscopia de fotoluminescência, revelando um deslocamento Stokes de 595nm para o MIH 2.4BI e 670nm para o composto MIH 2.4Zn.....	76
Figura 25:	Estruturas moleculares dos compostos MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn.....	77
Figura 26:	Espectro de RMN ¹³ C do MIH 2.4Zn (CD ₃ OD, 75 MHz).....	79
Figura 27:	Espectro de RMN ¹ H do MIH 2.4Zn (CD ₃ OD, 300 MHz).....	80
Figura 28:	Espectroscopia de infravermelho transformada em Fourier (FT-IR) do MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn, obtido em Kbr à temperatura ambiente.....	81
Figura 29:	Difratograma de raio-X do MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn.....	82
Figura 30:	Análises termogravimétricas do MIH 2.4BI (a) e MIH 2.4Zn (b), 10°C/min em atmosfera de nitrogênio.....	83
Figura 31:	Teste de viabilidade celular envolvida na ação citotóxica dos compostos mesoiônicos, na linhagem HL-60, após 48h de incubação.....	89
Figura 32:	Avaliação da despolarização da membrana mitocondrial em células da linhagem HL-60 tratadas com os compostos MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn, após 48h de incubação.....	92

Figura 33:	Investigação do padrão de morte celular (células viáveis, apoptose inicial, apoptose tardia e necrose provocado pela ação dos compostos MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn na linhagem celular HL-60, após 48h de incubação.....	95
Figura 34:	Ensaio do ciclo celular na linhagem HL-60 tratada com os compostos MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn.....	98
Figura 35:	Avaliação da fragmentação do DNA de células da linhagem HL-60, tratadas com os compostos MIH 2.4 BI e MIH 2.4Zn.....	100
Figura 36:	Gráfico da expressão do gene <i>BAX</i>	103
Figura 37:	Análise da expressão do gene <i>BCL2</i>	104
Figura 38:	Análise da expressão do gene <i>CASPASE 3</i>	105
Figura 39:	Análise da expressão do gene <i>CASPASE 9</i>	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Alguns sistemas mesoiônicos descritos na literatura (OLLIS e RAMSDEN, 1976).....	48
Tabela 2:	Alguns sistemas mesoiônicos descritos na literatura (OLLIS e RAMSDEN, 1976).....	50
Tabela 3:	Linhagens celulares utilizadas neste estudo.....	56
Tabela 4:	Sequências dos <i>primers</i> dos genes utilizados para análise de expressão gênica.....	70
Tabela 5:	Teste de inibição realizado no tempo de 72h de tratamento das três linhagens celulares com os compostos analisados na concentração de 25µg/mL.....	72
Tabela 6:	Teste de citotoxicidade realizado para obtenção da IC50 dos compostos MIH 2.2 e MIH 2.4, no tempo de 24h, na linhagem MCF7.....	73
Tabela 7:	Dados dos espectros de RMN ¹³ C (75 MHz) em (CD ₃ OD) de MIH 2.4Zn. Os deslocamentos químicos estão em “ppm”.....	77
Tabela 8:	Dados dos espectros de RMN ¹ H (300 MHz) em (CD ₃ OD) de MIH 2.4Zn. Os deslocamentos químicos estão em “ppm” e as constantes de acoplamento (J) em Hz.....	77
Tabela 9:	Análise elementar das concentrações de carbono, hidrogênio, enxofre e nitrogênio nos compostos MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn.....	84
Tabela 10:	Valores da CI ₅₀ (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular e intervalo de confiança de 95%, realizado pelo teste de MTT, após 72 horas de incubação.....	85
Tabela 11:	Valores referentes ao Índice de Seletividade (IS), calculado através da razão da CI ₅₀ (72h) dos compostos mesoiônicos MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn na linhagem normal RAW 264.7 pela IC ₅₀ (72h) dos mesmos compostos em células tumorais.....	87
Tabela 12:	Valores da CI ₅₀ obtidos através do tratamento das células de HL-60 com os compostos MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn nos tempos de 24 e 48 horas.....	88

Tabela 13:	Efeitos dos compostos MIH 2.4 BI e MIIH 2.4Zn na linhagem celular HL-60, após 48h de incubação.....	89
Tabela 14:	Efeitos dos compostos MIH 2.4 BI e MIIH 2.4Zn na mitocôndria celular da linhagem HL-60, após 48h de incubação.....	91
Tabela 15:	Efeitos dos compostos MIH 2.4BI e MIIH 2.4Zn no padrão de morte celular na linhagem HL-60, após 48h de incubação.....	94
Tabela 16:	Efeitos dos compostos MIH 2.4BI e MIIH 2.4Zn no ciclo celular na linhagem celular HL-60.....	97
Tabela 17:	Efeitos dos compostos MIH 2.4 BI e MIIH 2.4Zn na fragmentação do DNA de células da linhagem HL-60.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACS	American Cancer Society
Apaf-1	Apoptotic peptidase activating fator 1
ATPase	Adenosinatrifosfatase
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
CASP8	Caspase 8
CDK	Quinases ciclina dependentes
cDNA	DNA complementar total
CI₅₀	Concentração que inibe 50% do crescimento celular
CMA	Autofagia mediada por chaperonas
CT	Cycle Threshold
DD	Death Domain
DISC	Complexo de sinalização de indução de morte
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade ótica
DP	Desvio padrão
EMP	Erro padrão médio
FADD	Domínio de morte associado ao CD95
FBS	Soro fetal bovino
FT-IR	Espectroscopia de infravermelho transformada em Fourier
HEp-2	Carcinoma de laringe humano
HepG2	Carcinoma hepatocelular humano
HL-60	Leucemia promielocítica aguda humana
HT-29	Carcinoma de cólon retal humano
Iarc	Agency for Research on Cancer
IAP	Proteína inibidora de apoptose
IC	Intervalo de confiança
ICP-OS	Espectrometria de emissão óptica
IS	Índice de seletividade
MCF7	Carcinoma de mama humano

MeWo	Melanoma maligno humano
MIH 2.4BI	Composto Mesoioônico MIH 2.4 com base livre
MIH 2.4Zn	Composto Mesoioônico MIH 2.4 com zinco
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol- 2-il)-2,5-difenilterazólio
NCCD	Comitê de Nomenclatura sobre Morte Celular
OMS	Organização Mundial de Saúde
OS	Fostatidilserina
RIPK1	Receptor 1 da proteína quinase
RNA	Ácido desoxirribonucleico
RIPK3	Proteína quinase de interação com receptor 3
RPMI 1640	Meio utilizado específico para cultura de células
RAW 264.7	Macrófagos murinos peritoneais
RMN	Ressonância magnética nuclear
Rpm	Rotações por minuto
rTNF	Receptores de Fator de Necrose Tumoral
Smac/DIABLO	Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP Binding Protein with Low Propidium iodet
SMases	Esfingomielinases
Syd-1	Sidnona 1
TGA	Análise termogravimétrica
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR1	Receptor de Fator de Necrose Tumoral 1
TNFR5	Receptor de Fator de Necrose Tumoral 5
TRADD	Proteínas de domínio de morte associado à TNFR
TRAF-5	Fator associado à TNFR5
TRAIL	TNF related apoptosis inducing ligant.
T-47D	Carcinoma ductal de mama humano
UV-vis	Espectroscopia de ultravioleta e visível
WHO	World Health Organization
µL	Microlitros
4T1	Câncer de mama de rato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 CÂNCER.....	20
2.2 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER.....	22
2.3 CICLO CELULAR E CÂNCER.....	24
2.4 TIPOS DE MORTE CELULAR.....	27
2.4.1 Autofagia.....	29
2.4.2 Apoptose.....	30
2.4.3 Necrose.....	33
2.4.4 Catástrofe Mitótica.....	34
2.5 A QUIMIOTERAPIA E AS NOVAS ALTERNATIVAS PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER.....	35
2.6 COMPOSTOS HETEROCÍCLICOS.....	37
2.6.1 Compostos Mesoioônicos.....	38
2.6.1.1 <i>Histórico</i>	38
2.6.1.2 <i>Conceito dado para os compostos mesoioônicos</i>	42
2.6.1.3 <i>Classificação dos compostos mesoioônicos</i>	45
3 OBJETIVOS	54
3.1 OBJETIVO GERAL.....	54
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	54
4 MATERIAIS E MÉTODOS	55
4.1 MATERIAIS.....	55
4.1.1 Reagentes e Materiais.....	55
4.1.2 Células.....	55
4.1.3 Compostos Mesoioônicos.....	56
4.2 MÉTODOS.....	56
4.2.1 Síntese do Composto Mesoioônico MIH 2.4Zn.....	56
4.2.2 Caracterização Química dos Compostos MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn.....	57
4.2.3 Cultivo de Células.....	59
4.2.4 Avaliação da Citotoxicidade em Células Tumorais.....	59
4.2.4.1 <i>Princípios do Teste</i>	59

4.2.4.2 Procedimento Experimental.....	60
4.2.4.3 Análise Estatística.....	61
4.2.5 Índice de Seletividade.....	61
4.2.5.1 Princípios do Teste.....	61
4.2.5.2 Procedimento Experimental.....	62
4.2.6 Avaliação da Viabilidade Celular.....	62
4.2.6.1 Princípios do Teste.....	62
4.2.6.2 Procedimento Experimental.....	63
4.2.7 Avaliação da Despolarização da Membrana Mitocondrial.....	63
4.2.7.1 Princípios do Teste.....	63
4.2.7.2 Procedimento Experimental.....	64
4.2.8 Avaliação do Padrão da Morte Celular.....	65
4.2.8.1 Princípios do Teste.....	65
4.2.8.2 Procedimento Experimental.....	66
4.2.9 Avaliação do Ciclo Celular e Fragmentação do DNA.....	66
4.2.9.1 Princípios do Teste.....	66
4.2.9.2 Procedimento Experimental.....	67
4.2.10 Análises Estatísticas dos Experimentos Realizados em Citometria de Fluxo.....	68
4.2.11 Extração de RNA.....	68
4.2.12 Obtenção do cDNA.....	70
4.2.13 Análise da Expressão Gênica.....	70
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
ANEXOS.....	120
ANEXO A – PEDIDO DE PATENTE DEPOSITADO NO INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL (INPI).....	121

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das doenças que mais causam insegurança na sociedade, por ter se tornado um estigma de mortalidade e dor e por representar um conjunto de mais de 100 doenças, sendo definido como enfermidades complexas de caráter mutacional, proliferativo, de crescimento celular aberrante e desordenado (maligno), em que células em um mesmo microambiente, invadem os tecidos e órgãos, podendo se espalhar para outras regiões do organismo, evento este conhecido como metástase. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas.

Esta doença representa um grande desafio para a sociedade, devido ao fato de que para a maioria dos tumores ainda não foi encontrado a cura e os tratamentos utilizados produzem, também, efeitos colaterais muito prejudiciais ao paciente, principalmente aos mais debilitados, em virtude da citotoxicidade das drogas nas células não-tumorais.

As células cancerígenas são definidas por múltiplas características estruturais, comportamentais e moleculares. Algumas alterações são citadas como essenciais na fisiologia do câncer, que coletivamente determinam o crescimento maligno, como por exemplo: autossuficiência na regulação de sinais de crescimento celular, a insensibilidade aos sinais que inibem este crescimento, evasão da morte celular programada (apoptose), ilimitado potencial replicativo, indução da angiogênese, invasão tecidual e metástase, estresse metabólico, proteotóxico, mitótico, oxidativo e danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA).

A utilização de agentes químicos, isolados ou em combinação, com o objetivo de tratar os tumores malignos, denomina-se quimioterapia antineoplásica. Difere-se da radioterapia e da terapia cirúrgica por ser um tratamento sistêmico e cada vez mais têm se tornado uma das mais importantes e promissoras ferramentas de combate ao câncer do mundo. Além disso, as terapias com fotorradiação, imunoterapia, terapia gênica, uso de nanocarreadores e liberação controlada de fármacos vêm sendo testados para uso clínico.

Em tempos passados e também recentemente um amplo esforço tem sido feito quanto ao desenvolvimento de novas tecnologias derivadas do estudo de compostos químicos, a exemplo dos compostos mesoiônicos, ampliando a possibilidade de aplicação destes em estudos na área terapêutica do câncer, podendo agir por mecanismos de ação diferentes dos fármacos atuais e, ao mesmo tempo, eliminar a massa tumoral sem atingir os tecidos adjacentes normais.

Os compostos mesoiônicos constituem um grupo de betaínas heterocíclicas planas, estabilizadas por deslocalização de elétrons e cargas, que não possuem anéis benzênicos e apresentam diferentes combinações de heteroátomos, cuja síntese tem mostrado grande interesse especialmente pelo seu largo espectro de atividade biológica, com grande possibilidade de aproveitamento na obtenção de fármacos.

Compostos mesoiônicos do grupo 1,3-tiazólio-5-tiolato, são caracterizados por apresentarem um grupo “-SH”, designado por grupo tiol, grupo mercaptano ou grupo sulfidrilo ou sulfidril, ligado a um átomo de carbono (-C-SH ou R-SH, onde R representa um alceno, alceno ou outro grupo de átomos contendo carbono). Os tióis são análogos do enxofre de álcoois (ou seja, o enxofre toma o lugar do oxigênio no grupo hidroxila de um álcool).

Estes compostos tem sido empregados em diferentes estudos, podendo apresentar diversas atividades biológicas, tais como, antibacteriana, antitumoral, antifúngica, antimalárica, analgésica, anti-inflamatória, anticonvulsivante, antipirética, antiparasitária, dentre tantas outras que estão sendo mundialmente estudadas.

Partindo desta premissa, foi sugerida a hipótese do presente trabalho, onde novos compostos mesoiônicos do grupo 1,3-tiazólio-5-tiolato foram sintetizados e foram investigadas sua seletividade e mecanismo de ação tumoral em células cultivadas de linhagens humanas e animal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÂNCER

O termo “câncer” é uma palavra de origem grega, “*karkinos*”, que significa caranguejo. Este nome foi assim denominado devido ao aspecto de um tumor em crescimento, apresentando projeções alongadas que se filtram e se fixam no interior dos tecidos, lembrando a forma de um caranguejo, e foi creditado a Hipócrates (460-370 a.C.) (HAJDU, 2011). O termo “oncologia”, também de origem grega, “*Oncos*”, significa inchaço, e foi atribuído à Galeno, em uma referência ao aspecto comum a vários tipos de tumores (ACS, 2014).

O câncer é uma das doenças mais preocupantes para a sociedade, por ter se tornado um estigma de mortalidade e dor. Representa um conjunto de mais de 100 doenças, sendo definido como enfermidades complexas de caráter mutacional, proliferativo, de crescimento celular aberrante e desordenado (maligno), em que células, em um mesmo microambiente, invadem os tecidos e órgãos, podendo se espalhar para outras regiões do organismo, evento este conhecido como metástase. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas (KUMAR et al, 2004; INCA, 2016).

De caráter multifatorial, o câncer têm causas variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas externas estão relacionadas ao meio ambiente e aos costumes ou hábitos próprios de um ambiente sócio-cultural. As causas internas são, na maioria das vezes, associadas à predisposição genética e à capacidade do organismo de se defender das agressões externas. Esses fatores causais podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais. Alguns exemplos de fatores de risco mais comuns incluem a alta ingestão de gorduras, tabagismo, consumo excessivo de álcool, infecções virais e desequilíbrio na função imunológica. O surgimento do câncer depende também da intensidade e duração da exposição das

células aos seus agentes causadores (HANAHAN; WEINBERG, 2011; ESTANQUEIRO; AMARAL, 2015; BRASIL, 2016).

A multiplicação das células em organismos multicelulares saudáveis é cuidadosamente regulada com o propósito de atender às necessidades específicas de cada indivíduo. As células tumorais ou neoplásicas diferem das células normais pelo fato de adquirirem a capacidade de sobrevivência e proliferação independentes e indiscriminadas, não obedecendo ao controle biológico natural do organismo. Dividindo-se rapidamente, estas células adquirem características genéticas que as tornam mais agressivas, determinando a formação do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011).

A carcinogênese ocorre em diversas etapas e através da transformação de genes específicos, denominados proto-oncogenes e os genes supressores de tumor, que normalmente atuam no controle da divisão celular, apoptose e diferenciação celular, em oncogenes, os quais são capazes de promover modificações que determinam o caráter de malignidade às células neoplásicas (CROCE, 2008).

Os proto-oncogenes, a exemplo do *RAS*, *WNT*, *MYC*, *ERK* e *TRK*, são codificadores de proteínas relacionadas a funções como proliferação e resistência à morte celular que, quando ativadas em excesso, contribuirão para o perfil de agressividade tumoral. Em contrapartida, os genes supressores de tumor, a exemplo do *RB1*, *CDKN2A*, *TP 53*, *BRCA1* e *BRCA2*, estão relacionados à regulação e controle destas funções, de forma que o silenciamento desses genes contribuirá para o desenvolvimento da malignidade. Sendo assim, a manutenção do comportamento biológico normal de uma célula é o equilíbrio entre as atividades destes dois tipos de genes. A característica tumoral é composta por uma combinação da ativação de proto-oncogenes e do silenciamento de genes supressores de tumor, em várias instâncias bioquímicas da célula (CROCE, 2008).

Apesar de possuírem variações de acordo com o tipo histológico e características do tumor, se *in situ* ou metastático, de um modo geral, todos os tipos de câncer exibem algumas características que os distinguem das demais células em proliferação do corpo: sinalização proliferativa permanente, escape da ação dos supressores de tumor, capacidade de promover invasão tecidual e metástase, imortalização replicativa, indução da angiogênese, resistência à apoptose,

capacidade de reprogramação metabólica, escape do sistema imune, instabilidade genômica, que promove a diversidade genética e inflamação pró-tumorigênica (HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011). (Figura 1).

Figura 1: Características das células tumorais.



Fonte: adaptado de HANAHAN; WEINBERG, 2011.

2.2 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER

Com base no documento World Cancer Report 2016 da Agência Internacional para Pesquisas em Câncer (Agency for Research on Cancer - IARC), da Organização Mundial da Saúde (OMS), é inquestionável que o câncer é um problema de saúde pública, especialmente entre os países em desenvolvimento, onde é esperado que, nas próximas décadas, o impacto do câncer na população corresponda a 80% dos mais de 20 milhões de casos novos estimados para 2025 (STEWART, 2014; WHO, 2014; BRASIL, 2015).

Segundo a estimativa mundial, realizada em 2012, pelo projeto Globocan/Iarc, dos 14 milhões de casos novos estimados, mais de 60% ocorreram em países em desenvolvimento. Para a mortalidade, a situação é ainda mais preocupante, quando se constata que, dos 8 milhões de óbitos previstos, 70% ocorreram nesses mesmos países (FERLAY, 2015).

De acordo com estimativas mundiais do projeto Globocan 2012, da Agência Internacional para Pesquisas em Câncer (Agency for Research on Cancer - IARC), da Organização Mundial de Saúde (OMS), houve 14,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo, em 2012. Ainda segundo essas instituições, a carga do câncer continuará aumentando nos países em desenvolvimento e crescerá ainda mais em países desenvolvidos, se medidas preventivas não forem amplamente aplicadas (BRASIL, 2015; FERLAY, 2015).

Os tipos de câncer mais incidentes no mundo foram pulmão (1,8 milhão), mama (1,7 milhão), intestino (1,4 milhão) e próstata (1,1 milhão). Nos homens, os mais frequentes foram pulmão (16,7%), próstata (15,0%), intestino (10,0%), estômago (8,5%) e fígado (7,5%). Em mulheres, as maiores frequências encontradas foram mama (25,2%), intestino (9,2%), pulmão (8,7%), colo do útero (7,9%) e estômago (4,8%) (BRASIL, 2015; FERLAY, 2015).

Em 2030, estima-se que a carga global será de 21,4 milhões de novos casos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer, em consequência do crescimento e do envelhecimento da população, bem como da redução na mortalidade infantil e nas mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento (BRASIL, 2014).

Para o Brasil, estima-se para o biênio 2016-2017, a ocorrência de aproximadamente 600 mil novos casos de câncer, tendo como tipo mais incidente o câncer de pele não melanoma (com, aproximadamente, 180 mil novos casos). Com exceção dos casos de câncer de pele não melanoma, os tipos mais frequentes em homens serão: próstata (28,6%), pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6,0%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, os cânceres de mama (28,1%), intestino (8,6%), colo de útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%) apresentarão maior incidência (BRASIL, 2015).

É fundamental que o monitoramento da morbimortalidade por câncer se incorpore na rotina da gestão da saúde de modo a se tornar um instrumento essencial

para o estabelecimento de ações de prevenção e controle do câncer e de seus fatores de risco (BRASIL, 2015). Pois, além de provocar impactos negativos à saúde dos indivíduos, o câncer gera gastos econômicos superiores a qualquer outra causa de morte. Estimativas apontaram gastos da ordem de 895 bilhões de dólares em todo o mundo em 2008, com o tratamento direto do câncer e perdas na produtividade pela morte/ afastamento precoce (ACS, 2011).

2.3 CICLO CELULAR E CÂNCER

A obtenção de uma nova célula acontece através da fusão ou divisão de duas células. Esse processo celular, que ocorre de forma ordenada e programada, pode ser melhor avaliado através do curso de vida da célula. Esses eventos se iniciam por ocasião de um processo de replicação, que envolve um período de crescimento seguido pela divisão, sendo denominado ciclo celular (ALMEIDA et al, 2005; MALUMBRES; BARBACID, 2009).

O desenvolvimento da neoplasia está intimamente relacionado com diversos mecanismos celulares. A transformação neoplásica surge quando os mecanismos de controle da proliferação celular são perdidos. O câncer se origina por uma sucessão de eventos que modificam o DNA celular e que devido a isso escapam do mecanismo de controle (FARIA; RABENHORST, 2005).

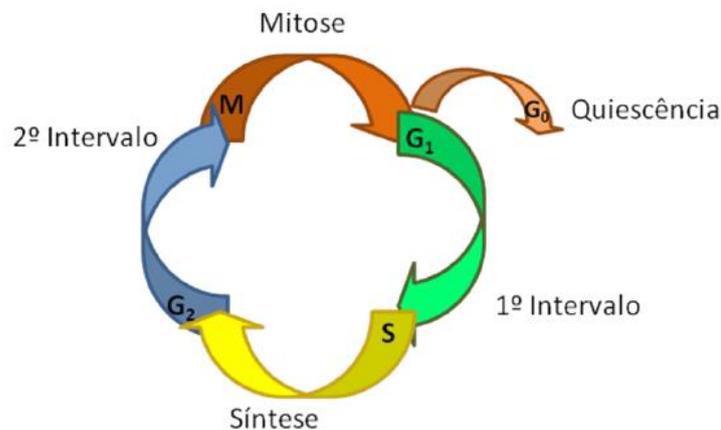
Os oncogenes e os proto-oncogenes são dois tipos de genes muito estudados quanto ao processo de formação de um tumor. Os oncogenes são responsáveis pela malignização, pois promovem a multiplicação desordenada das células devido a uma alteração dos proto-oncogenes, que são genes supressores tumorais. Quando a célula que sofre mutação, altera o seu padrão de ciclo celular e inicia um processo de mitose que transfere a alteração genética para suas descendentes até originar a neoplasia maligna, proliferando excessivamente e originando tumores. O entendimento do ciclo celular e suas fases são necessários para a aplicação dos antineoplásicos, pois alguns são específicos de algumas fases deste ciclo (ALMEIDA et al, 2005; CHABNER et al, 2006).

O ciclo celular compreende o conjunto de transformações pelas quais a célula passa desde a sua formação até sua divisão ou morte. Trata-se de um processo evolutivo e, ao mesmo tempo, conservativo da célula. Este envolve uma sequência de eventos controlados: inicialmente, tem-se a intérfase, que antecede a mitose. A intérfase é período compreendido entre duas divisões celulares consecutivas, que envolve as fases G_0 , G_1 , S e G_2 . A fase G_0 é considerada um estado quiescente, no qual as células adultas maduras podem ficar por tempo indeterminado. Nesse estágio, as células permanecem metabolicamente ativas, mas não se dividem, ou se dividem apenas quando estimuladas por sinais extracelulares, com o propósito de renovação tecidual após lesão ou morte celular. Nesta fase, o DNA encontra-se enovelado, apresentando baixa atividade nuclear. Na fase G_1 , ocorre a preparação das células para a multiplicação, através da produção de fatores de crescimento celulares, que são essenciais para a formação da nova célula. Este intervalo, também, é caracterizado pela transcrição gênica e tradução, levando à síntese de proteínas necessárias para a síntese de DNA. Na fase S, posteriormente, ocorre a duplicação do DNA e síntese proteica. Em seguida, a célula entra na fase G_2 , período no qual as células se preparam para a divisão celular. Neste período ocorre, também, a síntese de componentes para a mitose (FOSTER, 2008).

A mitose é o tipo de divisão em que uma célula dá origem a duas células-filhas com o mesmo número de cromossomos da célula inicial. A mitose está dividida em quatro fases: prófase, metáfase, anáfase e telófase. Na prófase ocorre o início da condensação dos cromossomos, que se unem às fibrilas do fuso pelos centrômeros e se deslocam para a região central da célula, ocorre também a fragmentação da carioteca, desintegração do nucléolo, migração dos pares de centríolos para os polos e a formação do fuso de divisão e do áster pelos microtúbulos (fibras proteicas ao redor do centríolo) do citoesqueleto. Na metáfase, os cromossomos se alinham na região equatorial da célula, onde se ligam às fibras de fuso. Nesta fase, os cromossomos atingem o grau máximo de espiralização. Na anáfase, ocorre a separação das cromátides e migração dos cromossomos para os polos. Na telófase, ocorre o reaparecimento do nucléolo e da carioteca, descondensação dos cromossomos e as fibras de fuso e do áster desaparecem. Os microtúbulos do citoesqueleto se organizam para formar um anel contrátil, que orienta a citocinese,

que consiste na divisão final do citoplasma, formando duas células filhas idênticas à original (Figura 2) (FOSTER, 2008).

Figura 2: Fases do ciclo celular.



Fonte: adaptado de VERMEULEN et al, 2003.

Todo processo de divisão celular requer um intenso controle, que acontece por retroalimentação, e tem por objetivo assegurar que todas as etapas moleculares sejam sequenciais e orientadas corretamente. Essa progressão ordenada através das diversas fases do ciclo é orientada pelas ciclinas, quinases ciclina-dependentes (CDK's) e por seus inibidores (FISCHER et al, 2004; KUMAR et al, 2004).

Cada fase do ciclo possui os chamados *checkpoints*, que podem levar à parada da progressão do ciclo celular e a ativação dos mecanismos de reparo (MALUMBRES et al, 2007). As células vão para a fase seguinte do ciclo de forma irreversível, se passar pelos *checkpoints*. O dano ao DNA e/ou mal funcionamento de organelas e estruturas (falha no fuso mitótico) pode ativar a parada do ciclo e a célula pode entrar em morte celular, caso o dano não seja reparado (FOSTER, 2008). Os pontos de checagem da integridade do DNA operam através do ciclo, especialmente na transição G₁ – S, durante e depois da fase de síntese do DNA, e antes das células entrarem em mitose (G₂ – M) (FISCHER et al, 2004).

Nas células tumorais, os *checkpoints* são frequentemente ignorados, resultando em instabilidade genética e, conseqüente, vantagem proliferativa de

células cancerosas, quando comparadas com as células normais (FISCHER et al, 2004).

As células tumorais mostram uma perda no controle da proliferação celular (ponto de restrição) e, muitas vezes, tornam-se independentes de sinais mitogênicos para a sua progressão através das diferentes fases do ciclo celular (HANAHAN & WEINBERG, 2000; LOURO et al, 2002). A perda do controle da proliferação celular envolve mutações em genes reguladores do ciclo celular, os proto-oncogenes e genes supressores tumorais, o que caracteriza o câncer como uma doença genética (LOURO et al, 2002; FOSTER, 2008). Dessa forma, as alterações nos mecanismos de regulação do ciclo celular tornam a célula apta a passar pelo ciclo celular sem a devida checagem e, portanto, fazendo com que esta acumule uma série de mutações que contribuem para o surgimento das características malignas do tumor, como autossuficiência na sinalização de fatores de crescimento, insensibilidade aos inibidores de crescimento, evasão da morte celular programada (apoptose), potencial replicativo ilimitado, angiogênese, invasão tecidual e metástase (HANAHAN & WEINBERG, 2000; LOURO et al, 2002; FOSTER, 2008). Portanto, as células cancerosas diferem das células normais, pelo fato de continuarem a crescer e se dividir, não obedecendo ao controle biológico natural do organismo (HANAHAN & WEINBERG, 2000).

2.4 TIPOS DE MORTE CELULAR

O equilíbrio entre a proliferação e a morte celular regula e controla o número de células no organismo. A cascata de eventos bioquímicos e fisiológicos, que leva a mudanças na síntese de macromoléculas, na homeostase, regulação do volume celular, e finalmente na perda da viabilidade celular está intimamente relacionada às mudanças morfológicas características de cada tipo de morte celular (BRASILEIRO-FILHO, 2006; TINARI et al, 2008).

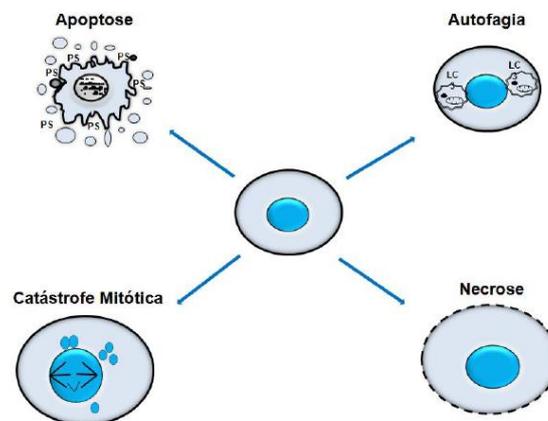
O entendimento do processo de morte celular é de fundamental importância para o tratamento de várias doenças, pois é através da modulação das vias de morte que vários fármacos promissores estão sendo desenvolvidos para doenças como o

câncer, doenças isquêmicas e doenças neurodegenerativas. Os mecanismos complexos que controlam a morte celular estão sendo melhor compreendidos, o que torna cada vez mais evidente que diferentes vias de morte celular têm um papel crítico em múltiplas doenças, inclusive o câncer (KEPP et al, 2011).

Segundo o Comitê de Nomenclatura sobre Morte Celular (NCCD), esta pode ser classificada de acordo com critérios morfológicos, enzimáticos (sem envolvimento de nucleases ou com o envolvimento de distintas classes de proteases como caspases, catepsinas e transglutaminase) e aspectos funcionais (morte programada ou acidental, fisiológico ou patológico) (KROEMER et al, 2009; GALLUZZI et al, 2012).

Tendo como base os critérios mencionados acima, a morte celular pode ser classificada em: autofágica, apoptótica, necrótica ou associada à mitose (catástrofe mitótica). Algumas características estão intimamente relacionadas à células que sofreram algum processo de morte celular, como por exemplo, a perda da integridade da membrana plasmática, fragmentação ou englobamento celular pelas células vizinhas, perda das funções celulares e, conseqüentemente, redução do metabolismo celular (KROEMER, 2009; GALLUZZI et al, 2012) (Figura 3).

Figura 3: Características morfológicas dos principais tipos de morte celular (PS = Fosfatidilserina; LC3 = proteína citoplasmática, que é considerada um marcador da macroautofagia).



Fonte: BRUIN; MEDEMA, 2008.

2.4.1 Autofagia

O termo autofagia é derivado do grego, “Auto” (auto) e “fagia” (comer). Refere-se à via de degradação lisossômica que é essencial para a sobrevivência, desenvolvimento, diferenciação e homeostase celular (KLIONSKY, 2008). A autofagia é uma via catabólica essencial que degrada componentes celulares dentro do lisossomo, onde as organelas celulares que já não se encontram funcionais são capturadas por uma membrana, sendo decompostas. Existem três vias principais de degradação, as quais diferem essencialmente nos meios de entrega de carga para o lisossomo, que são macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas (CMA) (GALLUZZI et al, 2011; GALLUZZI et al, 2012; MURROW; DEBNATH, 2013).

A macroautofagia é iniciada pela formação de uma membrana em torno de proteínas e organelas, designada de fagóforo. Este pode ser originado a partir da membrana citoplasmática, do retículo endoplasmático ou da membrana mitocondrial externa. A fusão das extremidades do fagóforo origina a formação de uma estrutura fechada com dupla membrana, o autofagossomo. A membrana exterior do autofagossomo se funde com um lisossomo, originando o autolisossomo. O seu conteúdo é, posteriormente, degradado por enzimas lisossomais (VAN LIMBERGEN et al, 2009).

A microautofagia é uma via conservada em organismos desde leveduras a mamíferos, assim como a macroautofagia. Na microautofagia, os componentes citosólicos são incorporados diretamente em lisossomas, através de invaginações da membrana lisossomal (VAN LIMBERGEN et al, 2009).

A autofagia mediada por chaperonas apenas é observada em células de mamíferos. Esta é mediada por chaperonas específicas, que permitem a translocação de determinadas proteínas para o lúmen lisossomal através da membrana, por interação com o receptor LAMP-2, resultando no desenrolamento das proteínas e sua degradação (VALDOR; MACIAN, 2012).

Em relação ao câncer, as células podem sofrer um processo autofágico devido ao aumento descontrolado do metabolismo. Há, também, alguns indícios de

morte celular por autofagia em células onde a apoptose não é funcional (SHIMIZU et al, 2004; GRANDER et al, 2005), ou até mesmo indução da autofagia antes da apoptose (LAANE et al, 2009; ZHAO et al, 2010), o que configura uma intrínseca relação entre esses dois processos de morte celular. Alguns estudos tem mostrado que a autofagia é necessária em alguns casos específicos para que ocorra a morte celular programada; no entanto, a maior parte das mortes programadas não é mediada por autofagia mesmo que a morte celular apresente características de autofagia (EISENBERG-LERNER, 2009; GUMP; THORBURN, 2011). Sendo assim, há três critérios necessários para caracterizar a morte celular por autofagia: primeiro, a morte celular deve ocorrer de forma independente da apoptose; segundo, deve haver um aumento do fluxo autofágico e não simplesmente o aumento de marcadores autofágicos; e terceiro, a inibição genética ou química da autofagia deve ser capaz de suprimir a morte celular. Estes três procedimentos são cruciais para poder discriminar se a autofagia determina a morte celular ou está alterando a dinâmica da morte (SHEN; CODOGNO, 2011).

2.4.2 Apoptose

A apoptose é um importante fenômeno, bem caracterizado, na citotoxicidade induzida por fármacos anticâncer (MADDIKA et al, 2007), sendo também um processo seletivo de deleção celular fisiológica (HENGARTNER, 2000), visto que ocorre para o controle da população celular e do tecido (VERMES et al, 2000), desenvolvimento embrionário (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004), dentre outros processos fisiológicos e patológicos (OUYANG et al, 2012). Foi primeiramente descrita por Kerr e colaboradores em 1972 (KERR et al, 1972).

De origem grega “*apo*” (de) e “*ptose*” (cair), a apoptose é conhecida como morte celular programada, fenômeno esse em que a célula é estimulada a acionar mecanismos que culminam com sua morte. A célula em apoptose não sofre autólise, ela é fragmentada, ocasionando a formação de corpos apoptóticos, que são, posteriormente, endocitados por células vizinhas, sem desencadear quimiotatismo nem ativação de células fagocitárias, diferentemente da necrose (KERR et al, 1972; BRASILEIRO-FILHO, 2006; DANIAL; KORSMEYER, 2004).

A morte celular através da via apoptótica pode ser identificada por uma série de características marcantes e coordenadas. Neste processo, pode-se observar a retração celular e consequente perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. As organelas mantêm a morfologia, porém em alguns casos, as mitocôndrias podem apresentar ruptura na membrana externa. A cromatina sofre condensação, além disso, na membrana plasmática são formados prolongamentos, os chamados “*blebs*”, que aumentam de tamanho e se rompem, originando os corpos apoptóticos, onde são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar processo inflamatório (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004; OUYANG et al, 2012).

Atualmente, são conhecidas duas vias moleculares que levam as células a sofrerem o processo de morte por apoptose, são elas, as vias extrínseca ou via de receptor de morte e via intrínseca ou via mitocondrial (MARTELLI et al, 2001; FADEEL; ORRENIUS, 2005; ASHKENAZI; HERBST, 2008; LIU et al, 2011) (Figura 4).

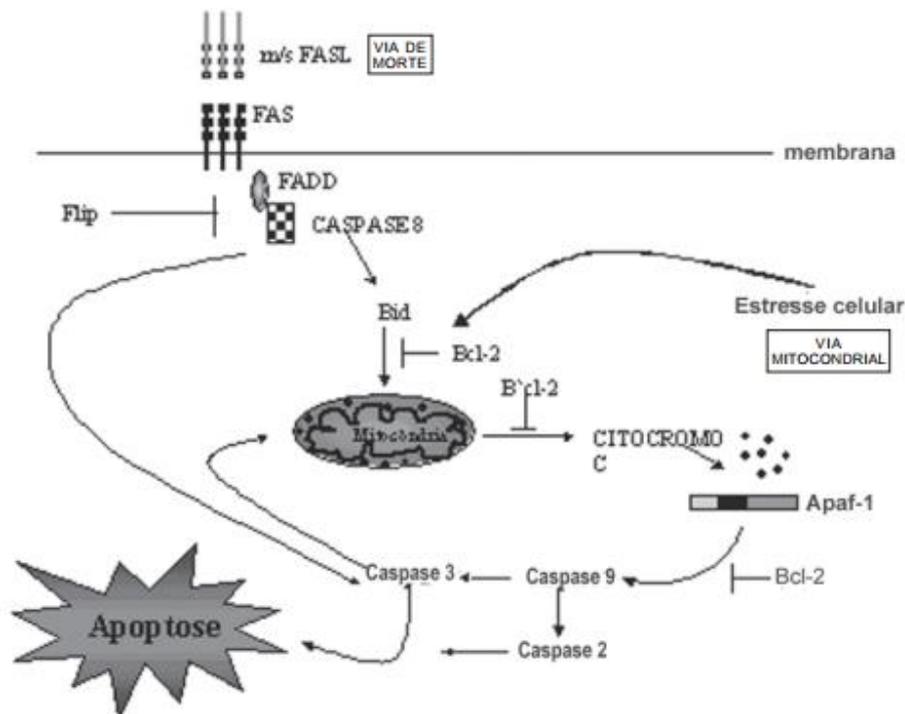
Quando a via intrínseca é ativada, o primeiro passo é o aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial, seguida da liberação de proteínas que normalmente estavam localizadas no espaço intermembranar [citocromo c, fator de indução da apoptose, Smac/DIABLO (*Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP Binding Protein with Low Propidium iodidel*), entre outros]. O citocromo c se liga a Apaf-1 (*Apoptotic peptidase activating fator 1*) e forma um complexo multicatalítico chamado apoptossomo. Este complexo ativa a caspase-9 a partir de sua forma zimogênica pró-caspase-9. Então, a caspase-9 cliva as caspases efetoras -3, -6 e -7, ativando-as para realizar a fragmentação do DNA (KUMAR et al, 2004; ZIEGLER; GROSCURTH, 2004; BRASILEIRO-FILHO, 2006; RIEDL; SALVESEN, 2007; LOPEZ; TAIT, 2015) (Figura 4). Esse processo é regulado por moléculas anti-apoptóticas (proteínas Bcl-2, Bcl-xL e Mcl-1), e pró-apoptóticas (Bax, Bad e BIM) (YOULE; STRASSER, 2008; TAIT; GREEN, 2010).

A via extrínseca, também denominada via do receptor de morte, envolve a ativação de receptores de membrana. Eles são membros da superfamília de receptores de fatores de necrose tumoral (*Tumor Necrosis Factor receptor - rTNF*). Estão inclusos nessa família os receptores de membrana rTNF-1, FAZ (CD95), TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*), entre outros. Esses receptores possuem um domínio distinto dentro do citoplasma denominado de domínio de morte (*Death Domain - DD*) que contém uma sequência de 65 aminoácidos. Após a associação dos

receptores de membrana ao seu correspondente DD, acontece uma mudança conformacional nos receptores, o que promove o recrutamento de uma molécula adaptadora (FAZ) que irá se associar com o DD, formando o FADD. Este complexo formado é o responsável por iniciar a cascata de caspases, pois o FADD se liga a procaspase-8 e forma caspase-8, ativando as caspases efetoras -3, -6 e -7 (STRASSER et al, 2000; ASHKENAZI, 2002; GUIMARÃES; LINDEN, 2004; ZIEGLER; GROSCURTH, 2004) (Figura 4).

A perda da apoptose é uma das características da proliferação tumoral e, por isso, tem se tornado um alvo importante nas pesquisas com o objetivo de desenvolver novos tratamentos para o câncer. Sendo assim, a aplicabilidade clínica de quimioterápicos é dependente da habilidade para disparar a apoptose (WANG et al, 2012).

Figura 4: Representação esquemática com as principais vias de ativação da apoptose (intrínseca e extrínseca).



Fonte: adaptado de BERGANTINI et al, 2005.

2.4.3 Necrose

Durante muito tempo a necrose foi classificada como um mecanismo de morte acidental. Esta é caracterizada por envolver a perda da integridade da membrana celular, inchaço citoplasmático, formação de vacúolos, inchaço do retículo endoplasmático, distensão ou rompimento mitocondrial, lise dos lisossomos e liberação do conteúdo citoplasmático para o tecido circundante (MAJNO; JORIS, 1995; TRUMP et al, 1997) desencadeando a inflamação (KUROSAKA et al, 2003).

Atualmente, está claro que a necrose pode ocorrer de forma regulada, a partir de um mecanismo chamado “necroptose”, cuja função é consideravelmente importante em processos fisiológicos e patológicos. O termo “necroptose” tem sido utilizado como sinônimo de necrose programada que depende da atividade da Proteína Quinase e da interação com Receptor-1 (RIPK1) (KROEMER et al, 2009).

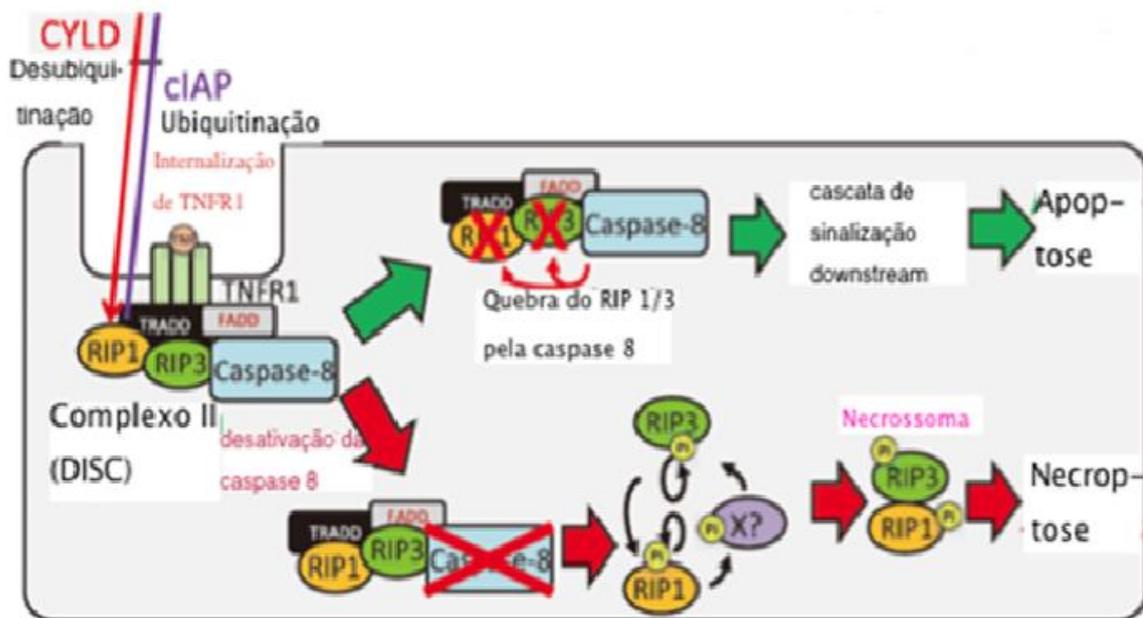
Marcadores clássicos de apoptose, como a condensação da cromatina e fragmentação nucleossomal de DNA não são vistos em morte via necrose. Contudo, assim como a apoptose, células necróticas externalizam a fosfatidilserina antes da permeabilização da membrana plasmática, promovendo, assim, o seu reconhecimento pelos fagócitos (GALLUZZI et al, 2011).

Atualmente, os mecanismos moleculares responsáveis pela necroptose estão em processo de identificação. A ativação da necroptose pode acontecer pelos mesmos ligantes que ativam a apoptose, como o Fator de Necrose Tumoral (TNF). Nessa via, o ligante TNF- se une ao receptor TNFR1; dessa forma, essa interação aciona o recrutamento das proteínas de Domínio de Morte Associado à TNFR (TRADD), RIP-1, Proteínas inibidoras de apoptose (IAPs), Fator associado à TNFR5 (TRAF-5), que constituem uma estrutura chamada de complexo I. As proteínas IAPs realizam a poliubiquitinação de RIP-1, acionando a ativação de NF- κ B. No entanto, quando RIP-1 sofre desubiquitinação, a composição do complexo se modifica passando a se chamar complexo II (GALLUZZI et al, 2011).

O complexo II, também chamado de Complexo de Sinalização de Indução de Morte (DISC), é constituído por RIP-1, Proteína Quinase de Interação com Receptor-3 (RIPK-3), TRADD, Domínio de Morte associada ao CD95 (FADD) e caspase-8

(CASP8). Na presença da CASP8 ativa, RIP-1 e RIP-3 são desativados, acarretando em apoptose. Contudo, quando a CASP8 não pode ser ativada, devido às condições genéticas ou farmacológicas, RIP1 e RIP3 são fosforiladas, formando assim um complexo molecular chamado de necrossoma. O necrossoma, por sua vez, provoca o aparecimento de múltiplos sinais pró-necróticos, tais como: permeabilização da membrana lisossomal e liberação citosólica de hidrolases lisossomais, ativação de esfingomielinases (SMases) e alterações metabólicas, incluindo o DNA, proteínas, lipídeos, promovendo a redução exagerada dos níveis de ATP (GALLUZZI et al, 2011; NIKOLETOPOULOU et al, 2013).

Figura 5: Vias de sinalização molecular da necroptose.



Fonte: TSUDA et al, 2012.

2.4.4 Catástrofe mitótica

Considerada um tipo de morte celular que ocorre durante a mitose ou durante a intérfase subsequente, a catástrofe mitótica é resultante da segregação cromossômica anormal ou de danos induzidos à molécula de DNA, acoplada a

defeitos nos *checkpoints*. Esses danos normalmente induzem a alterações morfológicas, como formação de células com múltiplos micronúcleos (multinucleação) (CASTEDO et al, 2004; KROEMER et al, 2009; GALLUZZI et al, 2012).

A indução da catástrofe mitótica pode ser provocada por danos causados por agentes hiperpolimerizadores (taxanos, epotilones), agentes despolimerizadores (como alcaloides da vinca e colchicina) e por agentes que causam danos ao DNA. Células tumorais são, na maioria das vezes, deficientes nos *checkpoints* do ciclo celular, o que as tornam mais suscetíveis à mitose catastrófica após tratamento com fármacos antineoplásicos (CASTEDO et al, 2004).

2.5 A QUIMIOTERAPIA E NOVAS ALTERNATIVAS PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER

Os mais diversos tipos de câncer representam, ainda hoje, um desafio para a ciência e para a medicina, devido ao fato de que para a maioria dos tumores ainda não foi encontrada a cura e, além disso, os tratamentos utilizados produzem efeitos colaterais muito prejudiciais ao paciente, principalmente aos mais debilitados, em virtude da citotoxicidade das drogas nas células não-tumorais (AL-TEL, 2010).

A utilização de agentes químicos, isolados ou em combinação com o objetivo de tratar os tumores malignos, denomina-se quimioterapia antineoplásica. Difere-se da radioterapia e da terapia cirúrgica por ser um tratamento sistêmico e cada vez mais tem se tornado uma das mais importantes e promissoras ferramentas de combate ao câncer do mundo (BONASSA; SANTANA, 2005).

Define-se quimioterapia como sendo a administração de uma ou várias drogas citotóxicas de modo combinado. Esta administração pode ser via oral, intravenosa, intramuscular ou intradérmica. Este tipo de tratamento constitui uma das mais relevantes modalidades terapêuticas empregadas na clínica oncológica (BRASIL, 2011; ESTANQUEIRO; AMARAL, 2015). Durante o tratamento, os quimioterápicos atingem todas as partes do corpo, com o propósito de eliminar as células tumorais onde quer que elas estejam, podendo atuar em diversas etapas do metabolismo celular. Eles normalmente interferem na síntese ou na transcrição do DNA ou

interferem diretamente na produção de proteínas, agindo principalmente nas células em processo de divisão (AZEVEDO, 2004).

O sucesso da quimioterapia acaba se tornando limitado, devido à resistência à droga que as células tumorais apresentam e aos efeitos colaterais provocados pela citotoxicidade das drogas às células normais (KUMAR; KAUR; SILAKARI, 2014). Os medicamentos quimioterápicos bloqueiam alguns processos metabólicos que são comuns tanto aos tumores quanto aos tecidos saudáveis, afetando de forma indesejada, os tecidos do corpo com maiores índices de renovação, como a medula óssea, couro cabeludo, pele e mucosas, e provocando efeitos colaterais, que podem variar em frequência e intensidade para cada indivíduo (HAMERSCHLAK et al, 2006).

Os sintomas mais comuns provocados pelo tratamento quimioterápico são: anemia, fadiga, suscetibilidade a infecções (leucopenia), lesões orais, náuseas e vômitos, diarreia e queda de cabelo (alopécia). Alguns desses sintomas são transitórios, ocorrendo somente durante alguns dias após a administração do tratamento (HAMERSCHLAK et al, 2006).

A imunoterapia, também chamada de vacina contra o câncer, é outra estratégia de combate ao câncer que tem por objetivo principal estimular o sistema imunológico dos pacientes a destruir células transformadas. A resposta imune desencadeada pode proteger também os pacientes contra metástases e recidivas tumorais (HERR; MORALES, 2008; UTKU, 2011). A hormonioterapia também tem sido utilizada no combate ao câncer e quando combinada com a radioterapia tem apresentado resultados mais satisfatórios (NAIKI et al, 2012; FRANCO; SOUHAMI, 2015). Além disso, as terapias com fotorradiação (KUSUZAKI et al, 2007), terapia gênica, uso de nanocarreadores e liberação controlada de fármacos vêm sendo testados para uso clínico (ACS, 2014; ESTANQUEIRO; AMARAL, 2015).

Apesar do considerável arsenal de drogas já existentes para o tratamento do câncer, em muitos casos, o sucesso terapêutico não é alcançado por causa de falhas nos tratamentos, altos índices de recidivas, redução da sobrevida dos pacientes e dos efeitos adversos, o que leva a uma contínua busca por novos fármacos (SALGALLER; LODGER, 1998). O fármaco ideal deve aumentar a especificidade, protegendo tecidos normais, minimizar o desconforto dos pacientes e aumentar a eficácia, resultando na

erradicação do tumor (BRANNON-PEPPAS; BLANCHETTE, 2004; SANTINI et al, 2007).

O aumento do conhecimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos no câncer serve como base para procura de novas estratégias terapêuticas mais eficientes, seja pelo emprego de novas substâncias ou por novos métodos de preparação e administração (ROEDER et al, 2009; ESTANQUEIRO; AMARAL, 2015).

Em tempos passados e, também, recentemente um amplo esforço tem sido feito quanto ao desenvolvimento de tecnologias derivadas do estudo de compostos químicos, a exemplo dos compostos mesoiônicos, ampliando a possibilidade de aplicação no tratamento frente à progressão cancerígena (BAKER; OLLIS, 1957; BARBOSA et al, 2009).

2.6 COMPOSTOS HETEROCÍCLICOS

A atividade biológica de inúmeros compostos está relacionada à presença de grupos heterocíclicos em sua estrutura. Os compostos heterocíclicos possuem propriedades químicas caracterizadas por grande reatividade. As mais importantes reações nos seres vivos, como a provisão de energia, transmissão de impulsos nervosos, visão, metabolismo e transferência de informação hereditária ocorrem com a participação de grupos heterocíclicos (POZHARSKÜ et al, 1997).

Compostos heterocíclicos naturais apresentam diversas aplicações como terapêuticos, conferindo vários benefícios e, também, efeitos colaterais indesejáveis. Para resolver os problemas relacionados à toxicidade e com a finalidade de desenvolver substâncias com aplicação farmacológica, surgiram os compostos similares sintetizados em laboratório, que apresentam a vantagem de possibilitar a realização de substituições estruturais afim de se obter compostos com os efeitos desejados (POZHARSKÜ et al, 1997).

Muitos destes compostos já são fármacos amplamente utilizados na clínica, apresentando atividades farmacológicas diversificadas, tais como: anti-hipertensivo (Losartan); antiviral (Ribavirina); antitumoral (Carbamato de fluorouracila); antifúngica (Posaconazol); anti-inflamatória e analgésica (Dipirona); e

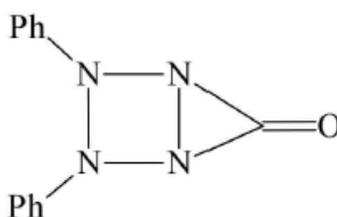
antiprotozoária (Metronidazol) (ROMÃO et al, 2009); PEIXOTO et al, 2016). Tendo como objetivo principal a busca pelo tratamento de diversas doenças, muitos compostos heterocíclicos têm sido sintetizados em laboratório. Dentre estes, os chamados compostos mesoiônicos se destacam por sua aplicação terapêutica.

2.6.1 Compostos Mesoiônicos

2.6.1.1 Histórico

A história da química dos compostos mesoiônicos teve início quando Fischer e Besthorn, em 1882, sintetizaram o primeiro composto atualmente classificado como mesoiônico, denominado a princípio como “desidroitizona” e representado por uma estrutura bicíclica (figura 6), que se enquadrava convenientemente entre moléculas orgânicas descritas por estruturas covalentes e/ou polares.

Figura 6: Estrutura bicíclica do primeiro composto mesoiônico sintetizado por Fischer e Besthorn em 1882.

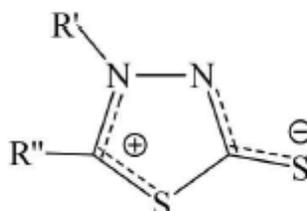


Fonte: FISCHER; BESTHORN, 1882.

Em 1895, Busch sintetizou os compostos atualmente conhecidos como mesoiônicos 1,3,4-tiadiazólio-2-tiolatos (figura 7), intitulando-os, na época, “endo-tiadihidrotiadiazólio”, e formulando para os mesmos as estruturas bicíclicas

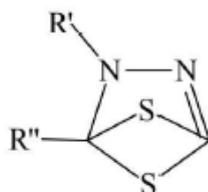
improváveis apresentadas nas figuras 8 e/ou 9 (BUSCH, 1895, 1899, 1905, 1906; BUSCH; SCHNEIDER, 1903).

Figura 7: Estrutura química dos compostos mesoiônicos 1,3,4-tiadiazólio-2-tiolato.



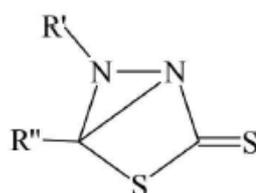
Fonte: adaptado de BUSCH, 1895.

Figura 8: Estrutura bicíclica I, do composto mesoiônico, intitulada “endo-tiadihidrotiadiazólio”, proposta por Busch, em 1895.



Fonte: adaptado de BUSCH, 1895.

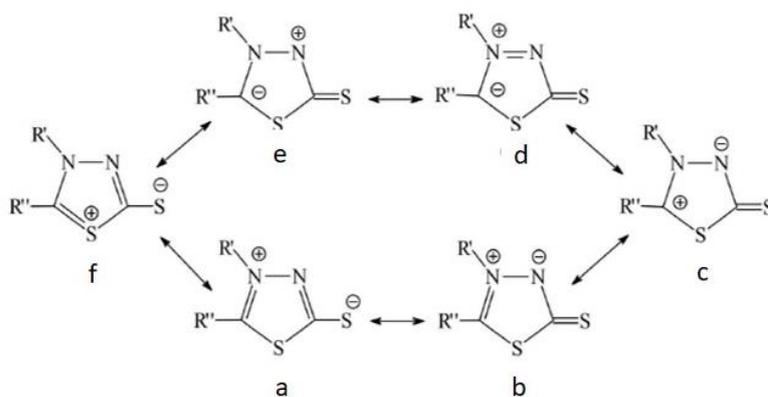
Figura 9: Estrutura bicíclica II, do composto mesoiônico, intitulada “endo-tiadihidrotiadiazólio”, proposta por Busch, em 1895.



Fonte: adaptado de BUSCH, 1895.

Ao analisar os compostos sintetizados por Busch, Schöenberg (1938) sugeriu, a partir de conceitos teóricos, que os mesmos compostos poderiam ser melhor representados por um dos anéis monocíclicos de cinco membros de híbridos de ressonância da estrutura apresentada na figura 7 (10a – 10f).

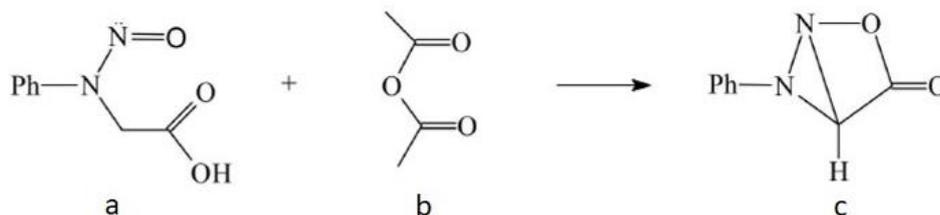
Figura 10: Estruturas dos compostos mesoiônicos propostas Schöenberg, em 1938.



Fonte: adaptado de SCHÖENBERG, 1938.

A estrutura bicíclica (figura 11c) foi atribuída, por Earl e Mackney (1935), ao produto de reação entre a N-nitroso-N-fenil-glicina (figura 11a) e o anidrido acético (figura 11b). Em seguida, eles observaram que esta mesma reação correspondia a uma ciclo-desidratação e deram a esta estrutura (figura 11c) o nome de “Sydnone”, homenageando a Universidade de Sydney, na Austrália, local onde a mesma foi sintetizada.

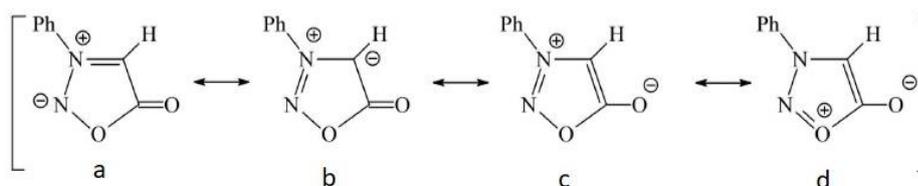
Figura 11: Reação para obtenção de estrutura bicíclica (Sydnone) proposta por Earl e Mackney, em 1935.



Fonte: adaptado de EARL e MACKNEY, 1935.

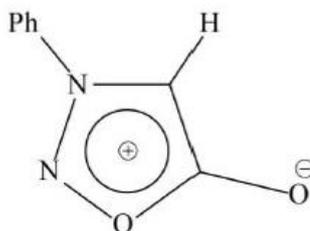
Barker e Ollis (1949-1957), ao analisar a estrutura da “Sydnone”, proposta por Earl e Macney (1935), através de estudos de ultravioleta, consideraram a estrutura insatisfatória e sugeriram que estes compostos tinham caráter aromático, incluindo-os na família de compostos heterocíclicos. De acordo com esta classificação, estes compostos não podem ser representados adequadamente por estruturas totalmente covalentes ou totalmente polares. Eles propuseram, então, que a sidnona fosse representada como híbrida de ressonância das diversas formas canônicas (Figura 12a – 12d), ou seja, envolvendo no anel desta estrutura a presença de um caráter aromático devido ao tipo $(4n + 2)$ de elétrons π , onde n é igual a 1 (Figura 13).

Figura 12: Representação híbrida de ressonância de diversas formas canônicas das sidnonas, proposta por Barker e Ollis (1949-1957).



Fonte: adaptado de BARKER e OLLIS, 1949-1957.

Figura 13: Representação híbrida da estrutura das sidnonas, envolvendo no anel desta estrutura a presença de um caráter aromático, proposta por Barker e Ollis (1949-1957).



Fonte: adaptado de BARKER e OLLIS, 1949-1957.

Grandes avanços tem acontecido nos estudos realizados, principalmente a partir da década de 60, com relação à síntese, determinação estrutural e aplicação dos compostos mesoiônicos.

2.6.1.2 Conceito dados para compostos mesoiônicos

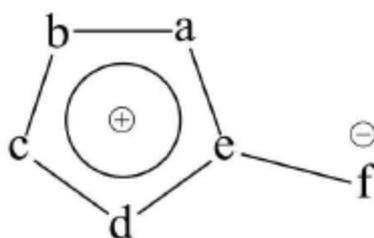
É sabido que ao longo dos anos o conceito dos compostos mesoiônicos tem sofrido diversos ajustes. Estudos realizados por Baker e Ollis (1957) incluíram nesta classe de substâncias heterocíclicas os compostos com características ao mesmo tempo mesoméricas e iônicas, classificando-os como “compostos mesoiônicos”.

Nesta época, o interesse por definir a estrutura exata que caracterizasse esta classe de compostos gerou diversas publicações. A primeira definição mais detalhada dos compostos mesoiônicos foi proposta por Baker e Ollis (1957), sendo incluídos nesta classe os compostos que: possuem um anel aromático de 5 ou 6 membros que não seja capaz de ser representado totalmente por uma estrutura covalente; onde todos os átomos do anel possuam elétrons π para formar o sexteto deslocalizado; o anel tem uma carga parcial positiva que é contrabalanceada por uma carga negativa correspondente em um átomo ou grupo exocíclico; o anel deve ser plano ou quase plano e possuir considerável energia de ressonância.

Ollis e Ramsden (1976) propuseram uma modificação nesta definição. O termo “mesoiônico” ficaria restrito a anéis heterocíclicos com apenas cinco membros.

Posteriormente, Potts (1978) classificou os compostos mesoiônicos como um sistema heterocíclico com cinco membros, não podendo ser representados por estruturas normais, covalentes ou polares e descrevendo-os como híbridos de todas as formas possíveis carregadas, envolvendo no anel a presença de um caráter aromático do tipo $(4n + 2)$ elétrons π , sendo classificados como betaínas heteroaromáticas representadas pela estrutura geral abaixo, onde “a”, “b”, “c”, “d”, “e” e “f” são átomos, grupos de átomos, derivados do carbono ou heteroátomos (Figura 14).

Figura 14: Estrutura do composto mesoiônico proposta por Potts (1978).



Fonte: adaptado de POTTS, 1978.

As betaínas são moléculas neutras conjugadas que podem ser representadas somente por estruturas dipolares nas quais as cargas positivas e negativas estão restritamente deslocalizadas dentro de um sistema π de elétrons. Sendo assim, os compostos mesoiônicos tem sido descritos como betaínas heterocíclicas mesoméricas conjugadas (OLLIS; RAMSDEN, 1976).

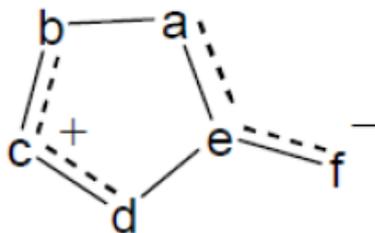
Duas novas definições para essa classe de compostos foram lançadas em seguida: a primeira definição foi baseada principalmente em evidências químicas, propondo que os “compostos mesoiônicos são betaínas com anéis de cinco membros poli-heteroatômicos, estabilizados por deslocalização de elétrons e com momentos dipolares, nos quais elétrons e uma carga positiva estão deslocalizados sobre parte

do anel e sobre grupos ligantes e nos quais elétrons e uma carga negativa, formalmente em um átomo α (normalmente um heteroátomo), estão deslocalizados sobre a parte remanescente do anel. A deslocalização de elétrons e carga negativa podem ser estendidas numa cadeia lateral ligada ao átomo α (SIMAS et al, 1991). A segunda definição foi baseada em conceitos teóricos, estabelecendo que os compostos mesoiônicos são aqueles caracterizados por: um anel plano de cinco membros com pelo menos uma cadeia lateral, cujo átomo α também está situado no plano; um momento dipolar e um alto momento quadrupolar (SIMAS et al, 1993).

Outro conceito para essa classe de compostos foi definido com base nos estudos experimentais e teóricos apresentados anteriormente: compostos mesoiônicos são betaínas heterocíclicas planas de cinco membros, com pelo menos uma cadeia lateral, cujo átomo α também está no mesmo plano do anel. Os elétrons estão deslocalizados sobre duas regiões separadas por duas ligações essencialmente simples: uma região que inclui o átomo α da cadeia lateral, que está associada com o HOMO e uma carga π negativa; e outra região que está associada com o LUMO e uma carga π positiva. É importante destacar que, apesar dos compostos mesoiônicos serem altamente estabilizados por deslocalização de elétrons e cargas, eles não são aromáticos (SIMAS et al, 1996).

Pesquisas mais recentes corroboram com os estudos anteriores e afirmam que estes compostos possuem características estruturais bastante peculiares e são considerados um grupo distinto de heterocíclicos pertencentes à classe das betaínas, que constituem uma classe que apresenta um grupo amina na cadeia cíclica e não possuem anel aromático (BADAMI, 2006; PEIXOTO et al, 2016). Na figura 15, é possível verificar, através de uma estrutura básica, esta definição do composto mesoiônico, onde “a”, “b”, “c”, “d”, “e” e “f” são, normalmente, átomos de C (Carbono), N (Nitrogênio), O (Oxigênio), S (Enxofre) ou Se (Selênio) (LIRA et al, 2002; BHOSALE et al, 2012; PEIXOTO et al, 2016).

Figura 15: Esquema representativo da estrutura básica de um composto mesoiônico.

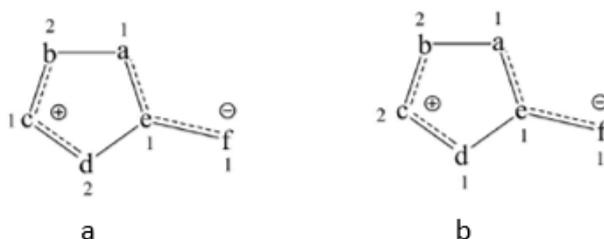


Fonte: LIRA et al, 2002.

2.6.1.3 Classificação dos compostos mesoiônicos

De acordo com a classificação proposta por Ollis e Ramsden (OLLIS e RAMSDEN, 1976), os compostos mesoiônicos estão atualmente divididos em dois grupos, dependendo das suas ligações e reatividade químicas: tipo A (Figura 16a) e tipo B (Figura 16b), onde “a”, “b”, “c”, “d”, “e” e “f” podem ser átomos de “C” (Carbono), “N” (Nitrogênio), “O” (Oxigênio), “S” (Enxofre) ou “Se” (Selênio) e “1” e “2” representam o número de elétrons π com que cada átomo contribui, num total de oito elétrons deslocalizados nas duas regiões do sistema, dos quais seis desses elétrons pertencem ao anel de cinco membros e dois se encontram no átomo exocíclico, deslocalizados no sistema conjugado (Figura 16a – 16b, respectivamente).

Figura 16: Representação estrutural básica dos dois grupos distintos de compostos mesoiônicos com base na classificação proposta por Ollis e Ramsden (1976).

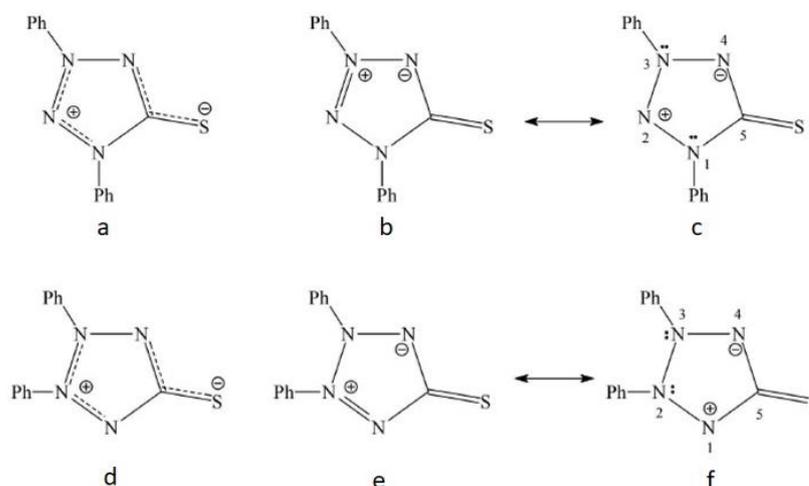


Fonte: adaptado de OLLIS e RAMSDEN (1976).

Existem propriedades que diferenciam os dois grupos de mesoiônicos, uma delas é o tautomerismo: o composto mesoiônico do tipo A apresenta a forma fechada como tautômero mais estável; já o tipo B apresenta a forma tautomérica acíclica como sendo a mais estável (OLLIS e RAMSDEN, 1976).

Para compreender melhor esta diferença na tautomeria dos dois tipos de compostos mesoiônicos, exemplificamos o composto 1,3-difenil-1,2,3,4-tetrazólio-5-tiolato (Figura 17c), que representa os compostos do tipo A e o seu isômero desidrotizona que representa os compostos do tipo B (Figura 17f). Observa-se ao analisar as formas “17c” e “17f” que a contribuição dos dois pares de elétrons na estrutura “17c” dos átomos de nitrogênio 1 e 3 (“b” e “d” na estrutura “16a”) está de acordo com o proposto por Ollis e Ramsden (1976) para mesoiônicos do tipo A, enquanto que na estrutura “17f” estes pares de elétrons estão localizados nos átomos de nitrogênio 2 e 3 (“b” e “c” na estrutura “16b”), correspondendo aos compostos mesoiônicos do tipo B.

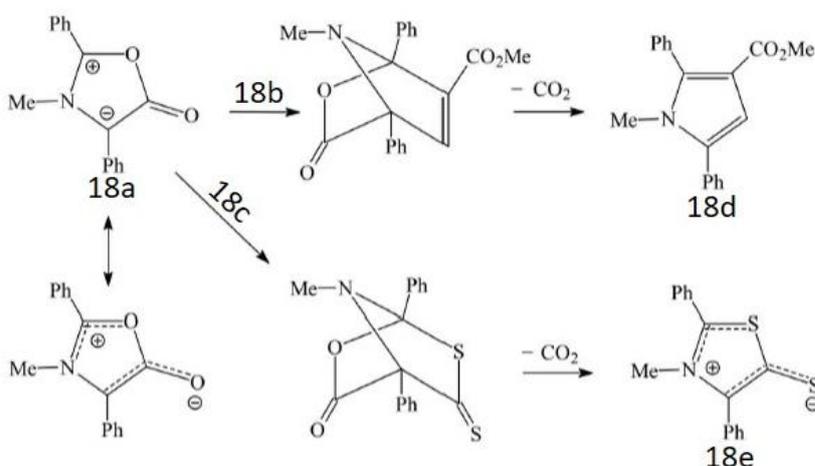
Figura 17: Tautomeria do composto 1,3-difenil-1,2,3,4-tetrazólio-5-tiolato e da desidrotizona, representando, respectivamente, os compostos mesoiônicos dos tipos A e B.



Fonte: adaptado de OLLIS e RAMSDEN (1976).

Os compostos do tipo A também são caracterizados quimicamente principalmente por participarem nas reações de cicloadição e cicloreversão 1,3-dipolar (OLLIS e RAMSDEN, 1976). Na figura abaixo, tem-se um exemplo da reação do mesoiônico 2,4-difenil-3-metil-1,3-oxazólio-5-olato (18a) com os dipolarófilos $\text{H}\equiv\text{C}-\text{CO}_2\text{Me}$ (18b) e CS_2 (18c), gerando os produtos “18d” e “18e”, respectivamente (Figura 18).

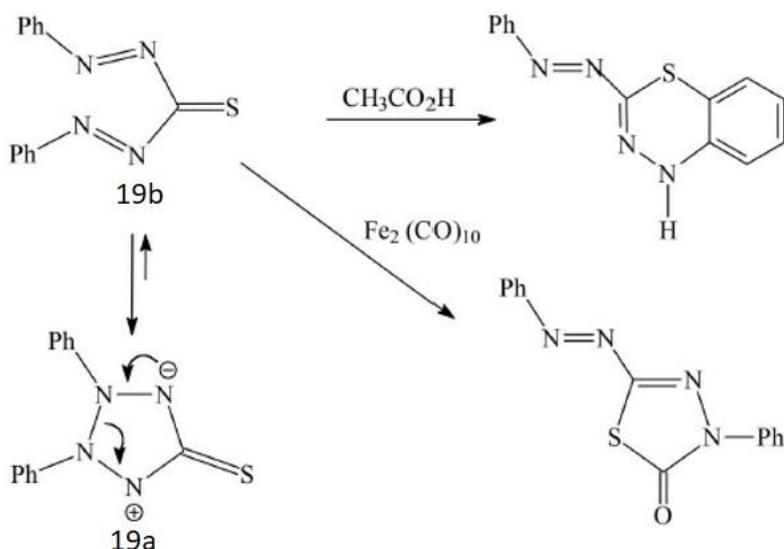
Figura 18: Exemplo para caracterização química dos compostos mesoiônicos do tipo A.



Fonte: adaptado de HUISGEN, 1976.

Já os compostos mesoiônicos do tipo B apresentam propriedades químicas diferentes daquelas apresentadas pelos compostos do tipo A. Eles sofrem abertura do anel para formar tautômeros acíclicos (OLLIS e RAMSDEN, 1976). Na figura 19 é possível exemplificar, através da reação de desidroditizona, o equilíbrio envolvendo os tautômeros “19a” e “19b”.

Figura 19: Reação de desidroditizona, apresentando o equilíbrio entre os tautômeros “19a” e “19b”.



Fonte: adaptado de OLLIS e RAMSDEN, 1976.

Ao substituir corretamente os átomos ou grupos de átomos “a”, “b”, “c”, “d”, “e” e “f” nas estruturas anteriormente apresentadas, “16a” e “16b”, por átomos de carbono (C), nitrogênio (N), oxigênio (O) e enxofre (S), obtêm-se diversas estruturas mesoiônicas possíveis diferentes do tipo A e do tipo B. Nas tabelas 1 e 2 é possível visualizar alguns sistemas mesoiônicos do tipo A e B, respectivamente.

Tabela 1: Alguns sistemas mesoiônicos descritos na literatura (OLLIS e RAMSDEN, 1976).

SISTEMA	ÁTOMOS OU GRUPOS DE ÁTOMOS					
Exemplo	a	b	c	d	e	f
OXAZÓLIO						
1,3-oxazólio-5-olato	O	CR	NR	CR	C	O

DIAZÓLIO

1,3-diazólio-4-olato	NR	CR	NR	CR	C	O
----------------------	----	----	----	----	---	---

TIAZÓLIO

1,3-tiazólio-5-tiolato	S	CR	NR	CR	C	S
------------------------	---	----	----	----	---	---

DITIÓLIO

1,3-ditiólio-4olato	S	CR	S	CR	C	O
---------------------	---	----	---	----	---	---

OXADIAZÓLIO

1,2,3-oxadiazólio-2-tiolato	O	CR	NR	N	C	S
-----------------------------	---	----	----	---	---	---

OXATIAZÓLIO

1,2,3-oxatiazólio-5-olato	O	N	S	CR	C	O
---------------------------	---	---	---	----	---	---

TRIAZÓLIO

1,2,3-triazólio-4-aminida	NR	N	NR	CR	C	NR
---------------------------	----	---	----	----	---	----

TIADIAZÓLIO

1,3,4-tiadiazólio-4-olato	S	CR	NR	N	C	O
---------------------------	---	----	----	---	---	---

OXATRIAZÓLIO

1,2,3,4-oxatriazólio-5-tiolato	O	N	NR	N	C	S
--------------------------------	---	---	----	---	---	---

TETRAZÓLIO

1,2,3,4-tetrazólio-5-aminida	NR	N	NR	N	C	NR
------------------------------	----	---	----	---	---	----

TIATRIAZÓLIO

1,2,3,4-tiatrizólio-5-olato	S	N	NR	N	C	O
-----------------------------	---	---	----	---	---	---

DITIADIAZÓLIO

1,2,3,4-ditiadiazólio-5-olato	S	N	S	N	C	O
-------------------------------	---	---	---	---	---	---

DIOXÓLIO

1,3-dioxólio-4-olato	O	CR	O	CR	C	O
----------------------	---	----	---	----	---	---

OXATIÓLIO

1,3-oxatólio-5-olato	O	CR	S	CR	C	O
----------------------	---	----	---	----	---	---

SELENAZÓLIO

	NR	CR	Se	CR	C	O
--	----	----	----	----	---	---

1,3-selenazólio-4-
olato

Onde, “a”, “b”, “c”, “d”, “e” e “f” correspondem a átomos ou grupo de átomos presentes na estrutura dos sistemas mesoiônicos do tipo A; “O” equivale a átomos de Oxigênio, “C” (Carbono), “N” (Nitrogênio), “S” (Enxofre) e “Se” (Selênio); “CR” equivale a um radical de carbono radical; “NR” corresponde a um radical de Nitrogênio.

Tabela 2: Alguns sistemas mesoiônicos descritos na literatura (OLLIS e RAMSDEN, 1976).

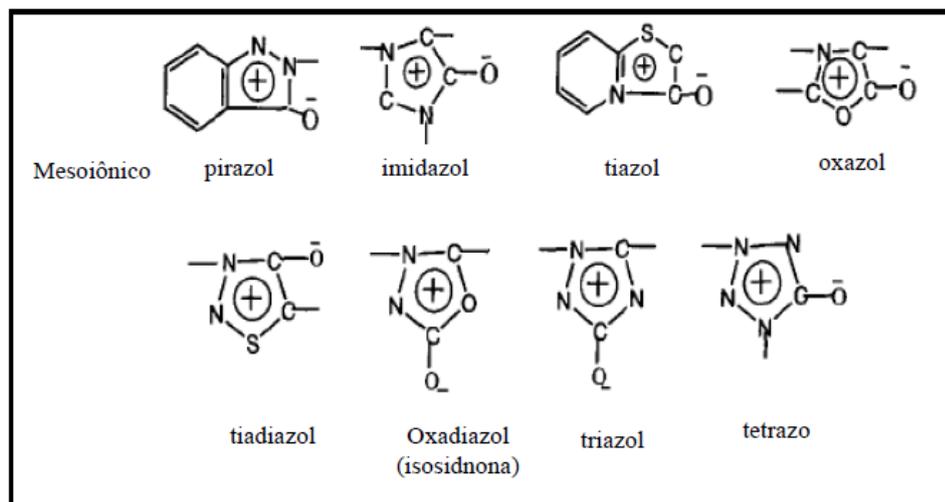
SISTEMA	ÁTOMOS OU GRUPOS DE ÁTOMOS						
	Exemplo	a	b	c	d	e	f
DIOXÓLIO							
1,2-dioxólio-4-olato	CR	O	O	CR	C	O	
OXAZÓLIO							
1,2-oxazólio-4-aminida	NR	CR	NR	CR	C	O	
DIAZÓLIO							
1,2-diazólio-5-olato	S	CR	NR	CR	C	S	
TIOAZÓLIO							
1,2-tiazólio-4-aminida	CR	S	NR	CR	C	NR	
DITIÓLIO							
1,2,3-ditiólio-4-olato	CR	S	S	CR	C	O	
TETRAZÓLIO							
1,2,3,4-tetrazólio-5-olato	N	NR	NR	N	C	O	
TIADIAZÓLIO							
1,2,5-tiadiazólio-3-olato	N	S	NR	CR	C	O	

Onde, “a”, “b”, “c”, “d”, “e” e “f” correspondem a átomos ou grupo de átomos presentes na estrutura dos sistemas mesoiônicos do tipo B, onde “O” equivale a átomos de

Oxigênio, “C” (Carbono), “N” (Nitrogênio), “S” (Enxofre) e “Se” (Selênio); “CR” equivale a um radical de carbono radical; “NR” corresponde a um radical de Nitrogênio.

A maioria dos mesoiônicos heterocíclicos é de origem sintética e possuem um anel heterocíclico que pode ser: imidazol, oxadiazol, oxazol, pirazol, tetrazol, tiadiazol, tiazol ou triazol (Figura 20) (BADAMI, 2006).

Figura 20: Estrutura química dos principais compostos mesoiônicos.



Fonte: adaptado de BADAMI, 2006.

O potencial valor dos compostos mesoiônicos como substâncias biologicamente ativas está no seu caráter betaínico e planar e na variação de densidades de cargas eletrônicas no anel heterocíclico, sendo uma exocíclica, assim atribuindo propriedades anfífilas (ATHAYDE-FILHO et al, 2000), sendo capazes de interagir com biomoléculas, tais como, DNA e/ou proteínas (SENFF-RIBEIRO et al, 2004). Além disso, a neutralidade global desses compostos lhes permite atravessar membranas biológicas *in vitro* e *in vivo* (SENFF-RIBEIRO et al, 2004; PAIVA et al, 2015).

Estudos com compostos mesoiônicos tem sido realizados há décadas (ATHAYDE-FILHO et al, 1996). O grande interesse nessa classe de heterocíclicos são

os relatados da literatura sobre o grande número de aplicações biológicas, farmacêuticas e tecnológicas (SENFF-RIBEIRO et al, 2004). Os compostos mesoiônicos apresentam um amplo espectro de atividades biológicas como, por exemplo, antifúngica (PAIVA et al, 2015), antimicrobiana (ATHAYDE-FILHO et al, 1999; DESHPANDE; PAI, 2010; OLIVEIRA, 2011; DUBEY et al, 2014), antineoplásica (PENG et al, 1975; GRYNBERG et al, 1992; DUNKLEY; THOMAN, 2003; SENFF-RIBEIRO et al, 2004), antidepressivo (ANDERZHANOVA et al, 2001), anti-inflamatória (DESHPANDE; PAI, 2010), anticonvulsivante, antiepiléptica (VIDA et al, 1975; CORTES et al, 1985), antiarrítmico cardíaco, esquistossomicidas (WERBEL et al, 1977), inseticida (DUBEY et al, 2014), dentre outros. Alguns dos efeitos destes compostos estão relacionados com a presença de grupos substituintes específicos no anel ou a habilidade destes compostos em liberar óxido nítrico de suas estruturas moleculares (SENFF-RIBEIRO et al, 2004).

Estudos realizados com o 4-fenil-5-(4-nitrocinaoíl)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina mostraram que este composto mesoiônico é capaz de inibir o transporte de elétrons através do sistema da cadeia respiratória entre os complexos II e III, colapsar a transmembrana e estimular a atividade da ATPase em mitocôndrias intactas. Estes efeitos relacionados à energia das mitocôndrias parecem estar associados com alterações na permeabilidade da membrana e fluidez (SENFF-RIBEIRO et al, 2003).

Uma investigação na atividade de um composto mesoiônico da classe das sidnonas (Syd-1) em ratos com carcinoma de Ehrlich, sarcoma 180 e histiocitoma fibroso (B10MCII) sugeriu que a atividade antitumoral dos mesoiônicos pode estar relacionada à alterações no metabolismo das mitocôndrias (SHIH, 2007).

Outros estudos *in vivo* também mostraram que os compostos 3-benzil-5-(4-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidina-4-onas demonstraram baixos níveis de toxicidade quando administrados em altas doses em camundongos (ALBUQUERQUE et al, 2005).

Apesar do potencial valor dos compostos mesoiônicos como moléculas para o desenvolvimento de novos fármacos, poucos estudos tem sido reportados sobre a atividade antitumoral dos mesmos. Desta forma, sugere-se, a partir deste estudo, a hipótese de que compostos mesoiônicos do grupo 1,3-tiazólio-5-tiolato, com ou sem enriquecimento por zinco, podem desempenhar uma função importante no controle

do desenvolvimento de neoplasias malignas em células cultivadas de linhagens humanas e animais.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antineoplásico de novos compostos mesoiônicos do grupo 1,3-tiazólio-5-tiolato, com e sem enriquecimento por zinco, e seus possíveis mecanismos de ação.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o potencial citotóxico dos compostos mesoiônicos MIH 2.4BL e MIH 2.4Zn;
- Verificar o índice de seletividade dos compostos teste;
- Investigar as vias de indução de morte celular dos dois compostos teste;
- Avaliar se ocorre parada do ciclo celular causada pelos compostos teste;
- Verificar o envolvimento mitocondrial no processo de morte celular;
- Quantificar os níveis de fragmentação do DNA causada pelos compostos teste;
- Analisar a expressão dos genes *BAX*, *BCL2*, *CASPASES 3* e *9*, envolvidos no controle do ciclo celular e apoptose.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Reagentes e Materiais

Soro fetal bovino (FBS) e Tripsin-EDTA 0,5% (10X) foram adquiridos da GIBCO®. O meio para cultura de células RPMI-1640 foi adquirido da HIMEDIA® e o meio DMEN foi adquirido da Invitrogen®. A solução tampão PBS foi adquirida da AMRESCO INC.®. E as soluções tampão pH 4.00 e pH 7.00 foram obtidas da Casa da Química Ind. e Com. Ltda. O Dimetilsulfóxido (DMSO) foi adquirido da HIMEDIA®. Os demais reagentes utilizados para o cultivo de células e análises em citometria de fluxo [Solução de antibióticos (100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina B), Doxorubicina, Iodeto de Propídeo, Bicarbonato de Sódio ultrapuro, Azul de Tripán, Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2yl)-2,5-difenilterazólio (MTT), Anexina V e Rodamina] foram obtidos através da Sigma®.

A água utilizada para preparação das soluções foi obtida a partir de um sistema de purificação ($\rho > 18\text{M}\Omega$) pelo sistema Milli-Q Da Millipore (Billerica, EUA).

4.1.2 Células

Para realização dos testes de citotoxicidade e mecanismos de morte celular foram utilizadas as linhagens celulares apresentadas na tabela 3.

Todas as células foram obtidas através do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e mantidas no Laboratório de Fisiologia Animal e Molecular Aplicada (FAMA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Tabela 3: Linhagens celulares utilizadas neste estudo.

Linhagem	Tipo Histológico	Origem
HEp-2	Carcinoma de de colo de útero	Humano
HT-29	Adenocarcinoma de cólon retal	Humano
HL-60	Leucemia promielocítica aguda	Humano
MCF7	Carcinoma de mama	Humano
RAW 264.7	Macrófagos peritoneais	Murino
T-47D	Carcinoma ductal de mama	Humano
4T1	Câncer de mama	Rato

4.1.3 Compostos Mesoioônicos

A princípio, os compostos mesoioônicos (MIH 1, MIH 2, MIH 3, MIH 2.2, MIH 2.4, MIH 2.4BI, MIH 3.1, MIH 3.2, 3.4a e 3.4b) utilizados no presente trabalho, foram sintetizados no Laboratório de Pesquisa em Bioenergia e Síntese Orgânica da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), coordenado pelo Professor Doutor Petrônio Filgueiras de Athayde Filho.

A preparação do composto MIH 2.4BL com o nitrato de zinco para obtenção do composto MIH 2.4Zn foi realizada no Laboratório de Terras Raras (BSTR) do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), coordenado pelo Professor Doutor Severino Alves Júnior.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Síntese do Composto Mesoioônico MIH 2.4Zn

Para a preparação do composto MIH 2.4Zn, foi realizado um teste de solubilidade do composto MIH 2.4BI em acetona, água destilada, clorofórmio, etanol, diclorometano e metanol. O composto MIH 2.4BI foi solúvel apenas em metanol.

Após o teste de solubilidade, o composto MIH 2.4Zn foi obtido da seguinte forma: tanto o composto MIH 2.4BL quanto o $Zn(NO_3)_2$ foram dissolvidos separadamente em metanol e, posteriormente, submetidos a uma mistura reacional numa proporção de 3(MIH 2.4BI):1($Zn(NO_3)_2$).

A mistura reacional foi mantida sob agitação por 24 horas. Imediatamente, a mistura ficou incolor. Após *overnight*, o composto preparado com o zinco foi evaporado em temperatura de 38 - 40 °C. Posteriormente, o produto obtido MIH 2.4Zn foi submetido às análises químicas para caracterização.

4.2.2 Caracterização Química dos Compostos MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn

Após a síntese do composto mesoiônico com base livre (MIH 2.4BI) e preparação do mesmo com o zinco (MIH 2.4Zn), os produtos finais foram caracterizados através da obtenção da curva de calibração, espectrofotometria de ultravioleta e visível (UV-vis), espectrometria de emissão óptica (ICP-OS), espectroscopia de fotoluminescência, ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia de infravermelho transformada em Fourier (FT-IR), difração de raios-X, análise termogravimétrica (TGA) e análise elementar. Todas estas análises foram realizadas no Departamento de Química da UFPE, em parceria com o grupo de pesquisa do professor Doutor Severino Alves Júnior.

A curva de calibração, primeira análise realizada, teve por objetivo obter uma fórmula matemática para quantificar a concentração do composto inicial (MIH 2.4BI) no produto final (MIH 2.4Zn). Para esta análise, foi pesado com exatidão 2,4 mg do MIH 2.4BI e diluído em 10 mL metanol P.A, obtendo a solução mãe com concentração de 0,24 mg/mL. Em seguida, retirou-se desta solução alíquotas em triplicata, que foram diluídas no mesmo solvente, obtendo as concentrações de 0,03; 0,024; 0,018; 0,012; 0,006; 0,003 e 0,0012 mg/mL, e analisadas no espectrofotômetro UV-vis.

A espectrofotometria de ultravioleta e visível (UV-vis) foi realizada no equipamento Agilent 8453, na concentração de 0,055 mg/mL em solvente metanol.

A espectrometria de emissão óptica (ICP-OS) tem por objetivo obter uma curva padrão, com linearidade e coeficiente linear, para obtenção da concentração de íons metálicos (zinco) na amostra, sendo monitorada na linha espectral do zinco de 206,200nm. Esta análise foi realizada em triplicata, utilizando 6 concentrações diferentes do composto MIH 2.4Zn. Para o preparo da amostra, foi pesado 6mg do MIH 2.4Zn e diluído em 5% de ácido nítrico, obtendo uma concentração de 10mg/L do composto.

As propriedades fotoluminescentes (espectros de excitação e emissão, e tempo de vida) dos compostos do presente estudo foram realizadas em um espectrofluorímetro (Horiba Jobin Yvon, modelo Fluorolog-3 ISA), utilizando amostras sólidas. O aparelho é equipado com monocromador duplo de excitação e de emissão, modelo FL-1039/40, lâmpadas contínuas de xenônio com potência de 450 W e pulsada de xênon de 150 W, fotomultiplicadora R928P. Os dados foram coletados em um ângulo de 90°, em relação ao feixe de emissão.

Os espectros de RMN ^{13}C e ^1H foram obtidos no aparelho Agilent300-nmrs300, em clorofórmio deuterado como solvente.

Os espectros de absorção na região do infravermelho transformados em Fourier (FT-IR) foram obtidos em um espectrômetro FT-IR fabricado pela Perkin Elmer modelo Spectrum 400, no intervalo de 4000 cm^{-1} à 400 cm^{-1} , usando pastilha e janela de KBr, à temperatura ambiente.

A difração de raio X foi realizada no equipamento Shimadzu modelo ZRD – 6000 (radiação de Cu-K $\lambda = 1,54056\text{ \AA}$), a 40 kV, com um filamento de 30 mA, com filtro de Ni, nos parâmetros com passo de $0,01^\circ$, tempo de aquisição de 1 segundo e janela angular (2θ) de 1° - 25° , com o objetivo de avaliar o perfil de cristalinidade ou amorfização dos compostos.

A análise termogravimétrica (TGA) pode ser dita como uma técnica termoanalítica que acompanha a variação da massa da amostra e estabilidade térmica, em função da programação de temperatura. Pode-se dizer que o equipamento da análise termogravimétrica é composto basicamente pela termobalança, um instrumento que permite a pesagem contínua de uma amostra em função da temperatura, ou seja, à medida que ela é aquecida ou resfriada.

Os dois compostos MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn foram, posteriormente, encaminhados para a Central Analítica do Departamento de Química da UFPE para realização da análise elementar.

4.2.3 Cultivo de Células

As linhagens celulares (tabela 3) empregadas nos testes de atividade citotóxica e mecanismos antitumorais foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (Brasil) e foram mantidas no Laboratório FAMA, da UFRPE.

As células foram cultivadas em garrafas próprias para cultivo celular (25cm²), contendo meio RPMI 1640 (HIMEDIA®) para as linhagens HL-60, MCF7, T-47D e 4T1 e meio DMEM (Invitrogen®) para as linhagens celulares HEp-2, HT-29 e RAW 264.7. Todos os meios utilizados foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de antibiótico/antimicótico (100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina B).

As células foram mantidas em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. O crescimento das células foi acompanhado diariamente, por meio de visualização das células em microscópio de inversão (MOTICTM AE30, Hong Kong, China). Quando o crescimento celular atingia confluência próximo a 100% da área da garrafa de cultivo, o meio era trocado para renovação dos nutrientes e era realizada a passagem das células para novas garrafas. Para as células aderentes, utilizava-se tripsina 1x (GIBCO®) para auxiliar o desprendimento das mesmas nas garrafas de cultivo.

4.2.4 Avaliação da Citotoxicidade em Células Tumorais

4.2.4.1 Princípios do Teste

A descrição original do teste do MTT foi realizada por Mosmann (1983). Desde então, este ensaio vem sendo amplamente utilizado para medir os efeitos citotóxicos

in vitro de diversas drogas, nas linhagens celulares estabelecidas ou em células de cultivo primário (MEERLOO; KASPERS; CLOOS, 2011).

O ensaio do MTT consiste na redução do MTT ou sal de tetrazolium (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolio), que é hidrossolúvel e de cor amarelada, em cristais de formazan na cor azul-púrpura, pela enzima succinato-desidrogenase, em células com atividade mitocondrial íntegra (MEERLOO; KASPERS; CLOOS, 2011; RISS et al, 2013). O princípio básico do teste de citotoxicidade é de que, para a maioria das células viáveis, a atividade mitocondrial é constante. Dessa forma, variações na atividade mitocondrial e, conseqüentemente, na conversão do MTT estão linearmente associadas com o aumento ou diminuição do número de células viáveis (MEERLOO; KASPERS; CLOOS, 2011). Este aumento ou diminuição da viabilidade celular pode ser detectado a partir da medição da densidade ótica (DO) dos cristais de formazan residuais e solubilizados na placa, por meio de um espectrofotômetro de placas no comprimento de onda de 570 nm (MEERLOO; KASPERS; CLOOS, 2011; RISS et al, 2013).

4.2.4.2 Procedimento Experimental

Inicialmente, as células foram contadas e plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de 2×10^4 (por poço) para células aderentes (HEp-2, HT-29, MCF7, RAW 264.7, T-47D e 4T1) e 7×10^4 (por poço) para células em suspensão (HL-60). Estas foram incubadas com sete concentrações crescentes, diluições de base dois (0,395; 0,781; 1,562; 3,125; 6,25; 12,5 e 25,0 $\mu\text{g/mL}$) de todos os compostos utilizados neste estudo, além da doxorubicina (0,78 $\mu\text{g/mL}$, controle positivo), os quais foram diluídos em DMSO. O controle negativo recebeu igual volume do veículo utilizado para a diluição das drogas (BATISTA et al, 2014). Em cada placa, também foi feito um poço “branco” que não recebeu nenhum tratamento (FRESHNEY, 2010).

Após um período de 21, 45 e 69 horas de incubação, foi adicionado, a cada poço, 20 μL de MTT (5 mg/mL), para uma concentração final de 0,45 $\mu\text{g/mL}$ por poço. Após três horas (totalizando 24, 48 e 72h, respectivamente, de incubação com atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C), o MTT aplicado em cada poço foi aspirado e os

cristais de formazan foram dissolvidos em 100 μ L de DMSO. Em espectrofotômetro de placas (Multiskan™ GO, Thermo Scientific, USA), a placa foi agitada por 5 minutos, para completa solubilização dos cristais de formazan e a absorbância foi avaliada no comprimento de onda de 570 nm (RISS et al, 2013). As leituras no espectrofotômetro foram realizadas no Laboratório de Histologia da UFRPE.

Para cada linhagem celular foram realizados três experimentos independentes, em triplicata. Dos valores de densidade ótica (DO) obtidos foi descontado o valor do plástico da placa, como forma de corrigir os dados e eliminar risco de viés devido à coloração do meio e resíduos.

4.2.4.3 Análise Estatística

A viabilidade celular foi calculada a partir da razão da DO, obtida para cada concentração dos compostos mesoiônicos testados, pela DO do controle negativo e positivo (doxorrubicina), e foi expressa em termos percentuais mais erro padrão médio (EPM). Para a comparação entre os grupos, aplicou-se o teste ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls (utilizado para análises em ensaios com mais de dois tratamentos). Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. A citotoxicidade foi expressa por meio da média da CI_{50} (concentração que inibe 50% do crescimento celular em relação ao controle negativo) dos três experimentos, erro padrão médio (EPM) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%), determinada por meio de regressão não-linear, utilizando o software GraphPad Prism, versão 7.0.

4.2.5 Índice de Seletividade

4.2.5.1 Princípio do Teste

Esta análise tem por objetivo averiguar se os quimioterápicos ou substâncias testadas com esta finalidade apresentam seletividade por células tumorais em detrimento de células saudáveis (HOUGHTON et al, 2007).

4.2.5.2 Procedimento Experimental

O índice de seletividade (IS) é uma grandeza matemática que expressa essa relação, sendo considerável e aceitável para quimioterápicos um valor maior que dois. Para determinar o IS, basta efetuar a razão da concentração inibitória CI_{50} da substância em linhagens normais pela CI_{50} em linhagens tumorais (HOUGHTON et al, 2007).

4.2.6 Avaliação da Viabilidade Celular

4.2.6.1 Princípios do Teste

Este teste se baseia na capacidade do corante iodeto de propídeo se ligar ao DNA e emitir alta fluorescência quando excitado pelo laser. Células com membrana íntegra não permitem a entrada do corante iodeto de propídeo, portanto as células viáveis apresentarão baixa fluorescência. No entanto, as células com membrana rompida permitirão a entrada do corante que se ligará ao DNA, emitindo alta fluorescência (KROEMER et al, 2009; MISHRA; KHULLAR; BHATIA, 2011).

A perda da integridade de membrana plasmática é um das características de morte celular, relacionada às alterações funcionais e estruturais, a qual a célula é submetida, podendo acontecer em apoptoses tardias ou necrose (KROEMER et al, 2009).

4.2.6.2 Procedimento Experimental

Para esta análise foi escolhida a linhagem HL-60, por se tratar de células cultivadas em suspensão, o que viabiliza os estudos de mecanismo de ação. Foram realizados dois experimentos independentes, cada um em triplicata. As concentrações selecionadas foram baseadas nas curvas concentração-resposta obtidas no ensaio de MTT com estas células: 3,5 e 7,0 µg/mL (dobro da CI_{50} no tempo de 48 horas) para as análises com o composto MIH 2.4BI; e 5,0 e 10,0 µg/mL (dobro da CI_{50} no tempo de 48 horas) para as análises com o composto MIH 2.4Zn, a doxorubicina (0,78 µg/mL) foi utilizada como controle positivo e o controle negativo foi tratado com o veículo (meio RPMI-1640).

Inicialmente, as células foram plaqueadas em placas de 12 poços, contendo $0,3 \times 10^6$ células por 1 mL de meio de cultivo e foram administradas as concentrações testes dos compostos em estudo. As células foram incubadas durante um período de 48 horas. Após esse período, foi transferido um volume de 500 µL do volume de cada poço para um eppendorf de 1,5 mL devidamente identificado. As células foram centrifugadas a 1.200 rpm por 5 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e adicionado 1 mL de PBS ao *pellet*. Estes foram homogeneizados para dissociação do *pellet*. Em seguida, foi adicionado 200 µL de iodeto de propídeo (10 µg/mL). Esperou-se 30 minutos no escuro com a tampa aberta e, por fim, as amostras foram lidas no citômetro de fluxo, utilizando o sistema Guava EasyCyteHT (Merck-Millipore). Foi utilizado o Guava-Soft™ software versão 2.7. Cinco mil eventos foram avaliados por experimento e os debris foram omitidos das análises.

4.2.7 Avaliação da Despolarização da Membrana Mitocondrial

4.2.7.1 Princípios do Teste

A avaliação da despolarização da mitocôndria das células HL-60 foi conduzida em citômetro de fluxo, utilizando a rodamina 123 como corante fluorescente

específico, capaz de se ligar diretamente à mitocôndria de células viáveis (JOHNSON et al, 1980). Alterações no potencial de membrana mitocondrial resultam em alterações na intensidade de fluorescência do corante. A rodamina 123 é um corante fluorescente catiônico permeável à membrana celular, que é rapidamente sequestrado pela mitocôndria (dependendo do tipo de célula) e tem sido amplamente utilizada como corante fluorescente de mitocôndria em células vivas (JOHNSON et al, 1980; RNOT et al, 1986) e em mitocôndrias isoladas (PETIT, 1992). Alterações no potencial mitocondrial transmembrânico levam ao efluxo da rodamina de dentro da mitocôndria, gerando menor fluorescência (PERES; CURIS, 2005; BATISTA; GUERRA, 2010; ANGRIMANI et al, 2015).

Atualmente, é consenso que a perda do potencial de membrana mitocondrial é um evento inicial da apoptose e faz parte da via intrínseca deste processo (PERRY et al, 2011; PERELMAN et al, 2012).

4.2.7.2 Procedimento Experimental

Para esta análise foi escolhida a linhagem HL-60, por se tratar de células cultivadas em suspensão, o que viabiliza os estudos de mecanismo de ação. Foram realizados dois experimentos independentes, cada um em triplicata. As concentrações selecionadas foram baseadas nas curvas concentração-resposta obtidas no ensaio de MTT com estas células: 3,5 e 7,0 µg/mL para as análises com o composto MIH 2.4BI; e 5,0 e 10,0 µg/mL para as análises com o composto MIH 2.4Zn, a doxorubicina (0,78 µg/mL) foi utilizada como controle positivo e o controle negativo foi tratado com o veículo (meio RPMI-1640).

As células foram plaqueadas em placas de 12 poços, contendo $0,3 \times 10^6$ células por mL, tratadas com as respectivas concentrações dos compostos e do controle positivo (doxorubicina) e incubadas durante um período de 48h. Posteriormente, foi retirado 500 µL desta concentração de células e transferido para um eppendorf de 1,5 mL devidamente identificado. Estes foram submetidos à centrifugação a 2000 rpm durante 5 minutos. Após a centrifugação, foi retirado o sobrenadante e adicionado ao *pellet* 1 mL de PBS para posterior ressuspensão das células. Novamente, as células

foram centrifugados a 2000 rpm durante 5 minutos e, em seguida, foi descartado o sobrenadante e adicionado 200 μ L da solução de rodamina. As células foram incubadas por 15 minutos no escuro com a tampa aberta e, posteriormente, centrifugadas à 2000 rpm durante 5 minutos. Retirou-se o sobrenadante e foi adicionado 200 μ L de PBS. Por fim, as células foram incubadas durante 15 minutos no escuro e, em seguida, submetidas à leitura no citômetro de fluxo, utilizando o sistema Guava EasyCyteHT (Merck-Millipore). Foi utilizado o Guava-Soft™ software versão 2.7. Cinco mil eventos foram avaliados por experimento e os debris foram omitidos das análises.

4.2.8 Avaliação do Padrão de Morte Celular

4.2.8.1 Princípios do Teste

Para avaliar o padrão de morte celular envolvido na ação citotóxica dos compostos em células de HL-60, foram realizados ensaios com a Anexina V. Esta técnica é destinada a detecção de apoptose em vários tipos celulares, pela marcação de fosfatidilserina (PS). A PS é predominantemente observada na superfície interna da bicamada lipídica, voltada para o citosol. Nas células no início da apoptose, onde a membrana ainda permanece intacta, mas sofre uma desorganização, a PS é translocada para a superfície exterior da bicamada. O aparecimento de PS na superfície celular é reconhecido pelos fagócitos, que captam este sinal e removem a célula que sinalizou seu “suicídio” ao ambiente. A anexina V é uma proteína que se liga à fosfolípídeos e possui alta afinidade por PS na presença de íons cálcio. Mudanças nesta assimetria da membrana, que é analisada através da medição da aderência de Anexina V à membrana celular, podem ser detectadas antes das alterações morfológicas associadas ao início da apoptose e antes da perda da integridade da membrana (TUSCHL et al, 2004).

4.2.8.2 Procedimento Experimental

Foram realizados dois experimentos independentes, cada um em triplicata, na linhagem HL-60. As concentrações selecionadas foram baseadas nas curvas concentração-resposta obtidas no ensaio de MTT com estas células: 3,5 e 7,0 µg/mL para as análises com o composto MIH 2.4BI; e 5,0 e 10,0 µg/mL para as análises com o composto MIH 2.4Zn. As células foram plaqueadas em placas de 12 poços, contendo $0,3 \times 10^6$ células por mL, tratadas com as respectivas concentrações dos compostos e do controle positivo (doxorubicina, 0,78 µg/mL) e incubadas durante um período de 48h. Após este período, foi adicionado em cada poço 200 µL de PBS e foi adicionado, nesta sequência, 100 µL do tampão 1x em cada poço. As suspensões foram transferidas para eppendorfs de 1,5 mL, devidamente identificados, e centrifugadas à 2000 rpm durante 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em tampão 1x. Foi adicionado à suspensão 5 µL de anexina V e 1 µL da solução do tampão de iodeto de propídeo (100 µg/mL). As células foram incubadas durante 15 minutos em temperatura ambiente no escuro e, posteriormente, foi adicionado 400 µL do tampão 1x em cada eppendorf. As amostras foram lidas no citômetro de fluxo, utilizando o sistema Guava EasyCyteHT (Merck-Millipore). Foi utilizado o Guava-Soft™ software versão 2.7. Cinco mil eventos foram avaliados por experimento e os debris foram omitidos das análises.

4.2.9 Avaliação do ciclo celular e fragmentação do DNA

4.2.9.1 Princípios do teste

A análise do conteúdo do DNA constitui uma excelente ferramenta para obtenção de informações relativas ao estado do ciclo celular. Este teste demonstra a ploidia celular e informações importantes sobre as fases do ciclo em que uma determinada célula se encontra, além de dar a possibilidade de averiguar a frequência de células apoptóticas, pois estas são caracterizadas pelo conteúdo do DNA fragmentado (DARZYNKIENICZ et al, 2010).

A distribuição de células dentro das fases do ciclo celular está baseada em diferenças no conteúdo do DNA em cada fase: G0/G1 (fase de síntese), S (fase em que as células realmente apresentam o DNA replicado) e a fase G2/M (fase mitótica) (DARZYNKIENICZ et al, 2010).

Para a realização deste teste foi utilizado o marcador 7-AAD (7-aminoactinomicina D), um intercalador fluorescente que sofre uma mudança espectral após a associação com o DNA. Os complexos de 7-AAD/DNA podem ser excitados pelo laser de 488 nm e tem um máximo de emissão de 647 nm, tornando esta mancha de ácido nucléico útil para análise de ciclo celular em citometria de fluxo. As fases do ciclo celular são caracterizadas por uma quantidade diferente de DNA, o 7-AAD se intercala proporcionando a medida do DNA, permitindo a detecção das fases do ciclo celular.

4.2.9.2 Procedimento experimental

As células da linhagem HL60 foram distribuídas em placas de 24 poços na concentração de $0,3 \times 10^6$ (células/mL) e incubadas com os compostos MIH 2.4BI (nas concentrações 3,5 e 7,0 $\mu\text{g/mL}$) e MIH 2.4Zn (nas concentrações 5,0 e 10,0 $\mu\text{g/mL}$). Estas concentrações foram selecionadas com base nas curvas concentração-resposta obtidas no ensaio de MTT com estas células. Como controle positivo foi utilizada a doxorrubicina (0,78 $\mu\text{g/mL}$) e como controle negativo apenas células com meio de cultura. Posteriormente, 200 μL da amostra foi transferido para uma placa de 96 poços e a mesma foi centrifugada a 450 xg por cinco minutos. Em seguida, o sobrenadante foi removido e adicionado 200 μL de PBS. As células foram homogeneizadas com uma pipeta e centrifugadas novamente a 450 xg por cinco minutos. O sobrenadante foi removido e adicionado 200 μL de etanol a 70% gelado, depois a placa foi tampada e colocada na geladeira por uma hora. Passado este tempo, as células foram novamente centrifugadas a 450 xg por cinco minutos, o sobrenadante contendo o álcool foi removido e as células foram lavadas com PBS mais uma vez e centrifugadas. Posteriormente, foi removido 150 μL de PBS e deixado 50 μL na placa e adicionado 50 μL do reagente *Guava Cell Cycle*. As amostras foram homogeneizadas e colocadas por 20 minutos no escuro e, por fim, submetidas à

leitura no citômetro de fluxo, utilizando o sistema Guava EasyCyteHT (Merck-Millipore). Foi utilizado o Guava-Soft™ software versão 2.7. Cinco mil eventos foram avaliados por experimento e os debris foram omitidos das análises.

4.2.10 Análises Estatísticas dos Experimentos Realizados em Citometria de Fluxo

A partir da leitura de 5000 células em citometria de fluxo, modelo Guava EasyCyteHT (Merck-Millipore) para cada experimento [viabilidade celular, despolarização da membrana mitocondrial, padrão de morte celular (onde foi calculada a frequência relativa para cada evento: células viáveis, necrose e apoptose) avaliação do ciclo celular e fragmentação do DNA], as análises dos dados foram realizadas através da análise de variância do teste ANOVA, seguidas do *Dunnett's Multiple Comparisons Test*, onde foram comparados todos os resultados obtidos para todas as concentrações dos compostos e do controle positivo (doxorrubicina) com o os resultados obtidos para o controle negativo. Os resultados foram expressos em valores percentuais médios \pm DP, com intervalo de confiança de 95%, utilizando o software GraphPad Prism, versão 7.0.

4.2.11 Extração de RNA

Para a extração de RNA, as células de HL-60 foram cultivadas em placas de 24 poços. Para cada tratamento foram realizados cinco experimentos independentes e, em cada experimento, foram cultivados 10 poços contendo 1 mL de células (bem concentrado, com aproximadamente 100% de confluência). As células de HL-60 foram tratadas com os compostos mesoiônicos MIH 2.4BI (concentrações 3,5 e 7,0 $\mu\text{g/mL}$) e MIH 2.4Zn (nas concentrações 5,0 $\mu\text{g/mL}$ e 10,0 $\mu\text{g/mL}$) e para o controle positivo as células foram tratadas com a doxorrubicina (na concentração de 0,78 $\mu\text{g/mL}$). Como controle negativo foi utilizado somente célula e meio de cultura. Após 12h (1/4 do tempo de exposição das células aos tratamentos, eleito através do MTT), todo o

conteúdo dos 10 poços (de cada tratamento), totalizando 10 mL (aproximadamente, 5×10^7 células), foi transferido para um tubo falcon e centrifugado a 8000 xg durante 10 minutos, para obtenção do *pellet* de células. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado ao *pellet* 1 mL de PBS. Este mix foi transferido para um *eppendorf* livre de DNase/RNase e submetido à centrifugação a 8000 xg por 10 minutos. Novamente, o sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foi adicionado 1 mL de PBS. Foi realizada mais uma centrifugação a 8000 xg por 10 minutos e o sobrenadante descartado para retirada completa do meio de cultivo. Para a *lise* e homogeneização das células em suspensão, foi adicionado 1 mL de Trizol por amostra (aproximadamente, 5×10^7 células). Para assegurar uma completa dissociação do complexo proteína – ácido nucléico, as amostras permaneceram por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 200 μ L de clorofórmio para cada 1 mL do reagente Trizol utilizado. As soluções foram agitadas vigorosamente em vortex por 15 segundos, incubadas por 3 minutos em temperatura ambiente e submetidas à centrifugação a 12.000 xg, durante 15 minutos à 4°C. Para a separação do RNA, a fase aquosa adquirida na preparação das amostras foi transferida para um tubo limpo (aproximadamente, 500 a 550 μ L, para evitar a contaminação com a fase fenólica). Em seguida, foi adicionado 500 μ L de isopropanol e a amostra foi submetida a agitação por inversão. As amostras foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e, posteriormente, centrifugadas a 12.000 xg durante 10 minutos à 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi removido por inversão e foi adicionado 1 mL de etanol (75%) à amostra de RNA e submetido à agitação no vortex. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas à 7.500 xg por 5 minutos à 4°C. O sobrenadante foi descartado por inversão e o *pellet* foi submetido à temperatura ambiente, por aproximadamente 2 horas, para secar. Por fim, o *pellet* foi ressuscitado em 15 a 20 μ L de água livre de RNase (água +DEPC), incubado durante 10 minutos à 55°C a 60°C para facilitar a dissolução e as amostras foram estocadas em freezer a -20°C.

Após a extração do RNA as amostras foram submetidas a avaliação no espectrofotômetro (Nano Vue – Healthcare) para determinar as concentrações.

4.2.12 Obtenção do cDNA

Para obtenção do DNA complementar total (cDNA) as amostras foram padronizadas para 1 µg de RNA total solicitado para o Kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. O cDNA foi obtido utilizando iniciadores Oligo DT e randômico.

4.2.13 Análise de Expressão Gênica

A análise da expressão gênica foi determinada pela técnica de PCR em Tempo Real (qPCR), no equipamento Rotor Gene Q, no qual foram estudadas as expressões dos genes *BAX*, *BCL2*, *CASPASE 3*, *CASPASE 9* e o *GAPDH* como controle de referência (Tabela 4).

Tabela 4: Sequências dos *primers* dos genes utilizados para análise de expressão gênica.

Genes	Sequências dos <i>Primers</i> (5' – 3')
<i>BAX</i>	TCCTTACGTGTCTGATCAATCC TCAAGGTCACAGTGAGGTCAG
<i>BCL2</i>	AAATCCGACCACTAATTGCC CAACAACATGGAAAGCGAAT
<i>CASPASE 3</i>	AGCTCATACCTGTGGCTGTG GGGCTCGCTAACTCCTCAC
<i>CASPASE 9</i>	AGGCTCTTAGCAGCTTCCAG GGCATTTCATCTGTCCCTCTT
<i>GAPDH</i>	TTCCAATATGATTCCACCCA ATGACAAGCTTCCCGTTCTC

Para a análise, utilizou-se o kit QuantiFast® SYBR® Green PCR (QUIAGEN) com o protocolo apresentado nas instruções do fabricante: para preparação do mix da

reação foram adicionados 2x QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix (1x), 1µM do *primer A*, 1µM do *primer B*, água livre de RNase e 2 µl de cDNA de cada amostra. As condições para a ciclagem foram: uma fase de ativação inicial (95°C durante 5 minutos), seguida por uma fase de desnaturação (95°C por 10 segundos), mais 40 ciclos de anelamento e extensão (60°C durante 30 segundos).

As amostras foram obtidas em cinco repetições para cada *primer* avaliado. O cálculo do nível da expressão relativa dos genes *BAX*, *BCL2*, *CASPASE 3* e *CASPASE 9* foi conduzido com base no método do limite do ciclo comparativo ($\Delta\Delta CT$) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e normalizado usando os níveis de expressão do gene de referência geométrica: GAPDH. A expressão dos genes foi calculada pela equação $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde o valor ΔCT foi determinado subtraindo o valor do CT (*Cycle Threshold*) correspondente geométrico do gene de referência (GAPDH) da CT do gene específico. O cálculo de $\Delta\Delta CT$ envolvido foi obtido usando o valor de ΔCT da amostra mais alta (ou seja, a amostra com o menor alvo de expressão) com uma constante arbitrária para subtrair de todos os outros valores da amostra ΔCT .

As análises dos dados foram realizadas através do teste não paramétrico Kruskal-Wallis do teste ANOVA, seguida do teste de múltiplas comparações de Dunn ($p < 0,05$) para os genes *BAX* e *BCL2*. Já para os genes *CASPASE 3* e *CASPASE 9* foi realizada análise de variância do teste ANOVA, seguida pelo teste de múltiplas comparações de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$), utilizando-se o programa SPSS.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A princípio, foi realizado o teste de citotoxicidade de dez compostos mesoiônicos sem zinco, através do ensaio do MTT, conforme preconiza o Programa de *Screening* do *National Cancer Institute* (NCI – EUA), com 3 linhagens celulares diferentes: HEp-2, HL-60 e MCF7 (Tabela 5).

De acordo com a escala de intensidade para avaliar o potencial citotóxico dos Instituto Nacional do Câncer (NCI – EUA), compostos com atividade inibitória do crescimento celular variando de 1 a 20% não possuem atividade citotóxica, de 20 a 50% apresentam pouca atividade, 50 a 70% atividade moderada, e com 70 a 100% de inibição do crescimento celular possuem muita atividade citotóxica (NCI, 2016). Sendo assim, após a análise dos dados apresentados na tabela 05, foi possível observar que dentre as nove variações dos compostos mesoiônicos avaliados inicialmente os compostos MIH 2.2 e MIH 2.4 apresentaram melhor atividade, com capacidade entre 70 a 100% de inibição do crescimento celular.

Tabela 5: Teste de inibição realizado no tempo de 72h de tratamento das três linhagens celulares com os compostos analisados na concentração de 25 µg/mL.

TESTE DE INIBIÇÃO (72h)						
Compostos	HEp-2		HL-60		MCF7	
	% Inibição	Erro	% Inibição	Erro	% Inibição	Erro
MIH 1	36,13	3,23	36,44	5,81	45,93	3,12
MIH 2	21,71	7,01	0	0	39,30	1,42
MIH 3	67,45	1,85	99,35	0,64	66,19	1,04
MIH 2.2	89,12	2,85	100	0	75,09	2,74
MIH 2.4	90,82	1,15	100	0	73,96	0,66
MIH 3.1	49,40	4,62	87,61	10,88	59,94	3,31
MIH 3.2	64,21	0	79,20	6,78	55,30	3,02
MIH 3.4a	79,71	1,92	93,10	2,36	62,97	0,66
MIH 3.4b	72,15	4,24	99,24	0,75	74,43	1,13

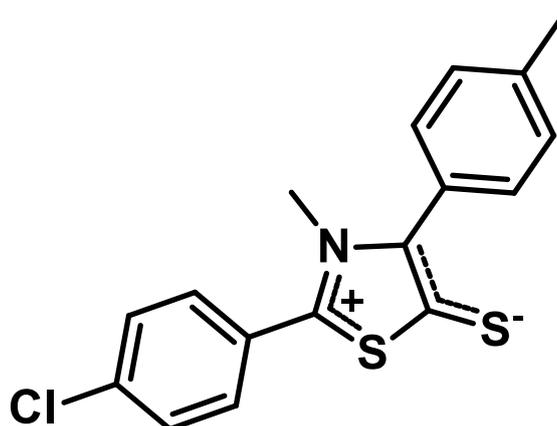
Em seguida, os compostos que apresentaram melhor atividade inibitória no tempo de 72h (MIH 2.2 e MIH 2.4) foram submetidos ao teste do MTT (BERRIDGE; HERST; TAN, 2005) no tempo de 24h para a linhagem celular MCF7. Nesta análise, através da concentração letal média (CI_{50}), foi possível verificar que para a variação do composto mesoiônico MIH 2.2 não houve nenhuma atividade inibitória na linhagem MCF7. Contudo, conseguiu-se obter a concentração ideal de ação do composto para a variação MIH 2.4 (Tabela 6).

Tabela 06: Teste de citotoxicidade realizado para obtenção da CI_{50} dos compostos MIH 2.2 e MIH 2.4, no tempo de 24h, na linhagem MCF7.

COMPOSTOS MESOIÔNICOS	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA (CI_{50})
MIH 2.2	Não apresentou atividade inibitória
MIH 2.4	42 $\mu\text{g/mL}$

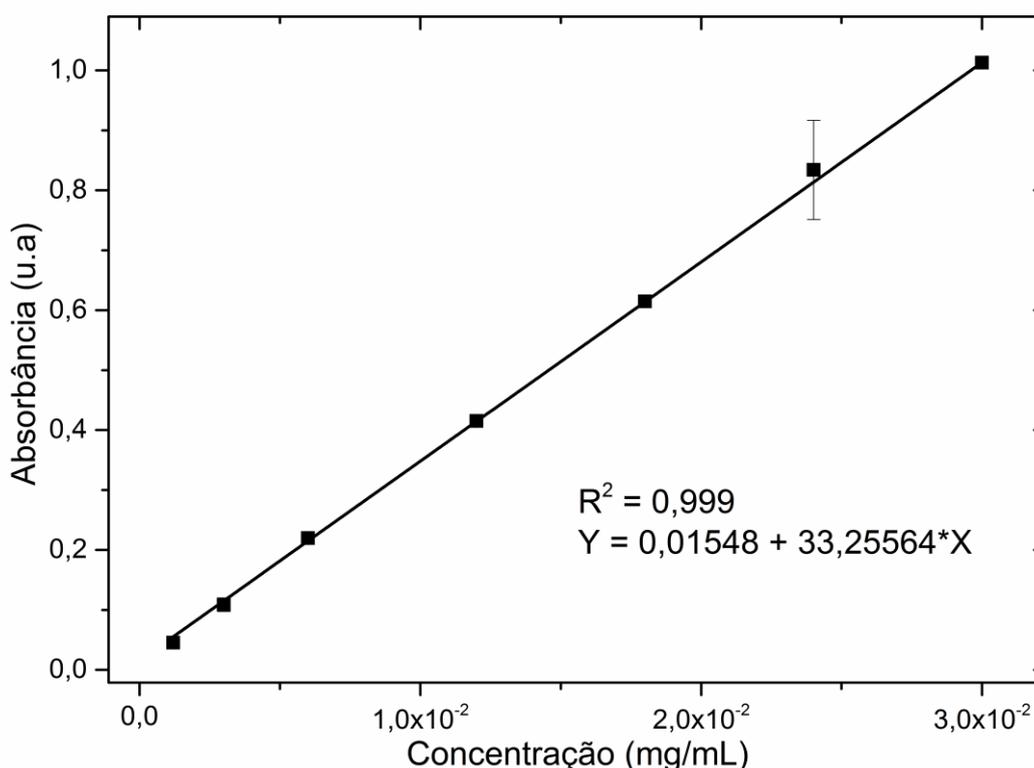
Após estes resultados, o composto MIH 2.4 foi levado para ser coordenado com o zinco, porém não houve êxito na coordenação, havendo necessidade de sintetizar o mesmo composto com uma base livre (MIH 2.4BL, figura 21) e, posteriormente, foi realizada a síntese do mesmo com o zinco (MIH 2.4Zn).

Figura 21: Estrutura molecular do composto mesoiônico com base livre (MIH 2.4BI).



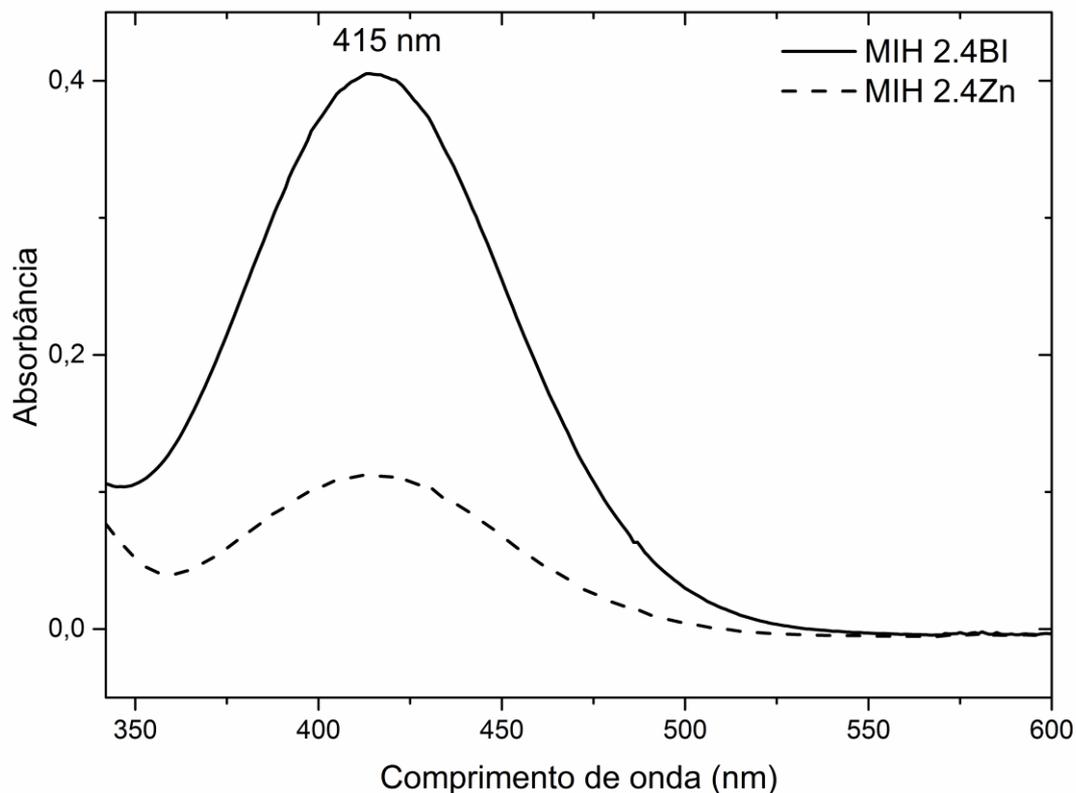
A curva de calibração obteve uma equação da reta $Y = 0,01548 + 33,25564 \cdot X$ e coeficiente de correlação ($R^2 = 0,999$) (Figura 22), os quais foram utilizados para quantificação do composto inicial MIH 2.4BI no complexo, objetivando, conseqüentemente, quantificar a concentração deste nas análises *in vitro*. Nesse sentido, com base na absorbância do MIH 2.4Zn²⁺ apresentada na espectrofotometria na figura 23, foi calculado a concentração de 0,003 mg/mL de MIH 2.4BI em uma alíquota de 0,055 mg/mL de MIH 2.4Zn²⁺, um resultado coerente com o observado no perfil do espectrofotômetro do complexo (Figura 22).

Figura 22: Curva de calibração em triplicata do MIH 2.4BI, em solvente metanol.



No UV-vis (figura 23), foi observado através do perfil de absorbâncias que não houve deslocamento nas bandas do MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn²⁺.

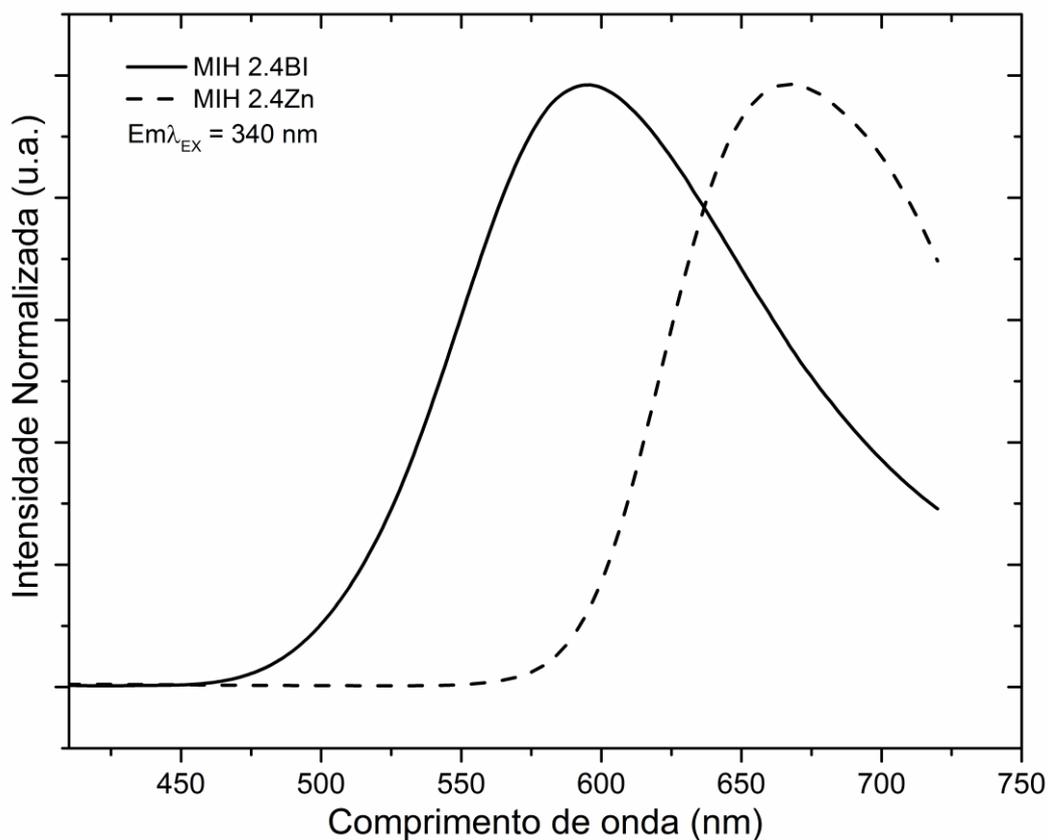
Figura 23: Perfil de absorbâncias nas bandas dos compostos MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn, obtido através de espectrofotometria de UV-vis.



Através da espectrometria de emissão óptica (ICP-OS), foi possível obter uma curva padrão com linearidade originando a equação da reta $y = - 450,7 + 2191 \cdot x$ e o coeficiente de correlação linear foi calculado, resultado $R^2 = 0,996990$, na amostra foi detectado uma concentração de 2,122mg/L de Zn II em 6mg do composto MIH 2.4Zn, que equivale a 21,22% de zinco na amostra.

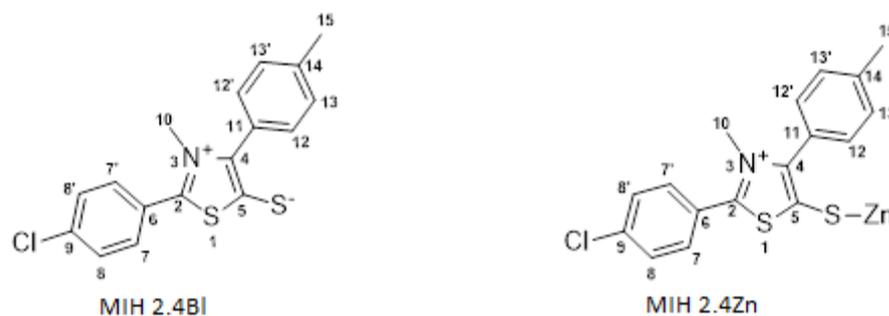
A espectroscopia de fotoluminescência (figura 24) revelou um deslocamento na emissão do complexo, ao comparar com o composto com base livre, apresentando um deslocamento *stokes* de 595 nm para o MIH 2.4BI e 670 nm para o complexo MIH 2.4Zn²⁺. Sugere-se que essa característica está relacionada à interação do zinco ao composto MIH 2.4BI. Segundo a literatura, a interação com o zinco provoca deslocamento para o vermelho no espectro de emissão (HELAL; KIM, 2009).

Figura 24: Espectroscopia de fotoluminescência, revelando um deslocamento *Stokes* de 595nm para o MIH 2.4BI e 670nm para o composto MIH 2.4Zn.



As atribuições de hidrogênio e carbono feitas para o composto MIH 2.4Zn se basearam nos dados obtidos dos experimentos de RMN ^1H e RMN ^{13}C (APT) e na comparação com o composto MIH 2.4BI.

As tabelas 7 e 8 resumem as atribuições feitas para cada átomo de carbono e hidrogênio, respectivamente. Tais atribuições obedecem à numeração apresentada nas estruturas a seguir (Figura 25).

Figura 25: Estruturas moleculares dos compostos MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn.**Tabela 7:** Dados dos espectros de RMN ^{13}C (75 MHz) em (CD_3OD) de MIH 2.4Zn. Os deslocamentos químicos estão em “ppm”.

Carbono δ (ppm)	δ (^{13}C) MIH 2.4BI	δ (^{13}C) MIH 2.4Zn
2	152,08	162,04
4	141,49	146,71
5	161,36	134,24
6	125,54	126,21
7, 7'	130,89	132,49
8, 8'	130,00	131,10
9	138,04	140,02
10	40,56	41,34
11	127,05	127,46
12, 12'	131,16	132,30
13, 13'	129,71	130,59
14	139,46	141,56
15	21,56	21,55

Tabela 8: Dados dos espectros de RMN ^1H (300 MHz) em (CD_3OD) de MIH 2.4Zn. Os deslocamentos químicos estão em “ppm” e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

Carbono δ (ppm)	δ (^1H) MIH 2.4BI	δ (^1H) MIH 2.4Zn
7, 7'	7,56 (d, 2H, 8 Hz)	7,69 (d; 2H; 8 Hz)
8, 8'	7,46 (d, 2H, 8 Hz)	7,42 (d; 2H; 8 Hz)
10	3,62 (s, 3H)	3,66 (s, 3H)
12, 12'	7,47 (d, 2H, 9 Hz)	7,64 (d; 2H; 8 Hz)
13, 13'	7,22 (d, 2H, 9 Hz)	7,22 (d; 2H; 8 Hz)
15	2,35 (s, 3H)	2,31 (s, 3H)

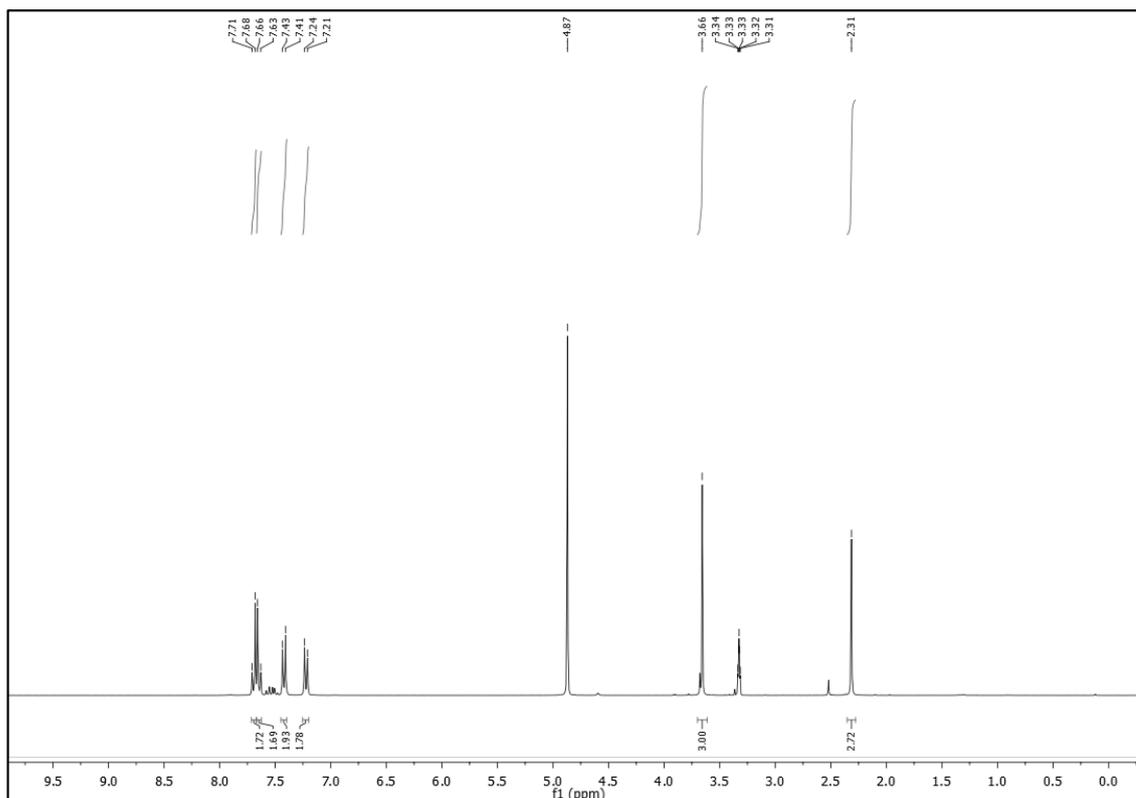
Através do espectro de RMN ^{13}C (APT) a 500 MHz e metanol como solvente, foi possível verificar que o composto MIH 2.4BI apresentou 13 sinais de deslocamentos químicos: 152,08 (C-2); 141,49 (C-4); 161,36 (C-5); 40,56 (C-10); 21,56 (C-15); 125,54 (C-6); 130,89 (C-7 e 7'); δ 130,00 (C-8 e 8'); δ 138,04 (C-9); 127,05 (C-11); 131,16 (C-12 e 12'); 129,71 (C-13 e 13') e 139,46 (C-14) ppm (Tabela 4).

Através do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , δ , 200 MHz) do composto MIH 2.4BI foi possível observar os seguintes sinais de deslocamentos químicos: 2,35 (s, 3H; H-15); 3,62 (s; 3H, H-10); 7,22 (d, 2H; H-13, 13'; ^3J (H-13 com H-12) = 9,0 Hz); 7,46 (d, 2H; H-8, 8'; ^3J (H-8 com H-7) = 8,2Hz); 7,47 (d, 2H; H-12, 12'; ^3J (H-12 com H-13) = 9,0 Hz) e 7,56 (d, 2H; H-7, 7'; ^3J (H-7 com H-8) = 8,2Hz) (Tabela 5).

No espectro de RMN ^{13}C a 75 MHz do composto MIH 2.4Zn foi possível observar a presença de treze sinais característicos do mesoiônico ligado ao zinco (Tabela 4; Figura 26). A análise comparativa dos dados espectrais do MIH 2.4Zn com os dados do composto MIH 2.4BI permitiu atribuir com segurança o deslocamento químico dos carbonos (C-2), (C-4) e (C-5) do anel mesoiônico em δ 162,04 ppm, δ 146,71 ppm e δ 134,24 ppm, respectivamente. Observa-se que quando o C-5 está ligado ao S-, o deslocamento dele é maior comparado com o do C-2. Já no complexo é o inverso, o C-5 está ligado ao S-Zn e, com isso, o deslocamento passa para uma região de menor "ppm" e o C-2 já passa para a região de alto "ppm". Com base nessa análise, confirmou-se que houve uma "quebra de deslocamento de elétrons" e houve uma formação da ligação entre o átomo de enxofre e zinco (Tabela 4; Figura 26).

A análise detalhada dos átomos de carbono aromáticos de *p*-metilfenil e *p*-clorofenil de MIH 2.4BI permitiu atribuir com relativa precisão os deslocamentos químicos de ^{13}C dos anéis aromáticos do MIH 2.4Zn em δ 123,76 ppm de (C-6), δ 132,64 ppm de (C-7 e 7'), δ 131,19 ppm (C-8 e 8'), δ 139,88 ppm (C-9), δ 123,57 ppm (C-11), δ 129,39 ppm (C-12 e 12'), δ 128,04 (C-13 e 13') e δ 141,72 ppm (C-14), ficando assim evidenciado o esqueleto básico dos carbonos aromáticos do mesoiônico em estudo (Tabela 4; Figura 26).

Figura 27: Espectro de RMN ^1H do MIH 2.4Zn (CD_3OD , 300 MHz).

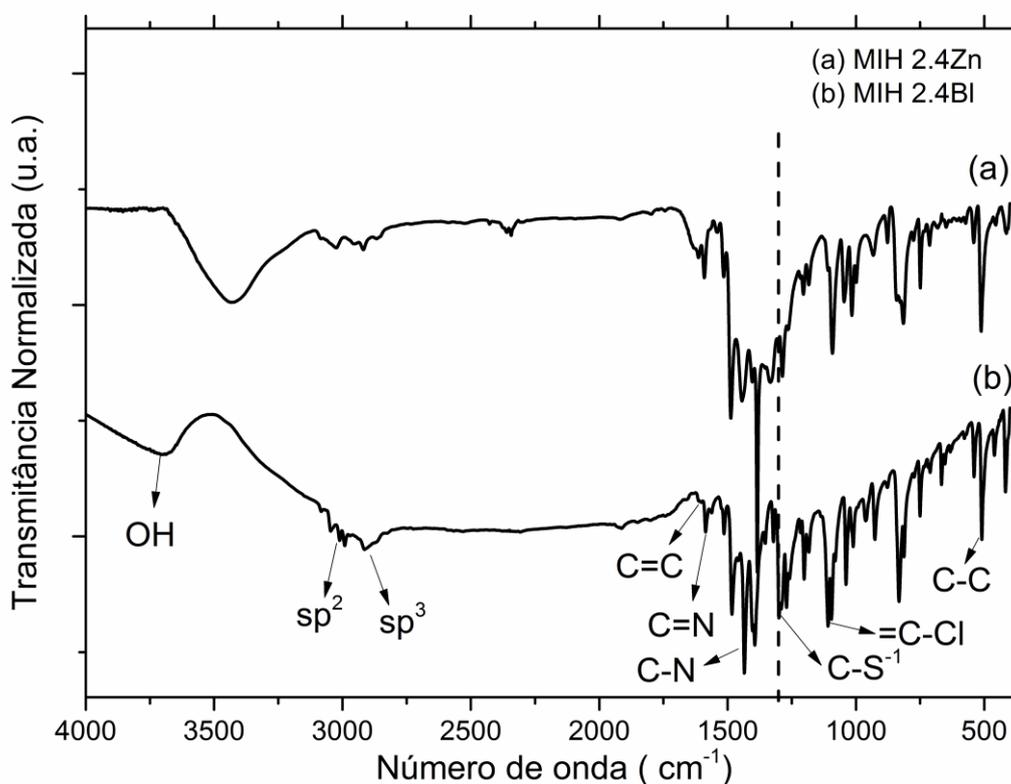


Os espectros de absorção na região do infravermelho, obtidos em um espectrômetro FT-IR, no intervalo de 4000 cm^{-1} à 400 cm^{-1} , usando pastilha e janela de KBr à temperatura ambiente, permitiram observar que em 512 cm^{-1} encontra-se a deformação angular, fora do plano do anel aromático, em 821 cm^{-1} é atribuído a deformação angular do C-H fora do plano. A banda referente ao cloro ligado ao anel aromático $=\text{C}=\text{Cl}$ é encontrada na região de 1104 cm^{-1} atribuído ao estiramento da ligação. O estiramento da imina na molécula aparece na banda de 1640 cm^{-1} e o grupo tiazol é possível observar na região de 1457 cm^{-1} . O grupo tiolato ($\text{C}-\text{S}^{-1}$) é possível observar sua banda de 1294 cm^{-1} . Na região de 1431 cm^{-1} encontra-se a deformação axial do grupo C-N ligado ao metil, na região de 1613 e 1584 cm^{-1} é atribuído as vibrações axiais dos grupos C=C e C=N do anel mesoiônico. Na região de 3000 a 2840 cm^{-1} encontra-se os estiramentos referentes às ligações sp^3 , neste caso referente às metilas, na banda de 3050 é apresentado pelo estiramento da ligação $=\text{C}-\text{H}$ do anel aromático, por fim em 3682 cm^{-1} a banda atribuída à vibração

da hidroxila, provavelmente oriunda de água adsorvida tanto no fármaco como no complexo (SOUZA, 2012).

Ao comparar ambos os espectros (MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn²⁺), destaca-se a banda na região do grupo tiazol (C-S⁻). Nesta, houve uma baixa intensidade observada na região de 1294 cm⁻¹, conforme é possível verificar no gráfico (Figura 28). Esta característica pode ser atribuída à fraca vibração deste grupo devido a ligação do mesmo com o Zn⁺².

Figura 28: Espectroscopia de infravermelho transformada em Fourier (FT-IR) do MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn, obtido em Kbr à temperatura ambiente.

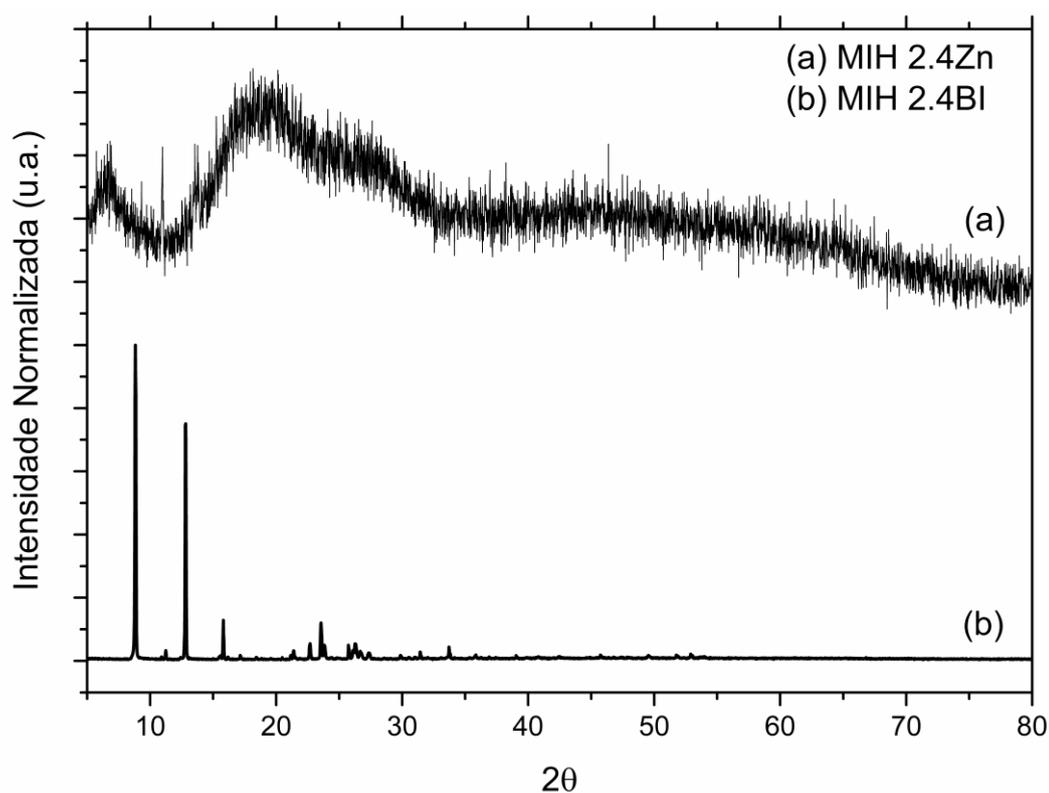


A difração de raio X (Figura 29) revelou que houve amorfização do MIH 2.4Zn²⁺ em relação ao composto MIH 2.4BI, que apresentou cristalinidade. Através da característica amorfa, pode-se inferir a formação do complexo do composto MIH 2.4BI

com o zinco, resultados que corroboram com as outras análises apresentadas neste estudo e com a literatura (LAITINEN et al, 2013).

A propriedade amorfa é interessante no que tange a administração do complexo. De acordo com trabalhos publicados, os compostos amorfos apresentam alto nível de energia interna, e assim, apresentam maiores valores de molhabilidade/solubilidade e taxa de dissolução mais rápida, em relação aos cristalinos e semicristalinos (LAITINEN et al, 2013) (Figura 29).

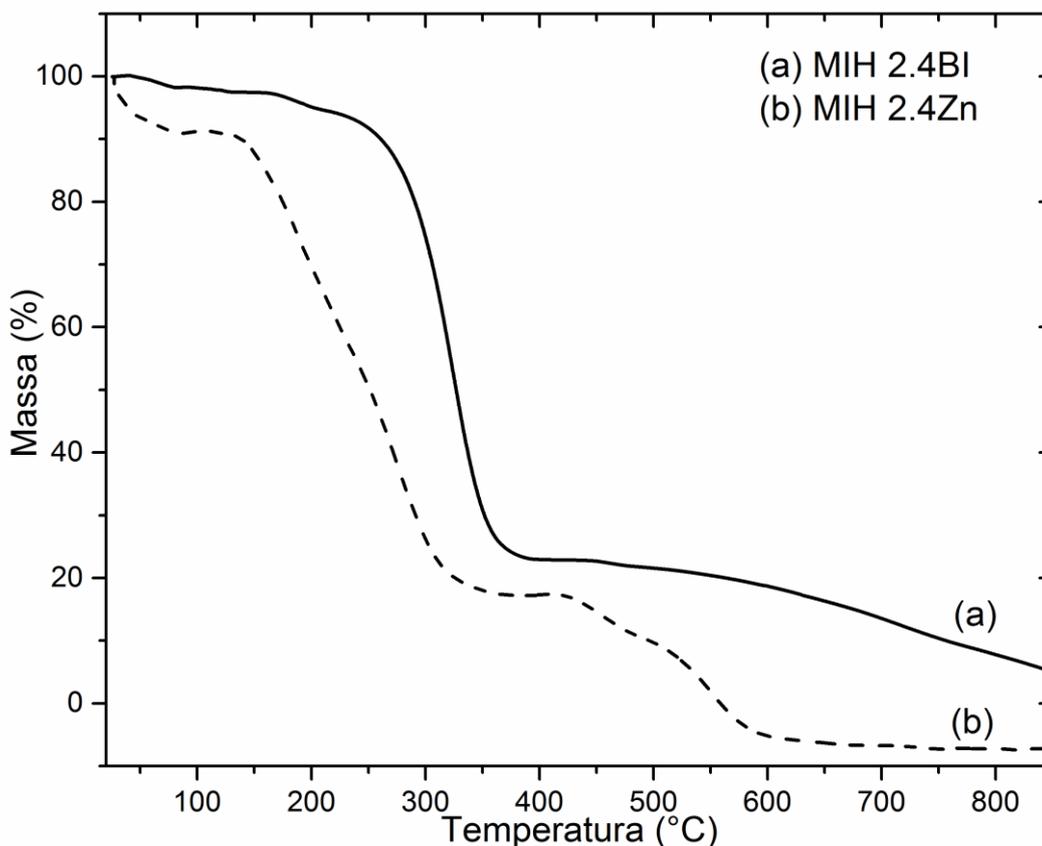
Figura 29: Difratograma de raio-X do MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn.



O perfil termogravimétrico (Figura 30) para o composto MIH 2.4BI, apresentou uma pequena perda de massa na região de 207°C (5,3%) e uma diminuição relevante em $248\text{-}395^\circ\text{C}$ (69%), referente a decomposição do composto (MORAIS et al, 2009). De acordo com os resultados, o complexo $\text{MIH } 2.4\text{Zn}^{2+}$ é ligeiramente termicamente menos estável, apresentando o primeiro evento uma redução de massa em torno de 10% entre $28\text{-}92^\circ\text{C}$, que pode ser atribuído à evaporação do solvente metanol usado na complexação. Em $129\text{-}385^\circ\text{C}$ foi possível observar o segundo evento semelhante ao padrão, com diminuição de 73% de massa, que pode ser atribuído a decomposição

do MIH 2.4BI. É possível visualizar eventos nas regiões de 427 e 480 °C, provavelmente decorrentes da decomposição da região do MIH 2.4 ligado ao Zn^{2+} .

Figura 30: Análises termogravimétricas do MIH 2.4BI (a) e MIH 2.4Zn (b), 10°C/min em atmosfera de nitrogênio.



Em seguida, a partir da análise elementar dos dois compostos mesoiônicos, foi possível observar que houve redução da quantidade de carbono, hidrogênio e do enxofre. E houve um aumento na quantidade de nitrogênio no composto MIH 2.4Zn devido à presença do nitrato de zinco (Tabela 09).

Tabela 09: Análise elementar das concentrações de carbono, hidrogênio, enxofre e nitrogênio nos compostos MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn.

Análise Elementar				
Composto	Carbono	Hidrogênio	Nitrogênio	Enxofre
MIH 2.4BI	61.20%	3.90%	4.19%	18.89%
MIH 2.4Zn	41.31%	3.44%	5.52%	14.66%

E, baseado no TGA e na forma elementar, foi possível sugerir a fórmula mínima do composto MIH 2.4Zn: $Zn(MIH\ 2.4BI)_3 \cdot 3CH_3OH$.

Após as análises para confirmação e caracterização química dos compostos MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn, estes foram submetidos aos testes para a avaliação da citotoxicidade e viabilidade celular *in vitro*.

De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (*International Standard Organization*), ISO 10993, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a atividade de candidatos a fármacos anticâncer. Um dos principais testes utilizados na determinação da citotoxicidade é o teste do MTT (BERRIDGE; HERST; TAN, 2005). O NCI (*National cancer Institute*) dos Estados Unidos utiliza em seus protocolos a concentração inicial de 10 $\mu\text{g/mL}$, considerando um produto puro como citotóxico os que apresentarem o valor da CI_{50} abaixo de 5 $\mu\text{g/mL}$ (NCI, 2016).

O teste antiproliferativo em células tumorais *in vitro* no tempo de 72h demonstrou que os compostos mesoiônicos MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn apresentaram resultados promissores em duas linhagens tumorais (Tabela 10).

O composto MIH 2.4BI apresentou atividade citotóxica ($CI_{50} < 5\ \mu\text{g/mL}$) para as linhagens HEP-2 ($IC_{50} = 0,87\ \mu\text{g/mL}$) e HL-60 ($IC_{50} = 0,63\ \mu\text{g/mL}$). Contudo, este mesmo composto não apresentou efeito citotóxico potente nas linhagens HT-29 e MCF7 ($CI_{50} > 5\ \mu\text{g/mL}$). E as linhagens T-47D e 4T1 se apresentaram insensíveis aos efeitos citotóxicos do composto mesoiônico MIH 2.4BI (Tabela 10).

O composto MIH 2.4Zn se apresentou como um potente inibidor do crescimento tumoral nas linhagens HEP-2 ($CI_{50} = 0,68\ \mu\text{g/mL}$) e HL-60 ($CI_{50} = 0,57\ \mu\text{g/mL}$). É importante ressaltar que a atividade inibitória deste composto nestas linhagens celulares foi superior à atividade inibitória do composto MIH 2.4BI nas

mesmas linhagens. Já para as linhagem HT-29 houve um baixo efeito citotóxico do composto MIH 2.4Zn ($CI_{50} > 5 \mu\text{g/mL}$) e para as linhagens MCF7, T-47D e 4T1 o composto testado não apresentou atividade citotóxica ($CI_{50} > 25 \mu\text{g/mL}$) (Tabela 10).

Tabela 10: Valores da CI_{50} (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular e intervalo de confiança de 95%, realizado pelo teste de MTT, após 72 horas de incubação).

Teste de Inibição – CI_{50} (72h)		
Compostos Mesoioônicos		
Linhagens	MIH 2.4BI	MIH 2.4Zn
HEp-2	0,87 $\mu\text{g/mL}$ (0,6 – 1,1)	0,68 $\mu\text{g/mL}$ (0,5 – 0,8)
HT-29	6,3 $\mu\text{g/mL}$ (5,6 – 7,0)	10,16 $\mu\text{g/mL}$ (6,6 – 15,4)
HL-60	0,63 $\mu\text{g/mL}$ (0,45 – 0,73)	0,57 $\mu\text{g/mL}$ (0,39 – 0,69)
MCF7	8,364 $\mu\text{g/mL}$ (6,937 – 10,08)	>25
RAW 264.7	12,69 $\mu\text{g/mL}$ (9,9 – 16,1)	14,66 (12,9 – 16,6)
T47D	>25	>25
4T1	>25	>25

Os dados obtidos no presente estudo no que se refere à citotoxicidade dos compostos mesoioônicos MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn para as linhagens HEp-2 e HL-60 corroboram com resultados apresentados na literatura de análises realizadas com outros compostos mesoioônicos. Grynberg et al (1997) demonstraram em seus estudos que os compostos mesoioônicos MI-D e MI-J provocaram inibição significativa do crescimento ascético de Sarcoma-180 e do crescimento do Carcinoma de Ehrlich, quando administrados por via intraperitoneal.

Compostos mesoioônicos com o zinco vem sendo amplamente estudados, devido à sua atividade antioxidante e ao seu potencial promissor como quimioterápicos (FERNANDES; MAFRA, 2005).

Ripamont et al (1998) observaram que pacientes com câncer que receberam suplementação de zinco antes e durante a radioterapia apresentaram melhor acuidade e recuperação mais rápida do paladar em relação aos indivíduos com o

mesmo tratamento e não-suplementados, sugerindo, também, que o zinco potencializa a ação do tratamento contra o câncer.

Considerando os parâmetros essenciais no desenvolvimento de novas drogas contra o câncer, um ponto importante a ser considerado é o equilíbrio entre os efeitos terapêuticos e toxicológicos da substância. Uma vez que muitas drogas possuem atividade citotóxica, porém não são seletivas apenas para células tumorais e acabam por afetar células não-tumorais (MISHRA; KHULLAR; BHATIA, 2011).

Sendo assim, além de possuir atividade citotóxica, é importante que os quimioterápicos ou substâncias que estejam sendo testados com esta finalidade, apresentem seletividade por células tumorais em detrimento de células saudáveis. O índice de seletividade (IS) é uma grandeza matemática que expressa essa relação, sendo considerável e aceitável para quimioterápicos um valor maior do que dois. Para determinar o IS, basta efetuar a razão da concentração inibitória CI_{50} da substância em linhagens normais pela CI_{50} em linhagens tumorais (HOUGHTON et al, 2007).

Neste aspecto, as moléculas testadas se mostraram seletivas para células tumorais, necessitando nestas linhagens, de doses 1,51 a 20,14 (para o composto MIH 2.4BI) e de 1,44 a 25,71 (para o composto MIH 2.4Zn) vezes menores que as doses necessárias para produzir o mesmo efeito citotóxico na linhagem de células saudáveis de macrófagos murinos peritoneais (RAW 264.7). É importante destacar que tanto o composto MIH 2.4BI quanto MIH 2.4Zn apresentou melhores IS para as linhagens HEP-2 (14,58 e 20,14, respectivamente) e HL-60 (21,55 e 25,71, respectivamente), resultados estes que estão dentro dos parâmetros aceitáveis para quimioterápicos (HOUGHTON et al, 2007) (Tabela 11).

Tabela 11: Valores referentes ao Índice de Seletividade (IS), calculado através da razão da CI_{50} (72h) dos compostos mesoiônicos MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn na linhagem normal RAW 264.7 pela CI_{50} (72h) dos mesmos compostos em células tumorais. *NT = Não testado (as linhagens tumorais que apresentaram CI_{50} (72h) acima de 25 $\mu\text{g/mL}$ não foram submetidas ao teste de seletividade).

Índice de Seletividade (IS)		
Compostos Meso-iônicos		
Linhagens	MIH 2.4BI	MIH 2.4Zn
HEp-2	14,58	21,55
HT-29	2,01	1,44
HL-60	20,14	25,71
MCF7	1,51	NT
T-47D	NT	NT
4T1	NT	NT

Legenda: NT = Não testado (as linhagens tumorais que apresentaram CI_{50} (72h) acima de 25 $\mu\text{g/mL}$ não foram submetidas ao teste de seletividade).

O direcionamento de investigações relacionadas ao mecanismo de ação de novos compostos sintéticos é de grande importância para a identificação do possível alvo terapêutico que eles interagem. Sendo assim, é importante que as alterações provocadas nas células tratadas com estes compostos sejam observadas em tempos menores de exposição ao tratamento.

Foi realizado o teste de citotoxicidade nos tempos de 24 e 48 horas na linhagem HL-60. Esta linhagem foi selecionada para a realização dos estudos de mecanismos de ação, considerando os resultados obtidos no índice de seletividade.

Com base nos dados apresentados na tabela 12, foi possível verificar que os compostos apresentaram melhor atividade citotóxica no tempo de 48 horas, apresentando a CI_{50} no valor de 3,5 $\mu\text{g/mL}$ para o composto MIH 2.4BI e 5,0 $\mu\text{g/mL}$ para o composto MIH 2.4Zn.

Tabela 12: Valores da CI_{50} obtidos através do tratamento das células de HL-60 com os compostos MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn nos tempos de 24 e 48 horas.

Compostos	Linhagem HL-60	
	CI_{50} 24 horas	CI_{50} 48 horas
MIH 2.4BI	>25	3,5 $\mu\text{g/mL}$ (3,0 – 4,0)
MIH 2.4Zn	>25	5,0 $\mu\text{g/mL}$ (4,5 – 5,0)

Segundo estudos realizados por SENFF-RIBEIRO et al (2004) e BHOSALE et al (2015), os compostos mesoiônicos são agentes antiproliferativos potentes em relação às células tumorais, com efeito modesto sobre tecidos normais, clinicamente bem tolerados.

Ao longo de décadas, diversos estudos clínicos tem sido desenvolvidos em todo o mundo para avaliar os efeitos desses compostos na clínica e avançar no sentido de tornar essas substâncias acessíveis aos pacientes com câncer. Contudo, ainda há um longo caminho pela frente, uma vez que as evidências do uso clínico ainda são limitadas.

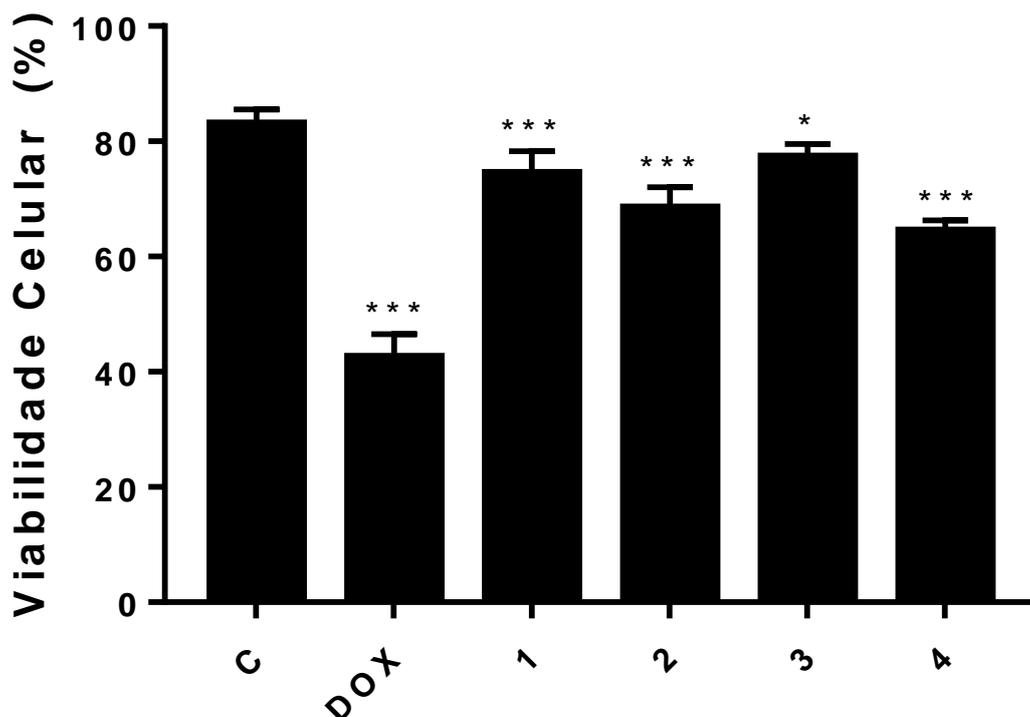
A partir da realização de dois experimentos independentes, cada um em triplicata, em células da linhagem HL-60 tratadas com as concentrações 3,5 e 7,0 $\mu\text{g/mL}$ para o composto MIH 2.4BI e 5,0 e 10,0 $\mu\text{g/mL}$ para o composto MIH 2.4Zn, foi possível realizar a leitura de 5000 células por amostras para a avaliação da viabilidade celular. Para tanto, observou-se que as concentrações dos compostos selecionadas com base nas curvas concentração-resposta obtidas no ensaio de MTT com estas células e da doxorrubicina, apresentaram diferença significativa, reduzindo o número de células vivas em comparação com o controle negativo, após um período de 48h de tratamento (Tabela 13, Figura 31).

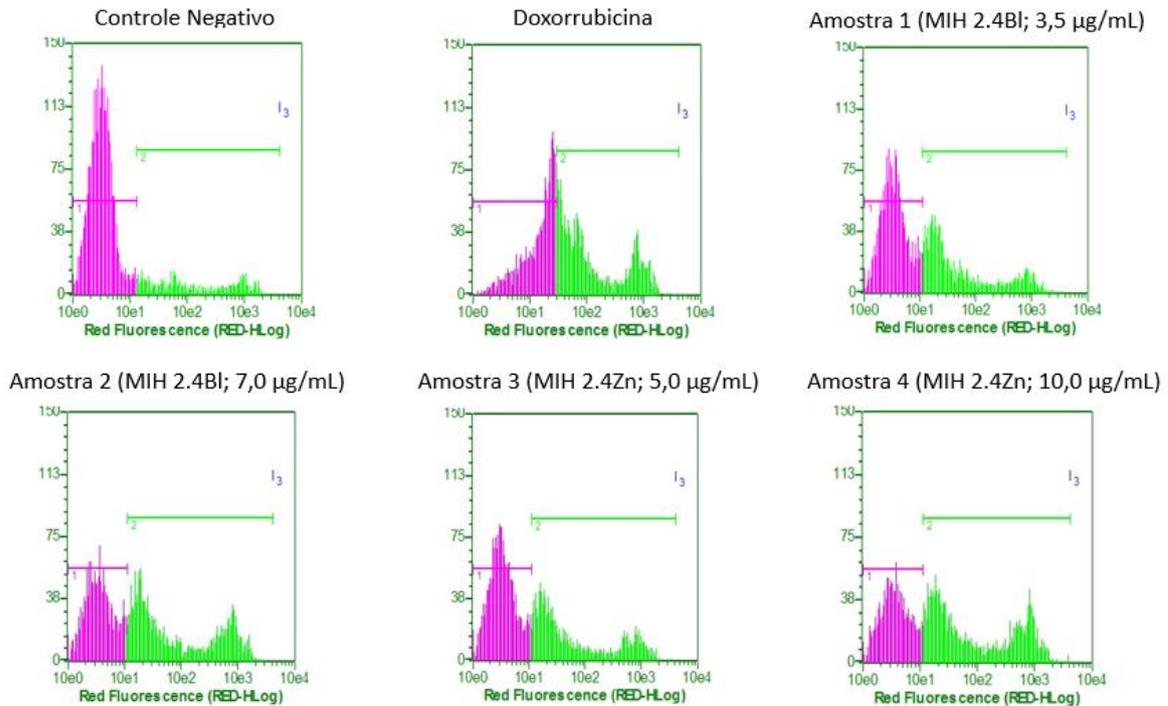
Tabela 13: Efeitos dos compostos MIH 2.4 BI e MIH 2.4Zn na linhagem celular HL-60, após 48h de incubação.

HL-60	Doxorrubicina (0,78 µg/mL)	Amostra 1: MIH 2.4BI (3,5µg/mL)	Amostra 2: MIH 2.4BI (7,0µg/mL)	Amostra 3: MIH 2.4Zn (5,0µg/mL)	Amostra 4: MIH 2.4Zn (10,0µg/mL)
Viabilidade Celular	42,5% (± 4,04)	74,44% (± 3,89)	68,43% (± 3,58)	77,28% (± 2,22)	64,47% (± 1,84)

Legenda: O controle negativo foi tratado com veículo (DMSO) a 0,1%. A doxorrubicina (0,78 µg/mL) foi utilizada como controle positivo. Todas as amostras foram comparadas com o controle negativo. Os dados foram expressos em valores percentuais médios \pm DP.

Figura 31: Teste de viabilidade celular envolvida na ação citotóxica dos compostos mesoiônicos, na linhagem HL-60, após 48h de incubação.





Legenda: A amostra “C” corresponde ao controle negativo que foi tratado com o veículo (DMSO); a doxorubicina foi utilizada como controle positivo (0,78 µg/mL); a amostra “1” equivale ao tratamento com o composto MIH 2.4BI (3,5 µg/mL); a amostra “2” equivale ao tratamento com o composto MIH 2.4BI (7,0 µg/mL); a amostra “3” equivale ao tratamento com o composto MIH 2.4Zn (5,0 µg/mL); e a amostra “4” equivale ao tratamento com o composto MIH 2.4Zn (10,0 µg/mL). * $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado com o controle negativo por meio do teste ANOVA, seguido do teste de Dunnet de múltiplas comparações, com p (Alpha) = 0,05 e 95% de significância. Os dados foram expressos em valores percentuais médios \pm DP.

Estes resultados corroboram com os estudos realizados por Senff-Ribeiro et al (2004), que investigou a ação do composto mesoiônico MI-D (1,3,4-thiadiazolium) frente ao melanoma humano. Neste, observou-se que o mesoiônico diminuiu a viabilidade e a proliferação das linhagens celulares MEL-85, SK-MEL, A2058 e melanoma maligno humano (MeWo) *in vitro*, mostrando uma atividade citotóxica considerável nestas células humanas.

Outro estudo realizado por Senff-Ribeiro et al (2003), analisou a ação do composto mesoiônico MI-D em outra linhagem celular. Para os ensaios *in vitro*,

verificou-se que o composto MI-D interfere na viabilidade e proliferação celular da linhagem B16-F10, reduzindo-as de modo dose-dependente. Para os ensaios *in vivo*, a atividade antitumoral do fármaco foi avaliada utilizando o mesmo tumor de melanoma B16-F10 subcutâneo em camundongos. Estes apresentaram resultados bastante promissores, com inibição de 85% do crescimento do tumor através do tratamento com o MI-D, corroborando também com os achados do presente trabalho, que apresentaram redução significativa da viabilidade celular.

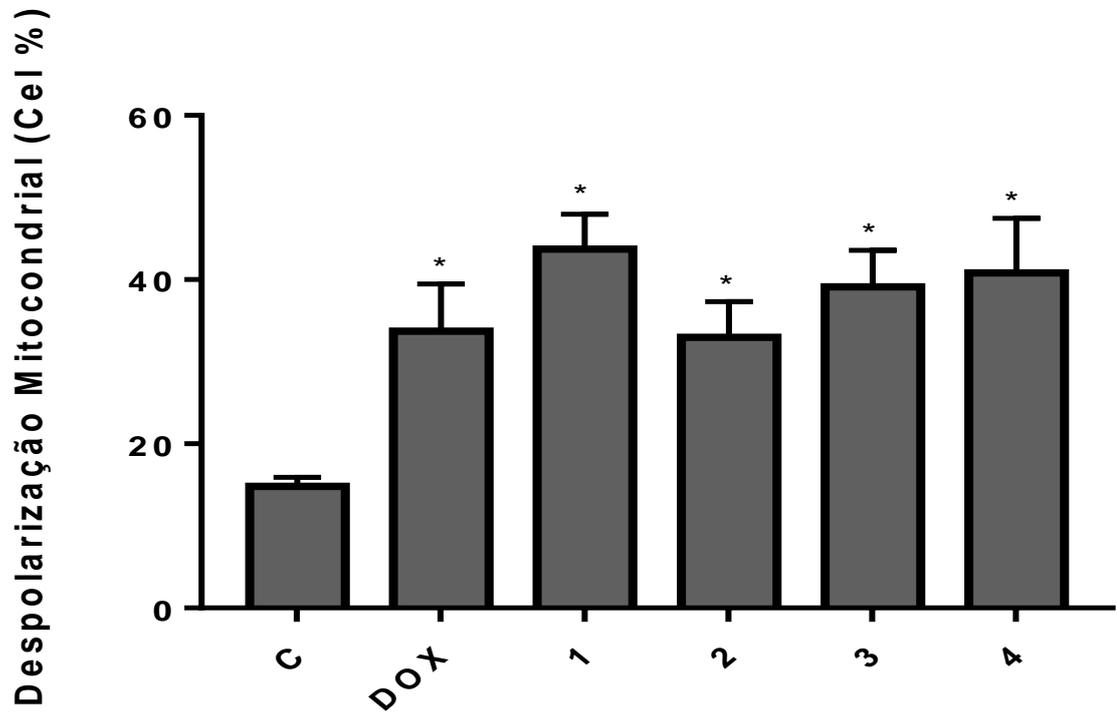
No presente estudo, a partir da realização de dois experimentos independentes, cada um em triplicata, os resultados demonstraram que os compostos mesoiônicos testados com suas respectivas concentrações causaram danos significativos na membrana mitocondrial, promovendo a sua despolarização na linhagem celular testada (HL-60), quando comparados com o controle negativo, após um período de exposição das células ao tratamento de 48 horas (Tabela 14; Figura 32).

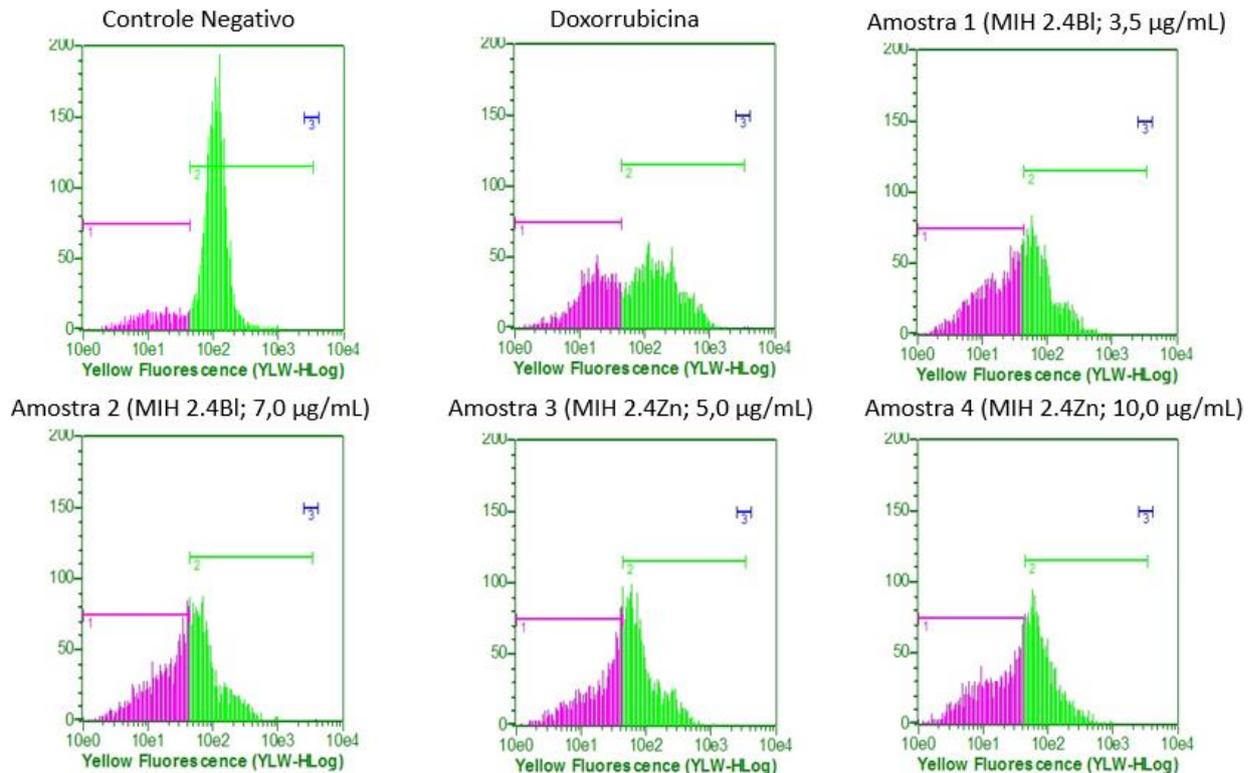
Tabela 14: Efeitos dos compostos MIH 2.4 BI e MIIH 2.4Zn na mitocôndria celular da linhagem HL-60, após 48h de incubação.

HL-60	Controle Negativo	Doxorrubicina (0,78 µg/mL)	Amostra 1: MIH 2.4BI (3,5µg/mL)	Amostra 2: MIH 2.4BI (7,0µg/mL)	Amostra 3: MIH 2.4Zn (5,0µg/mL)	Amostra 4: MIH 2.4Zn (10,0µg/mL)
% Células						
Despolarização	14,81%	33,71%	43,72%	32,95%	39,12%	40,81%
Mitocondrial	(± 5,76)	(± 5,76)	(± 4,28)	(± 4,40)	(± 4,47)	(± 6,65)

Legenda: O controle negativo foi tratado com veículo (DMSO) a 0,1%. A doxorrubicina (0,78 µg/mL) foi utilizada como controle positivo. Todas as amostras foram comparadas com o controle negativo. Os dados foram expressos em valores percentuais médios ± DP.

Figura 32: Avaliação da despolarização da membrana mitocondrial em células da linhagem HL-60 tratadas com os compostos MIH 2.4BI e MIIH 2.4Zn, após 48h de incubação.





Legenda: A amostra “C” corresponde ao controle negativo que foi tratado com o veículo (DMSO) a 0,1%; a doxorrubicina foi utilizada como controle positivo (0,78 µg/mL); a amostra “1” equivale ao tratamento com o composto MIH 2.4BI (3,5 µg/mL); a amostra “2” equivale ao tratamento com o composto MIH 2.4BI (7,0 µg/mL); a amostra “3” equivale ao tratamento com o composto MIH 2.4Zn (5,0 µg/mL); e a amostra “4” equivale ao tratamento com o composto MIH 2.4Zn (10,0 µg/mL). * $p < 0,01$, comparado com o controle negativo por meio do teste ANOVA, seguido do teste de Dunnet de múltiplas comparações, com p (Alpha) = 0,05 e 95% de significância. Os dados foram expressos em valores percentuais médios \pm DP.

Em virtude do papel central da mitocôndria e, conseqüentemente, do seu potencial de membrana, na manutenção das funções bioenergéticas e metabólicas da célula, para garantir a sobrevivência dessa e sua relação com o processo de morte por apoptose, torna-se essencial a avaliação do potencial de membrana mitocondrial em células expostas à drogas antitumorais, a fim de comprovar a ativação da via intrínseca da apoptose (TAIT; GREEN, 2010; LOPEZ; TAIT, 2015).

Baseada na marcação da fosfatidilserina (PS) com a Anexina V (TUSCHL et al, 2004), o padrão de morte na linhagem celular HL-60 foi avaliado em diferentes

concentrações para os compostos MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn e comparado com o controle negativo.

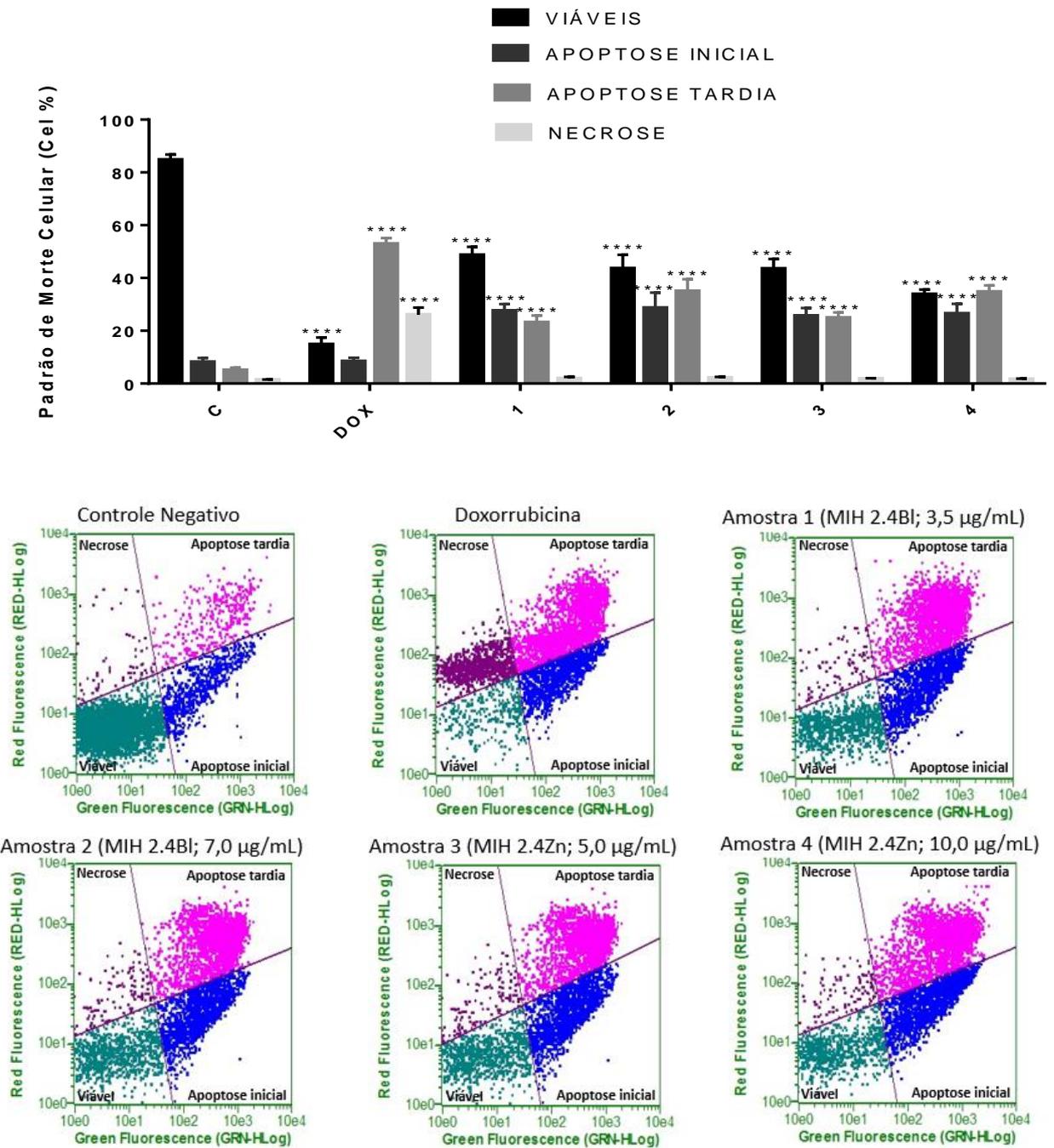
A partir dos experimentos realizados, pode-se observar que os compostos mesoiônicos analisados (MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn) apresentaram atividade apoptótica concentração-dependente para as células leucêmicas. Os compostos mesoiônicos, a partir das concentrações testadas, 3,5 µg/mL e 7,0 µg/mL para o MIH 2.4BI e 5,0 µg/mL e 10,0 µg/mL para o MIH 2.4Zn, diminuíram significativamente ($p < 0,0001$) o percentual de células viáveis em comparação com o controle negativo. Com relação aos eventos apoptóticos, os tratamentos das células com os compostos mesoiônicos apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo controle em todas as concentrações testadas: MIH 2.4BI (3,5 µg/mL e 7,0 µg/mL) e MIH 2.4Zn (5,0 µg/mL e 10,0 µg/mL) ($p < 0,0001$ e CI = 95%). Contudo, não houve diferença estatisticamente significativa para os registros de necrose quando comparados as concentrações testadas dos compostos em relação ao grupo controle (Tabela 15; Figura 33).

Tabela 15: Efeitos dos compostos MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn no padrão de morte celular na linhagem HL-60, após 48h de incubação.

HL-60	Controle Negativo	Doxorrubicina	Amostra 1: MIH 2.4BI (3,5µg/mL)	Amostra 2: MIH 2.4BI (7,0µg/mL)	Amostra 3: MIH 2.4Zn (5,0µg/mL)	Amostra 4: MIH 2.4Zn (10,0µg/mL)
Normais (Viáveis)	84,73 ± 2,07	14,78 ± 2,69	48,63 ± 3,14	43,51 ± 5,28	43,45 ± 3,78	33,83 ± 1,83
Apoptose Inicial	8,14 ± 1,56	8,41 ± 1,33	27,55 ± 2,59	28,66 ± 5,79	25,59 ± 3,04	26,48 ± 3,70
Apoptose Tardia	5,077 ± 0,95	52,86 ± 2,29	23,12 ± 2,71	34,95 ± 4,55	24,87 ± 2,11	34,7 ± 2,54
Necrose	1,412 ± 0,16	26,06 ± 2,72	1,912 ± 0,62	2,103 0,47	1,832 0,24	1,595 0,27

Legenda: O controle negativo foi tratado com veículo (DMSO) a 0,1%. A doxorrubicina (0,78 µg/mL) foi utilizada como controle positivo. Todas as amostras foram comparadas com o controle negativo. Os dados foram expressos em valores percentuais médios ± DP.

Figura 33: Investigação do padrão de morte celular (células viáveis, apoptose inicial, apoptose tardia e necrose provocado pela ação dos compostos MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn na linhagem celular HL-60, após 48h de incubação.



Legenda: A amostra “C” corresponde ao controle negativo que foi tratado com o veículo (DMSO) a 0,1%; a doxorrubicina foi utilizada como controle positivo (0,78 µg/mL); a amostra “1” equivale ao tratamento com o composto MIH 2.4BI (3,5 µg/mL); a amostra “2” equivale ao tratamento com o composto MIH 2.4BI (7,0 µg/mL); a amostra “3” equivale ao tratamento com o composto MIH 2.4Zn (5,0 µg/mL); e a amostra “4” equivale ao tratamento com o composto MIH 2.4Zn (10,0 µg/mL). **** $p < 0,0001$, comparado com o controle negativo por meio do teste ANOVA, seguido do teste de Dunnet de múltiplas comparações, com p (Alpha) = 0,05 e 95% de significância. Os dados foram expressos em valores percentuais médios \pm DP.

Uma das vantagens de induzir a apoptose como forma de morte celular pelos quimioterápicos está relacionada ao fato de que as células podem ser eliminadas pelo sistema imunológico sem desencadear uma resposta inflamatória (LIU et al, 2011).

Somado ao anteriormente exposto, estudos com compostos derivados do mesoiônico 1,3,4-thiadiazolium em linhagem celular de hepatocarcinoma (HepG2) observaram uma redução estatisticamente significativa das células tumorais em relação às células saudáveis (hepatócitos de rato), promovendo aumento da citotoxicidade para as células tumorais e morte celular por apoptose (GOZZI et al, 2015).

Outros estudos revelam os compostos mesoiônicos como desacopladores de fosforilação mitocondrial e sugerem que a indução da apoptose pode ser uma consequência da atividade citotóxica dos compostos mesoiônicos. O metabolismo mitocondrial pode superar a resistência à apoptose em células cancerosas (CADENA et al, 1998; SUSIN et al, 1998; COLOMBO et al, 2001; CADENA et al, 2002; SENFF-RIBEIRO et al, 2004).

Dessa forma, sugere-se que os compostos mesoiônicos MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn podem indicar um potencial farmacológico, atuando de forma seletiva em células tumorais de leucemia, induzindo eventos celulares que culminam na morte do tumor por apoptose.

É importante considerar que os compostos que venham a ser identificados como candidatos a fármacos antineoplásicos devem atuar no bloqueio da proliferação das células tumorais. Sendo assim, é fundamental avaliar a fase específica do ciclo celular que os compostos em análise possam vir a atuar.

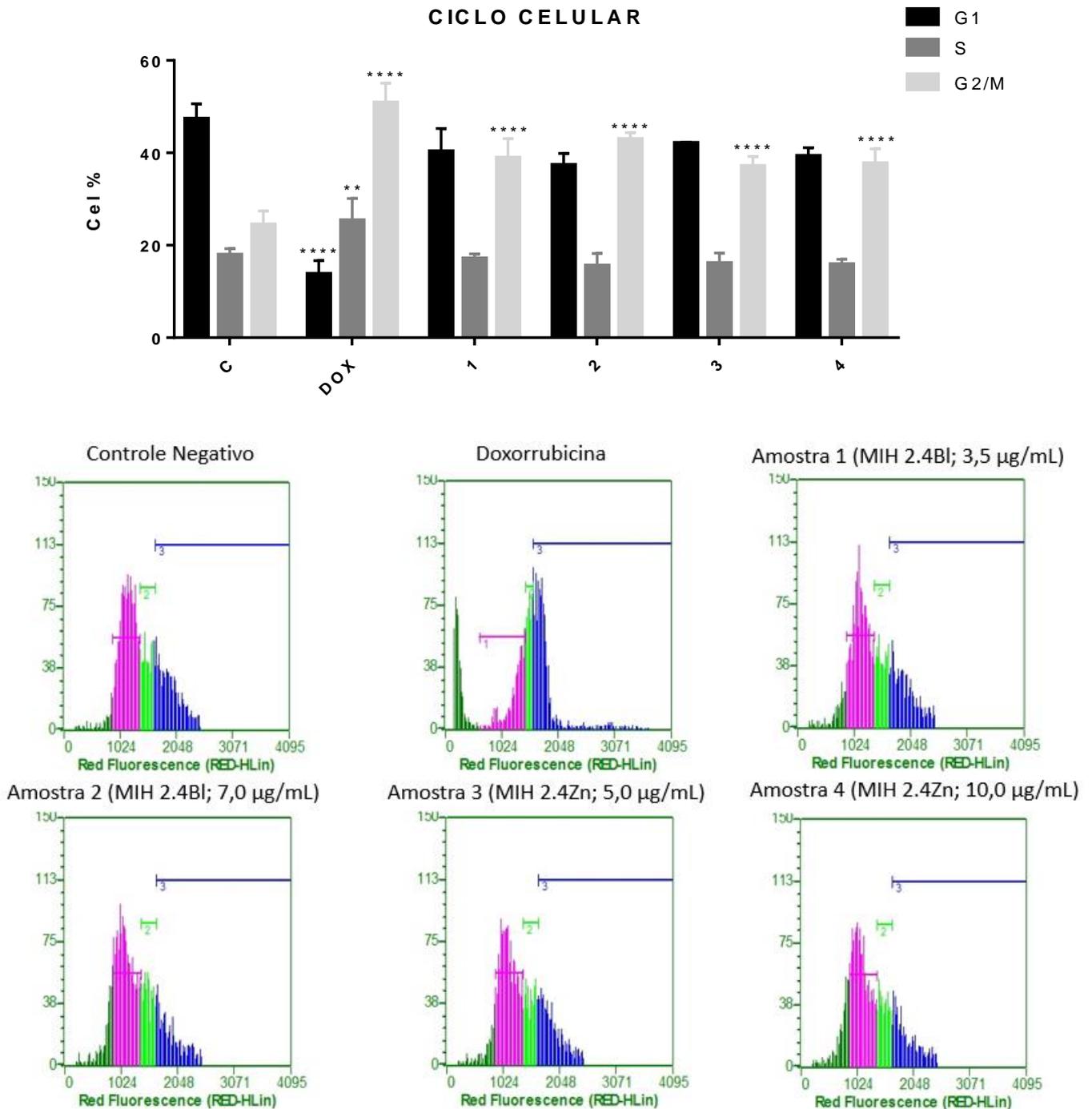
Os resultados do presente estudo mostraram que os compostos mesoiônicos MIH 2.4BI (nas concentrações 3,5 µg/mL e 7,0 µg/mL) e MIH 2.4Zn (nas concentrações 5,0 µg/mL e 10,0 µg/mL) causaram interrupção do ciclo celular na fase G2 quando comparados ao controle negativo (Tabela 16; Figura 34).

Tabela 16: Efeitos dos compostos MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn no ciclo celular na linhagem celular HL-60.

Fases do Ciclo Celular	Controle Negativo	Doxorrubicina (0,78 µg/mL)	Amostra 1: MIH 2.4BI (3,5µg/mL)	Amostra 2: MIH 2.4BI (7,0µg/mL)	Amostra 3: MIH 2.4Zn (5,0µg/mL)	Amostra 4: MIH 2.4Zn (10,0µg/mL)
G1	47,39 ± 3,25	13,77 ± 2,88	40,32 ± 4,97	37,38 ± 2,47	42,1 ± 0,18	39,32 ± 1,78
S	17,91 ± 1,37	25,38 ± 4,75	17,14 ± 0,98	15,55 ± 2,65	16,14 ± 2,16	15,85 ± 1,11
G2/M	24,49 ± 2,93	50,89 ± 4,19	38,92 ± 4,17	42,92 ± 1,40	37,15 ± 2,06	37,73 ± 3,12

Legenda: O controle negativo foi tratado com veículo (DMSO) a 0,1%. A doxorrubicina (0,78 µg/mL) foi utilizada como controle positivo. Todas as amostras foram comparadas com o controle negativo. Os dados foram expressos em valores percentuais médios ± DP.

Figura 34: Ensaio do ciclo celular na linhagem HL-60 tratada com os compostos MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn.



Legenda: A amostra “C” corresponde ao controle negativo que foi tratado com o veículo (DMSO) a 0,1%; a doxorubicina foi utilizada como controle positivo (0,78 µg/mL); a amostra “1” equivale ao tratamento com o composto MIH 2.4BI (3,5 µg/mL); a amostra “2” equivale ao tratamento com o composto MIH 2.4BI (7,0 µg/mL); a

amostra “3” equivale ao tratamento com o composto MIH 2.4Zn (5,0 µg/mL); e a amostra “4” equivale ao tratamento com o composto MIH 2.4Zn (10,0 µg/mL). ** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$, comparado com o controle negativo por meio do teste ANOVA, seguido do teste de Dunnet de múltiplas comparações, com p (Alpha) = 0,05 e 95% de significância. Os dados foram expressos em valores percentuais médios \pm DP.

O câncer é uma doença multigênica, caracterizada pelo acúmulo de alterações que permitem a célula romper uma série de barreiras proliferativas, provocando sua multiplicação desordenada. Hanahan e Weinberg (2000) identificaram seis características principais na maioria dos tipos de tumores: auto-suficiência em sinais de crescimento, ausência de resposta a sinais anti-crescimento, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese, invasão tecidual e metástase. Whitfield et al (2006), ao analisar células cancerígenas por *microarrays*, apontou que 62% dos genes encontrados alterados constituem genes envolvidos diretamente com a proliferação ou com a regulação de outros processos do ciclo celular. Dados encontrados em outros estudos corroboram para que o câncer seja cada vez mais visto como uma doença do ciclo celular (BARTEK et al, 1999; SHERR; McCORMICK, 2002).

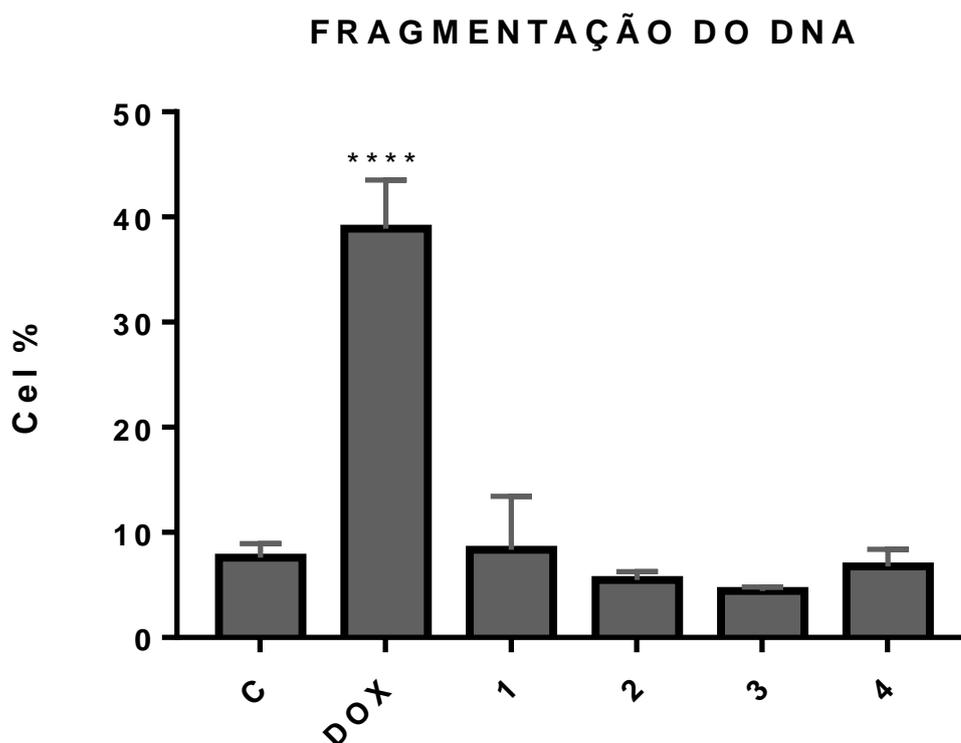
A tabela 17 e figura 35 apresenta o percentual de células que apresentaram fragmentação do DNA, característica envolvida principalmente na morte celular por apoptose. Para esta análise, é possível verificar que não houve diferença estatística significativa quando comparados as concentrações utilizadas dos compostos MIH 2.4BI (3,5 µg/mL e 7,0 µg/mL) e MIH 2.4Zn (5,0 µg/mL e 10,0 µg/mL) com o controle negativo ($p < 0,0001$).

Tabela 17: Efeitos dos compostos MIH 2.4 BI e MIIH 2.4Zn na fragmentação do DNA de células da linhagem HL-60.

HL-60	Controle Negativo	Doxorrubicina	Amostra 1: MIH 2.4BI (3,5µg/mL)	Amostra 2: MIH 2.4BI (7,0µg/mL)	Amostra 3: MIH 2.4Zn (5,0µg/mL)	Amostra 4: MIH 2.4Zn (10,0µg/mL)
Fragmentação	7,603 ± 1,323	38,91 ± 4,61	8,358 ± 5,07	5,473 ± 0,78	4,458 ± 0,35	6,753 ± 1,68

Legenda: O controle negativo foi tratado com veículo (DMSO) a 0,1%. A doxorrubicina (0,78 µg/mL) foi utilizada como controle positivo. Todas as amostras foram comparadas com o controle negativo. Os dados foram expressos em valores percentuais médios ± DP.

Figura 35: Avaliação da fragmentação do DNA de células da linhagem HL-60, tratadas com os compostos MIH 2.4 BI e MIIH 2.4Zn.



Legenda: A amostra "C" corresponde ao controle negativo que foi tratado com o veículo (DMSO) a 0,1%; a doxorrubicina foi utilizada como controle positivo (0,78 µg/mL); a amostra "1" equivale ao tratamento com o composto MIH 2.4BI (3,5 µg/mL);

a amostra “2” equivale ao tratamento com o composto MIH 2.4BI (7,0 µg/mL); a amostra “3” equivale ao tratamento com o composto MIH 2.4Zn (5,0 µg/mL); e a amostra “4” equivale ao tratamento com o composto MIH 2.4Zn (10,0 µg/mL). ** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$, comparado com o controle negativo por meio do teste ANOVA, seguido do teste de Dunnet de múltiplas comparações, com p (Alpha) = 0,05 e 95% de significância. Os dados foram expressos em valores percentuais médios \pm DP.

Um estudo realizado por Gozzi et al (2015) verificou que células da linhagem de HepG2 tratadas com o composto mesoiônico MI-D não apresentaram nenhuma fragmentação do DNA, corroborando com os dados apresentados neste estudo.

A apoptose é um importante contraponto à mitose na regulação da quantidade de células durante o desenvolvimento, na renovação celular homeostática do indivíduo adulto e em muitas outras situações como a eliminação de células com danos genômicos ou celulares (MITTLER; SHULAEV, 2003).

A apoptose é um processo ativo que pode ser deflagrado por amplo espectro de estímulos, tanto intra como extracelulares. É controlada por genes específicos que podem participar de cinco passos sequenciais e distintos, dentre outros: a decisão da célula individual de morrer ou viver, ativação dos mecanismos de morte celular, execução do processo de morte, fagocitose da célula moribunda e degradação da célula morta (WU; XUE, 2003).

Alguns genes foram estudados por participarem dos mecanismos de apoptose, seja como protetores ou como promotores. A via mitocondrial da apoptose é controlada pela família das proteínas Bcl-2 que também controla a via extrínseca do receptor da morte celular. O *BCL-2* é um proto-oncogene que produz a proteína Bcl-2, cuja função biológica é suprimir a morte celular programada (apoptose) induzida por vários estímulos e tendo eficácia proporcional ao nível de expressão proteica (BATISTATOU et al, 1993).

O proto-oncogene *BCL-2* que codifica a proteína Bcl-2 inibidora da apoptose poderia estar implicando tanto na tumorigênese quanto na progressão e sobrevivência de células tumorais. A família das proteínas Bcl-2 pode ser subdividida em três subfamílias: aquelas representadas pelo *BCL-2/BCL-XL*, que inibe a morte celular

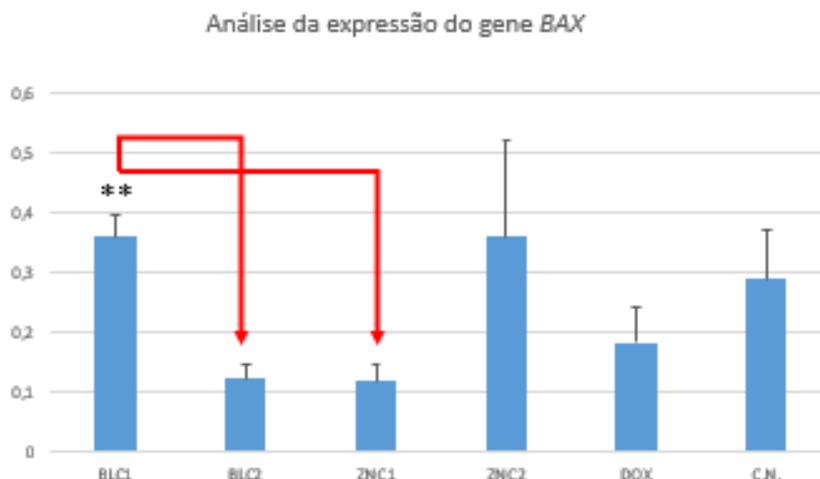
programada por distintos mecanismos, como prevenção da liberação de proteínas mitocondriais e as duas subfamílias pró-apoptóticas representadas pela *BAX/BAK* e *BID/BIM* (KUAN; KUIDA, 2003).

Praticamente todos os estímulos que desencadeiam a apoptose ocorrem via ação das caspases. Estas podem ser subdivididas em via ascendente ou iniciadoras (que incluem as caspases longas 2, 8, 9 e 10) e via descendente ou efetoras (que incluem as caspases curtas 3, 7 e 9) (MURPHY; MARTIM, 2003).

O estudo dos genes envolvidos na apoptose destes tumores pode fornecer um marcador de comportamento tumoral confiável e, por sua vez, podendo ser utilizado para estabelecer o prognóstico dos pacientes. São muitos os genes e proteínas que estão envolvidos nas vias de apoptose. No presente estudo, optou-se pela análise do *BAX* e *BCL-2* por serem genes que atuam como anti e pró-apoptóticos, respectivamente, pois participam da via mitocondrial da apoptose, além do estudo da *CASPASE 9* por ter ação iniciadora na cascata da morte celular por apoptose pela via intrínseca e a *CASPASE 3*, uma vez que é a via final comum de quase todas as vias apoptóticas.

Na figura 36 é possível verificar os resultados obtidos através da análise da expressão do gene *BAX* nas células da linhagem HL-60, tratadas com as concentrações dos compostos mesoiônicos MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn. Para este gene, observou-se que houve diferença estatística significativa somente quando comparados a expressão na amostra BLC1 (concentração de 3,5 µg/mL do composto MIH 2.4BI) em detrimento da amostra BLC2 (concentração de 7,0 µg/mL do composto MIH 2.4BI) ($p < 0,05$) e quando comparados a expressão do gene na amostra BLC1 em relação à amostra ZNC1 (concentração de 5,0 µg/mL do composto MIH 2.4Zn), ($p < 0,05$). Para as demais comparações entre as amostras não houve correlação estatisticamente significativa.

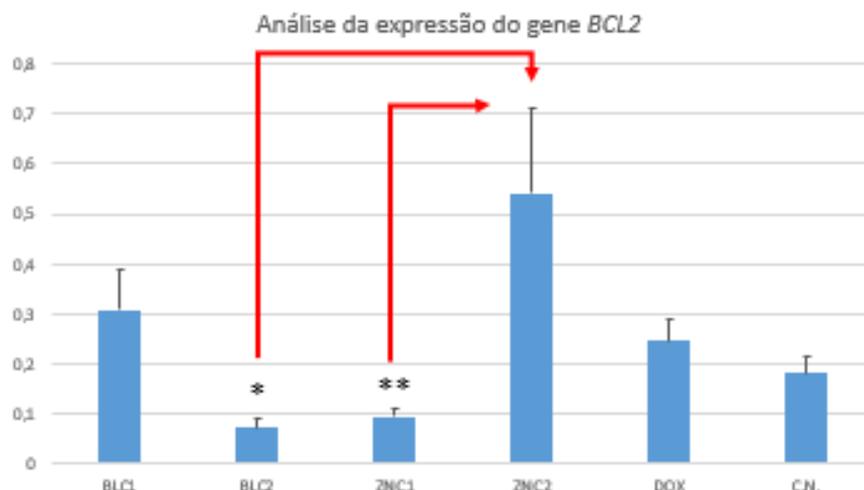
Figura 36: Gráfico da expressão do gene *BAX*.



Legenda: Amostra BLC1 (concentração de 3,5 µg/mL do composto MIH 2.4BI); Amostra BLC2 (concentração de 7,0 µg/mL do composto MIH 2.4BI); Amostra ZNC1 (concentração de 5,0 µg/mL do composto MIH 2.4Zn); Amostra ZNC2 (concentração de 10,0 µg/mL do composto MIH 2.4Zn). Para esta análise foi realizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis do teste ANOVA, seguida do teste de múltiplas comparações de Dunn ($p < 0,05$), utilizando o programa SPSS.

O gene *BAX* teve sua expressão aumentada na amostra BLC1 em relação à amostra BLC2 e ZNC1. Sabe-se que este gene é um promotor da apoptose. E ao dobrar a concentração do tratamento com o composto MIH 2.4BI houve diminuição da expressão deste gene. Este resultado pode estar associado à expressão do gene *BCL2* nas mesmas amostras, conforme apresentado na figura 37.

Figura 37: Análise da expressão do gene *BCL2*.



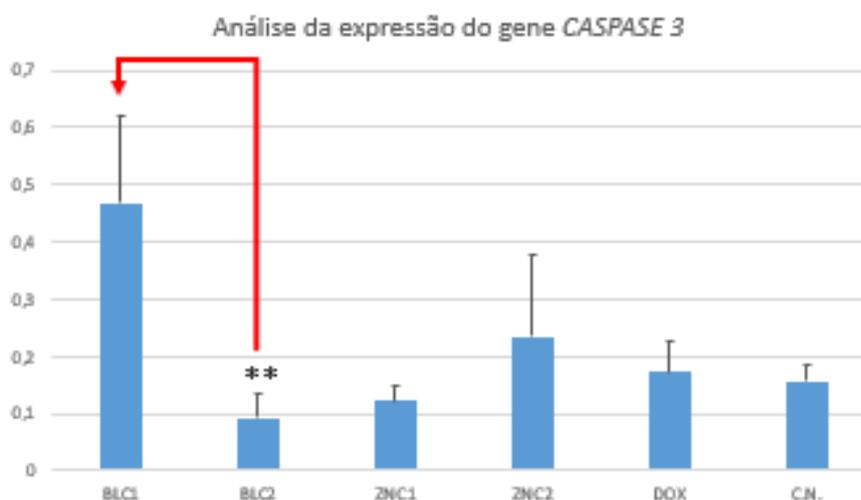
Legenda: Amostra BLC1 (concentração de 3,5 $\mu\text{g/mL}$ do composto MIH 2.4BI); Amostra BLC2 (concentração de 7,0 $\mu\text{g/mL}$ do composto MIH 2.4BI); Amostra ZNC1 (concentração de 5,0 $\mu\text{g/mL}$ do composto MIH 2.4Zn); Amostra ZNC2 (concentração de 10,0 $\mu\text{g/mL}$ do composto MIH 2.4Zn). Para esta análise foi realizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis do teste ANOVA, seguida do teste de múltiplas comparações de Dunn ($p < 0,05$), utilizando o programa SPSS.

Ao analisar a expressão do gene inibidor da apoptose *BCL2* nas células da linhagem HL-60, tratadas com as concentrações dos compostos mesoiônicos MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn foi possível observar que houve diferença estatisticamente significativa quando comparados a expressão deste gene na amostra BLC2 (concentração de 7,0 $\mu\text{g/mL}$ do composto MIH 2.4BI) *versus* a amostra ZNC2 (concentração de 10,0 $\mu\text{g/mL}$ do composto MIH 2.4Zn) ($p < 0,01$) e quando comparados a expressão do gene na amostra ZNC1 (concentração de 5,0 $\mu\text{g/mL}$ do composto MIH 2.4Zn) em relação à amostra ZNC2 ($p < 0,05$). Para as demais comparações entre as amostras não houve correlação estatisticamente significativa (Figura 37).

Alguns autores avaliaram as proteínas Bcl-2 e Bax relacionadas à apoptose, através do uso de técnicas de imuno-histoquímica (IHQ) e observaram expressão diferenciada destas proteínas em adenomas e concluíram que estas proteínas podem estar relacionadas ao crescimento do tumor (SAMBAZIOTIS; KAPRANOS; KONTOGEORGOS, 2003; OZER et al, 2003).

Ao analisar a expressão da *CASPASE 3*, gene que participa da via final comum de quase todas as vias apoptóticas, observou-se diferença estatisticamente significativa somente quando comparadas as amostras de células HL-60 tratadas com o composto MIH 2.4BI: BLC2 (7,0 µg/mL) versus BLC1 (3,5 µg/mL) ($p < 0,05$) (Figura 38).

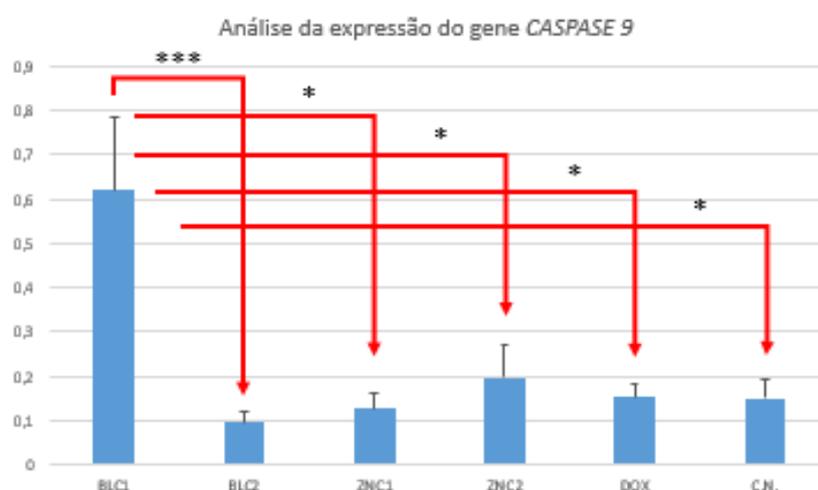
Figura 38: Análise da expressão do gene *CASPASE 3*.



Legenda: Amostra BLC1 (concentração de 3,5 µg/mL do composto MIH 2.4BI); Amostra BLC2 (concentração de 7,0 µg/mL do composto MIH 2.4BI); Amostra ZNC1 (concentração de 5,0 µg/mL do composto MIH 2.4Zn); Amostra ZNC2 (concentração de 10,0 µg/mL do composto MIH 2.4Zn). Para esta análise foi realizado o teste de variância da ANOVA, seguida do teste de múltiplas comparações de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$), utilizando o programa SPSS.

A partir da análise da expressão do gene da *CASPASE 9*, caspase iniciadora do processo de apoptose, foi possível verificar que houve diferença estatisticamente significativa quando comparados a amostra BLC1 com todas as demais amostras, incluindo o controle positivo e negativo: BLC1 *versus* BLC2 ($p < 0,001$); BLC1 *versus* ZNC1 ($p < 0,01$); BLC1 *versus* ZNC2 ($p < 0,01$); BLC1 *versus* doxorubicina ($p < 0,01$) e BLC1 *versus* controle negativo ($p < 0,01$) (Figura 39).

Figura 39: Análise da expressão do gene *CASPASE 9*.



Legenda: Amostra BLC1 (concentração de 3,5 µg/mL do composto MIH 2.4BI); Amostra BLC2 (concentração de 7,0 µg/mL do composto MIH 2.4BI); Amostra ZNC1 (concentração de 5,0 µg/mL do composto MIH 2.4Zn); Amostra ZNC2 (concentração de 10,0 µg/mL do composto MIH 2.4Zn). Para esta análise foi realizado o teste de variância da ANOVA, seguida do teste de múltiplas comparações de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$), utilizando o programa SPSS.

A Caspase 9 é um membro da via intrínseca e desempenha um papel central na via apoptótica mitocondrial. A via intrínseca é iniciada pela liberação do citocromo c das mitocôndrias em resposta ao estresse celular (BRATTON; SALVESEN, 2010). A morte celular programada ou a apoptose é um mecanismo de defesa essencial contra o desenvolvimento do câncer (EVAN; VOUSDEN, 2001).

Estudos sugerem que alguns polimorfismos na *CASPASE 9* podem influenciar a expressão da Caspase 9, modulando a susceptibilidade ao câncer (COTTER, 2009).

O processo de apoptose é influenciado por proteínas pró e anti-apoptóticas nos seus múltiplos passos. O equilíbrio entre a cascata das caspases, indutoras da morte celular, e as proteínas inibidoras da apoptose constituem ponto fundamental neste processo e apresenta grande potencial terapêutico (COTTER, 2009; YILMAZ, 2017).

Sendo assim, sugere-se que este resultados servirão como base para a continuidade dos estudos, através da investigação de outros genes, afim de elucidar melhor as vias de ação dos compostos teste e de indução de morte celular.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os compostos mesoiônicos analisados no presente estudo (MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn) são produtos que possuem atividade citotóxica seletiva para células tumorais, com maior índice de seletividade para as linhagens celulares HEp-2 e HL-60.

Estes compostos mesoiônicos possuem baixa toxicidade para células normais e desempenham atividade antitumoral, induzindo a morte das células por apoptose e parada do ciclo celular na fase G2.

Os compostos mesoiônicos testados com suas respectivas concentrações causaram danos significativos na membrana mitocondrial, promovendo a sua despolarização na linhagem celular testada (HL-60), quando comparados com o controle negativo, após um período 48h de exposição das células ao tratamento. Porém, não promoveram fragmentação do DNA para as mesmas concentrações testadas.

A análise da expressão dos genes *BAX*, *BCL2*, *CASPASE 3* e *CASPASE 9* foi importante para auxiliar no entendimento do processo de ação citotóxica dos compostos MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn. Contudo, há necessidade de investigar a expressão de outros genes para elucidar melhor as vias de ação dos compostos e de indução da morte celular.

Sendo assim, a partir dos resultados obtidos no presente estudo, foi realizado depósito do pedido de patente junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), cujo número do processo é BR 10 2016 026112 0 (Anexo A).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACS. AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts & Figures 2**. ed. Atlanta: American Cancer Society; 2011.

ACS. AMERICAN CANCER SOCIETY. **The history of cancer**. Atlanta, 2014.
Disponível em:
<<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002048-pdf>> Acesso em: 03 out. 2016.

ALBUQUERQUE, M. C. et al. Synthesis and schistosomicidal activity of new substituted thioxo-imidazolidine compounds. **Pharmazie**, Eschborn, v. 60, n. 1, p. 13–17, 2005.

ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Química Nova**, v. 28, p. 118–129, 2005.

AL-TEL, T. H. Design and synthesis of novel tetrahydro-2HPyrano[3,2-c]Pyridazin-3(6H)-one derivatives as potential anticancer agents. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 45, p. 5724–5731, 2010.

ANDERZHANOVA, E. et al. Effects of sydnocarb and D-amphetamine on the extracellular levels of amino acids in the rat caudate-putamen. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdã, v. 428, n. 1, p. 87–95, 2001.

ANGRIMANI, D. S. R., et al. Ferramentas para avaliação da funcionalidade da mitocôndria espermática. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 39, n. 2, p. 277–283, 2015.

ASHKENAZI, A. Targeting death and decoy receptors of the tumor-necrosis factor superfamily. **Nat Rev. Cancer**, v. 2, p. 420-430, 2002.

ASHKENAZI, A., HERBST, R.S., To kill a tumor cell: the potential of proapoptotic receptor agonists. **J Clin Invest.**, v. 118, p. 1979–1990, 2008.

ATHAYDE-FILHO, P. F. et al. Synthesis and Spasmolytic Activity of Mesoionic 1,4-Diphenyl-5-(5-Nitro-2-Furanyl)-1,3,4-Triazolium-2-Thiolate Hydrochloride. **Heterocyclic Communications**, Londres, v. 2, p. 573–580, 1996.

ATHAYDE-FILHO, P. F. et al. Synthesis Characterization and Evaluation of The Activity of Ten Mesoionic Compounds Against Microorganisms. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 18, n. 1, p. 17–22, 1999.

ATHAYDE-FILHO, P. F. et al. Mesoionic Compounds: Amphiphilic Heterocyclic Betaines. Synthesis. **Journal of Synthetic Organic Chemistry**, Berlim, v. 2000, n. 11, p. 1565–1568, 2000.

AZEVEDO, D. R. Psicooncologia e interdisciplinaridade: uma experiência na educação a distância. 1 ed., **EDIPUC RS**, 2004.

BADAMI, B. Mesoionic compounds: An unconventional class of aromatic heterocycles. **Resonance**, Bangalore, v. 11, n. 10, p. 40–48, 2006.

BAKER, W.M.A.; OLLIS, W.D. **Quart. Rev.**, v. 11, p. 15, 1957.

BARBOSA, E. M., et al. Vitamin D3 modulation of plasminogen activator inhibitor type- 1 in human breast carcinomas under organ culture. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 444, p. 175–182, 2009.

BARTEK, J.; LUKAS, J.; BARTKOVA, J. Perspective: defects in cell cycle control and cancer. **J Pathol**, v. 187, n. 1, p. 95–99, 1999.

BATISTA, A. M.; GUERRA, M. M. P. Novas técnicas para avaliação da qualidade do sêmen caprino. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 34, n. 3, p. 125–132, 2010.

BATISTA, A. P.; SILVA, T. G.; TEIXEIRA, A. A. C. Ultrastructural aspects of melatonina cytotoxicity on Caco-2 cells in vitro. **Micron**. v. 59, p. 17–23, 2014.

BATISTATOU, A. et al. Bcl-2 affects survival but not neuronal differentiation of PC12 cells. **J Neurosci**, v. 13, n. 10, p. 4422–4428, 1993.

BERGANTINI, A. P. F. et al. Leucemia mielóide crônica e o sistema Fas-FasL. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v. 27, n. 2, p. 120–125, 2005.

BERRIDGE, M.V.; HERTS, P.M.; TAN, A.S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. **Biotechnology Annual Review**. v. 11, p. 127–152, 2005.

BHOSALE, S. K., et al. Mesoionic sydnone derivatives: an overview. **Journal of chemical and pharmaceutical research**, v. 4, n. 2, p. 1185–1199, 2012.

BHOSALE, S. K. et al. Design, synthesis and cytotoxic activity evaluation of mesoionic 4-methoxyphenyl sydnone analogs against 60 human tumors cell lines. **Scholars Research Lybrary – Der Pharma Chemica**, v. 7, n. 5, p. 306–318, 2015.

BONASSA, E. M. A.; SANTANA, T. R. *Enfermagem em Terapêutica Oncológica*. Atheneu. 3ª Ed., p. 3–15, 2005.

BRANNON-PEPPAS, L.; BLANCHETTE, J. O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. **Adv. Drug Deliv. Ver.**, v. 56, p. 1649–1659, 2004.

BRASILEIRO-FILHO, G. B. *Patologia*. **Guanabara Koogan**, 7ª Ed., Rio de Janeiro, p. 43–236, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de atenção à saúde. Instituto Nacional do Câncer. **ABC do câncer: Abordagens básicas para o controle do câncer**. Rio de Janeiro, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativas do câncer para 2014**. Rio de Janeiro, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **O que é câncer?** Rio de Janeiro, 2016.

BRATTON, S. B.; SALVESEN, G. S. Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome. **J Cell Sci**, v. 123, p. 3209–3214, 2010.

BRUIN, E. C.; MEDEMA, J. P. Apoptosis and non-apoptotic deaths in câncer development and treatment response. **Cancer Treat. Ver.** v. 34, p. 737–749, 2008.

BUSCH, M. **Ber dt. Chem. Gues.** v. 28, p. 2635, 1895.

BUSCH, M. **J. Prakt. Chem.** v. 60, p. 225, 1899.

BUSCH, M.; SCHNEIDER, S. **J. Prakt. Chem.** v. 67, p. 246, 1903.

BUSCH, M. **Ber dt. Chem. Gues.** v. 38, p. 4049, 1905.

BUSCH, M. **J. Prakt. Chem.** v.74, p. 533, 1906.

CADENA, S. M. S. C., et al. Effect of MI-D, a new mesoionic compound, on energy-linked functions of rat liver mitochondria. **FEBS Lett.**, v. 440, p. 46–50, 1998.

CADENA, S. M. S. C., et al. Interference of MI-D, a new mesoionic compound, on artificial and native membranes. **Cell Biochem Funct.**, v. 20, p. 31–37, 2002.

CASTEDO, M. et al. Cell death by mitotic catástrofe: a molecular definition. **Oncogene**, v. 23, p. 2825–2837, 2004.

CHABNER, B.A., et al. Agentes Antineoplásicos. In: GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. **As Bases farmacológicas de terapêutica**. 11 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006.

COLOMBO, P., et al. Toxicological testing of cytotoxic drugs (Review). **Int J Oncol.**, v. 19, p. 1021–1028, 2001.

CORTES, S. et al. Effect of structural modification of the hydantoin ring on anticonvulsant activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 28, n. 5, p. 601–606, 1985.

COTTER, T. G. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. **Nat Ver Cancer**, v. 9, p. 501–507, 2009.

CROCE, C. M. Oncogenes and cancer. **N Engl J Med**, v. 358, p. 502–11, 2008.

DANIAL, N. N.; KORSMEYER, S. J. Cell death: critical control points. **Cell**. v. 116, p. 205–219, 2004.

DARZYNKIEWCZ, Z.; HALICKA, H. D.; ZHAO, H. Analysis of cellular DNA content by flow and scanning cytometry. **NIH Public Access**, v. 676, p. 137–147, 2010.

DESHPANDE, S. R.; PAI, K. V. Synthesis and biological activities of certain mesoionic sydnone compounds containing chalcone moiety. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, v. 001, n. 003, p. 147–152, 2010.

DUNKLEY, C. S.; THOMAS, C. J. Synthesis and biological evaluation of a novel phenyl substituted sydnone series as potential antitumor agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 13, n. 17, p. 2899–2901, 2003.

DUBEY, et al. Study of mesoionic compounds: synthesis and pharmacological evaluation of several 2-[(94-Substituted-1-sulphonyl) Sydnon-2-yl]-1,3,4-thiadiazino(6,5-b)indoles as antimicrobial, insecticidal and antihelmintic agents. **Oriental Journal of Chemistry**, v. 30, n. 1, p. 271–278, 2014.

EARL, J. C.; MACKNEY, A. W. The action of acetic anhydride on N-nitrosophenylglycine and some of its derivatives. **J. Chem. Soc.**, London, p. 899–900, 1935.

EISENBERG-LERNER, A. et al. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. **Cell Death Differ.**, v. 16, p. 966–975, 2009.

ESTANQUEIRO, M.; AMARAL, M. H. Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: the state of the art, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2015.

EVAN, G. I.; VOUSDEN, K. H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. **Nature**, v. 411, p. 342–348, 2001.

FADEEL, B.; ORRENIUS. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. **J Intern Med.**, v. 6, p. 479–517, 2005.

FARIA, M. H. G.; RABENHORST, S. H. B. Impacto do oncogene C-MYC no câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 2, p. 165–71, 2005.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International journal of cancer**, Genève, v. 136, n. 5, p. 359–386, 2015.

FERNANDES, A. G.; MAFRA, D. Zinco e câncer: uma revisão. **Ver. Saúde. Com.**, v. 1, n. 2, p. 144–156, 2005.

FISCHER, E; BESTHORN, E. **Annalen**, v. 212, p. 316, 1882.

FISCHER, P. M.; GLOVER, D. M.; LANE, D. P. Targeting the cell cycle. **Drug Disc. Today**, v. 1, n. 4, p. 417–423, 2004.

FOSTER, I. Cancer: a cell cycle defect. **Radiography**. v. 14, n. 2, p. 144–149, 2008.

FRANCO, R. C.; SOUHAMI, L. Radioterapia e hormonioterapia no câncer de próstata de risco intermediário: uma revisão crítica. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 61, n. 2, p. 155–163, 2015.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells**. A manual of basic technique and specialized applications. 6 ed. Wiley-blackwell, 2010.

GALLUZZI, L. et al. Chapter one – Programmed Necrosis: From Molecules to Health and Disease. **International Review of Cell and Molecular Biology**. v. 289, p. 1–35, 2011.

GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell and Differentiation**. v. 10, p. 107–120, 2012.

GOZZI, G. J. et al. Selective Cytotoxicity of 1,3,4-Thiadiazolium Mesoionic derivatives on Hepatocarcinoma Cells (HepG2). **Plos one**, v. 10, n. 6, 2015.

GRANDER, D. et al. Autophagy as the main means of cytotoxicity by glucocorticoids in hematological malignancies. **Autophagy**. v. 5, p. 1198–1200, 2005.

GRYNBERG, N.; SANTOS, A.C.; ECHEVARRIA, A. Synthesis and *in vivo* antitumor activity of new heterocyclic derivatives of the 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide class. **Anti-Cancer Drugs**, Oxford, v. 8, p. 88–91, 1997.

GRYNBERG, N. et al. Some new aryl-sydnone: effects on murine tumours. **Anticancer Research**, Atenas, v. 12, n. 3, p. 1025–1028, 1992.

GUIMARÃES, C. A.; LINDEN, R. Programmed cell deaths: Apoptosis and alternative death styles. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, p. 1638–1650, 2004.

GUMP, J. M.; THORBURN, A. Autophagy and apoptosis: what is the connection? **Trends Cell Biol.**, v. 21, p. 387–392, 2011.

HAJDU, S. I. A note from history: landmarks in history of cancer, part 1. **Cancer**, v. 117, n. 5, p. 1097–1102, 2011.

HAMERSCHLAK, N. et al. Retrospective study of stem cell transplantation for acute myeloid leukemia (AML): the Brazilian experience. **Rev. bras. hematol. hemoter.**, v. 28, p. 11–18, 2006.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, p. 57–70. 2000.

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

HELAL, A.; KIM H. S. Thiazole-based chemosensor: synthesis and ratiometric fluorescence sensing of zinc. **Tetrahedron Letters**, v. 50, p. 5510–5515, 2009.

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**. v. 407, p. 770–776, 2000.

HERR, H. W.; MORALES, A. History of bacillus Calmette-Guerin and bladder cancer: na immunotherapy success story. **Journal of Urology**, v. 179, p. 53–56, 2008.

HOUGHTON, P. et al. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**, v. 42, p. 377–387, 2007.

JOHNSON, L. V.; WALSH, M. L.; CHEN, L. B. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. **PNAS**. v. 77, p. 990–994, 1980.

KEPP, O. et al. Cell death assays for drug discovery. **Nat Rev Drug Discov**. v. 10, p. 221–237, 2011.

KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, v. 26, p. 239–257, 1972.

KLIONSKY, D. J. Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve. **Autophagy**, v. 4, n. 6, p. 740–743, 2008.

KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell Death Differ**, v. 16, p. 3–11, 2009.

KUAN, C. Y.; KUIDA, K. Cell death in mammalian devolpment. In: Yin, X. M.; DONG, Z., editors. **Essentials of Apoptosis**, Humama Press Inc., New Jersey, p. 163–175, 2003.

KUMAR, V. et al. **Pathology Basis of Disease**. China: WB Saunders, 1552p., 2004.

KUMAR, R.; KAUR, M.; SILAKARI, O. Physiological Modulation Approaches to Improve Cancer Chemotherapy: A Review. **Anticancer Agents Med. Chem.**, v. 14, n. 5, p. 713–49, 2014.

KUROSAKA, K.; TAKAHASHI, M., WATANABE, N.; AND KOBAYASHI, Y. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. **J. Immunol.**, v. 171, p. 4672–4679, 2003.

KUSUZAKI, K.; MURATA, H.; MATSUBARA, T.; SATONAKA, H.; WAKABAYASHI, T.; MATSUMINE, A.; UCHIDA, A. Review. Acridine Orange could be na innovative anticancer agente under photon energy. **In vivo**, v. 21, p. 205–214, 2007.

LAANE, E. et al. Cell death induced by dexamethasone in lymphoid leukemia is mediated through initiation of autophagy. **Cell Death Differ**. v. 16, p. 1018–1029, 2009.

LAITINEN, R. et al. Emerging trends in the stabilization of amorphous drugs. International journal of pharmaceutics, Elsevier B.V., v. 453, n. 1, p. 65–79, 2013.

LIRA, B. F. et al. Synthesis and Characterization of some New Mesoionic 1,3-Thiazolium-5-thiolates via Cyclodehydration and in situ 1,3- Dipolar Cycloaddition/Cycloreversion, *Molecules*, v. 7, p. 791–800, 2002.

LIU, J. J. et al. Targeting apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutics. *Cancer Lett.*, v. 300, p. 105–114, 2011.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402–208, 2001.

LOPEZ, J.; TAIT, S. W. G. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *Br. J. Cancer*, p. 1–6, 2015.

LOURO, I. D. et al. **Genética Molecular do Câncer**. MSG Produção Editorial, 1ª ed., São Paulo, 2002.

MADDIKA, S. et al. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for câncer therapy. *Drug resistance updates*, v. 10, p. 13–29, 2007.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.*, v. 146, p. 3–15, 1995.

MALUMBRES, M.; PEVARELLO, P.; BARBACID, M.; BISCHOFF, J. R. CDK inhibitors in cancer therapy: what is next? *TRENDS in Pharmacological Sciences*, v. 29, p. 16–21, 2007.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and câncer: a changing paradigma. *Nat Rev Cancer*. v. 9, p. 153–166, 2009.

MARTELLI, A. M.; ZWEYER, M.; OCHIS, R. L.; TAZZARI, P. L.; TABELLINI, G.; NARDUCCI, P.; BORTUL, R. Nuclear apoptotic changes: an Overview. *J Cell Biochem.*, v. 82; n. 4, p. 634–646, 2001.

MEERLOO, J. V. KASPERS, G. J. L.; CLOOS, J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. *Methods Mol. Biol.*, v. 731, 2011.

MISHRA T.; KHULLAR, M.; BHATIA, A. Anticancer potential of aqueous ethanol seed extract of *Ziziphus mauritiana* against cancer cell lines and Ehrlich ascites carcinoma. *Evid. Based Complement Alternat. Med.*, 2011.

MITTLER, R.; SHULAEV, V. Apoptosis in plants, yeast, and bactéria. In: YIN, X. M.; DONG, Z., editors. **Essentials of Apoptosis**, Humana Press Inc., New Jersey, p. 135–144, 2003.

MURPHY, B. M.; MARTIM, S. J. Caspases. In: YIN, X. M.; DONG, Z., editors. **Essentials of Apoptosis**, Humana Press Inc., New Jersey, p. 3–12, 2003.

MURROW, L.; DEBNATH, J. Autophagy as a stress-response and quality-control mechanism: implications for cell injury and human disease. **Annual review of pathology**, v. 8, p.105–37, 2013.

NAIKI, T., et al. Neoadjuvant hormonal therapy is a feasible option in laparoscopic radical prostatectomy. **BMC Urology**, v. 12, p. 36, 2012.

NCI. NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Developmental Therapeutics Program**. USA, 2016. Disponível em: <https://dtp.cancer.gov/databases_tools/docs/compare/compare_methodology.htm#screen> Acesso em:16 nov. 2016.

NIKOLETOPOULOU, et al., Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1822, p. 3448–3459, 2013.

OLIVEIRA, et al. Drug resistance modulation in *Staphylococcus aureus*, a new biological activity for mesoionic hydrochloride compounds. **Molecules**, v. 16, p. 2023–2031, 2011.

OLLIS, W. D.; RAMSDEN, C. A. Meso-ionic compounds. **Adv. Heterocycl. Chem.**, San Diego, v. 19, n. 1, p. 1–121, 1976.

OUYANG, L. et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Prolif.**, v. 45, p. 487–498, 2012.

OZER, E. et al. Expression of Bcl-2, Bax and p53 proteins in pituitary adenomas: an immunohistochemical study. **Tumori**, v. 89, n. 1, p. 54–59, 2003.

PAIVA, et al. Mesoionic compounds with antifungal activity against *Fusarium verticillioides*. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 11, p. 1–8, 2015.

PEIXOTO, et al. Synthesis and antifungal activity against *Candida* Strains of mesoionic system derived from 1,3-thyazolium-5-thiolate. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 00, n. 00, p. 1–7, 2016.

PERELMAN, A. et al. JC-1: alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. **Cell Death Dis.** v. 22, n.3, 2012.

PERRY, S. W.; NORMAN, J. P.; BARBIERI, J. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. **Biotechniques**. v.50, n.2, p. 98–115, 2011.

PERES, C. M.; CURIS, R. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

PETIT, P. X. Flow cytometric analysis of rhodamine 123 fluorescence during modulation of the membrane potential in plant mitochondria. **Plant Physiology**, v. 98, p. 279–286, 1992.

POZHARSKÜ, A. F.; SOLDATENKOV, A. T.; KATRITSKY, A. R. In: **Heterocycles in life and society**. Chichester: John Wiley & Sons, 1997, 301p.

RIPAMONTI, C., et al. A randomized, controlled clinical trial to evaluate the effects of zinc sulfate on cancer patients with taste alterations caused by head and neck irradiation. **Cancer**, v. 82, p. 1938–1945, 1998.

RIEDL, S.J., SALVESEN, G.S. The apoptosome: signalling platform of cell death. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v.8, p. 405–413, 2007.

RISS, T. L. et al. **Cell Viability Assays**. In: SITTAMPALAM, G. S. et al. (org) Assay Guidance Manual. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2013.

ROEDER, I. et al. New experimental and theoretical investigations of hematopoietic stem cells and chronic myeloid leukemia. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, 2009.

ROMÃO, S., et al. Metabolism of the mesoionic compound (MI-D) by mouse liver microsomes, detection of its metabolite in vivo, and acute toxicity in mice. **J. Biochem. Mol. Toxicol.**, v. 23, n. 6, p. 394–405, 2009.

RONOT, X.; BENEL, L.; ADOLPHE, M.; MOUNOLOU, J. C. Mitochondrial analysis in living cells: the use of rhodamine 123 and flow cytometry. **Biol Cell.** v. 5, p. 1–8, 1986.

SALGALLER, M. L.; LODGER, P. A. Use of cellular and cytokine adjuvants in the immunotherapy of cancer. **J Surg Oncol. N.**, v. 68, p. 122–138, 1998.

SAMBAZIOTIS, D.; KAPRANOS, N.; KONTOGEORGOS, G. Correlation of bcl-2 and bax with apoptosis in human pituitary adenomas. **Pituitary**, v. 6, n. 3, p. 127–133, 2003.

SANTINI, D. et al. Repeated intermittent low-dose therapy with zoledronic acid induces an early, sustained, and long-lasting decrease of peripheral vascular endothelial growth factor levels in cancer patients. **Clin. Cancer Res.**, v. 13, p. 4482–4486, 2007.

SENF-FRIBEIRO, et al. Effect of a new 1,3,4-thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on B16-F10 murine melanoma. **Melanoma Research**, v. 13, p. 465–471, 2003.

SENF-FRIBEIRO, et al. Cytotoxic effect of a new 1,3,4-thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on cell lines of human melanoma. **British Journal of Cancer**, v. 91, p. 297–304, 2004.

SHEN, H. M.; CODOGNO, P. Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species? **Autophagy**, v. 7, p. 457–465, 2011.

SHERR, C. J.; MCCORMICK, F. The RB p53 pathways in cancer. **Cancer Cell**, v. 2, p. 103–112, 2002.

- SHIH, M.H., et al. Microwave-assisted synthesis of sydnonyl-substituted imidazoles. **Tetrahedron**. v. 63, p. 2990–2991, 2007.
- SHIMIZU, S. et al. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. **Nat Cell Biol.** v. 6, p. 1221–1228, 2004.
- SOUZA, H. D. S. Estudos químicos dos compostos heterocíclicos meosiônico e sua potencialidade antifúngica. **Dissertação de mestrado, UFPB**, 2012.
- STEWART, B. W.; WILD, C. P. (Ed.). World Cancer Report: 2014. Lyon: IARC, 2014.
- STRASSER, A. et al. Apoptosis signaling. **Annu. Ver. Biochem.** v. 69, p. 217–2245, 2000.
- SUSIN, S. A., et al. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. **Biochim Biophys Acta**, v. 1366, p. 151–165, 1998.
- TAIT, S.W., GREEN, D. R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 11, p. 621–632, 2010.
- TINARI, A. et al. **Analyzing morphological and ultrastructural features in cell death**. In: Methods in Enzymology. Elsevier Inc., 442p., 2008.
- TRUMP, B. F. et al. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. **Toxicol. Pathol.**, v. 25, p. 82–88, 1997.
- TSUDA, H. et al. Programmed cell death and its possible relationship with periodontal disease. **J. Oral Science**, v. 54, n. 2, p. 137–149, 2012.
- TUSCHL, H.; SCHWAB, C. Flow cytometric methods used as screening tests for basal toxicity of chemicals. **Toxicology in vitro**. v. 18, p. 483–491, 2004.
- UTKU, N. New approaches to treat cancer-what they can and cannot do. **Biotechnology healthcare**, v. 8, n. 4, p. 25, 2011.
- VALDOR, R.; MACIAN, F. Autophagy and the regulation of the immune response. **Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 66, n. 6, p. 475–483, 2012.
- VAN LIMBERGEN, J. et al. Autophagy: from basic science to clinical application. **Mucosal immunology**, v. 2, n. 4, p. 315–30, 2009.
- VERMES, I. et al. Flow cytometry of apoptotic cell death. **Journal of Immunological Methods**, v. 243, p. 167–190, 2000.
- VERMEULEN, K.; BERNEMAN, Z. N.; VAN BOCKSTAELE, D. R. Cell cycle and apoptosis. **Cell Prolif.**, n. 36, p. 165–175, 2003.

VIDA, J. A. et al. Anticonvulsants. 5. Derivates of 5-ethyl-5-phenylhydantoin and 5,5-diphenylhydantoin. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 18, n. 4, p. 383–385, 1975.

YILMAZ, S. D. et al. Effects of Caspase 9 gene polymorphism in patients with prostate cancer. **In Vivo**, v. 31, p. 205–208.

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

WANG, L. et al. Berberine induces caspase-independent cell death in colon tumor cells through activation of apoptosis-inducing factor. **PLoS One**, v. 7, n. 5, 2012.

WERBEL, L. M. et al. Antischistosomal effects of 5-(2, 4, 5-trichlorophenyl) hydantoin and related compounds. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 20, n. 12, p. 1569–1572, 1977.

WHITFIELD, M. L. GEORGE, L. K. GRANT, G. D. PEROU, C. M. Common markers of proliferation. **Nat Ver Cancer**, v. 6, p. 99–106, 2006.

World Health Organization (WHO). **Fact Sheet number 310: The Top Ten Causes of Death**, 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index2.html>>; Acesso em 03 out. 2016.

WU, Y. C.; XUE, D. Programmed cell death in *C. elegans*. In: YIN, X. M., DONG, Z., editors. **Essential of Apoptosis**, Humana Press Inc., New Jersey, p. 135–144, 2003.

ZHAO, Y. et al. Cytosolic FoxO1 is essential for the induction of autophagy and tumour suppressor activity. **Nat Cell Biol.**, v. 12, p. 665–675, 2010.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH. Morphological features as cell death. **News physiology sciences**. v. 19, p. 124–128, 2004.

ANEXOS

ANEXO A – PEDIDO DE PATENTE DEPOSITADO NO INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL (INPI)



08/11/2016

870160065748

15:20



00.000.2.2.16.0886017.0

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2016 026112 0

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): COMPOSTO FARMACÊUTICO DERIVADO DO MESOIÔNICO PARA TRATAMENTO DO CÂNCER

Resumo: "COMPOSTO FARMACÊUTICO DERIVADO DO MESOIÔNICO PARA TRATAMENTO DO CÂNCER". A presente invenção se refere a um composto derivado do mesoiônico sintético, que pertence ao grupo 1,3-tiazólio-5-tiolato, caracterizado por ser composto heterocíclico não benzênico com caráter betaínico e planar, tamanho relativamente pequeno e variação da densidade eletrônica de carga positiva no anel e densidade de carga negativa que se estende à cadeia lateral exocíclica, atribuindo-lhe propriedades anfífilas e coordenado ao zinco. Apesar de serem carregados internamente e possuírem alto momento dipolar, o composto mesoiônico apresenta uma rede de carga de elétrons neutra, o que lhes confere a capacidade de atravessar membranas celulares e interagir com moléculas biológicas com afinidades distintas. Através dos ensaios in vitro realizados nesta invenção, foi possível observar que os compostos MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn apresentaram ação citotóxica e apoptótica em linhagens celulares de vários tipos de câncer, a exemplo do adenocarcinoma mamário humano (MCF7), carcinoma de laringe humano (HEp-2), carcinoma de cólon retal humano (HT-29) e leucemia promielocítica aguda humana (HL-60). A coordenação ao zinco potencializou o efeito biológico. Sendo assim, a aplicabilidade potencial dos compostos mesoiônicos MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn contribuirá para o uso destes como agentes coadjuvantes para o tratamento de doenças oncológicas em humanos e animais.

Figura a publicar: 2