



UNIVERSIDADE FEDERAL
DE SANTA CATARINA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DA ATIVIDADE PRÓ-
INFLAMATÓRIA E ANTITUMORAL DE DERIVADOS
MALEIMÍDICOS**

VÂNIA FLORIANI NOLDIN

**Florianópolis – SC
Fevereiro de 2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

Vânia Floriani Noldin

**ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DA ATIVIDADE PRÓ-
INFLAMATÓRIA E ANTITUMORAL DE DERIVADOS
MALEIMÍDICOS**

Tese submetida ao programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, para a obtenção do grau de Doutor em Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Tânia Beatriz Creczynski-Pasa

Florianópolis/SC
2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

N791e Noldin, Vânia Floriani

Estudos in vitro e in vivo da atividade pró-inflamatória e antitumoral de derivados maleimídicos [tese] / Vânia Floriani Noldin ; orientadora, Tânia Beatriz Creczynski Pasa. - Florianópolis, SC, 2011.

178 p.: il., grafs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Maleimidas. 3. Peroxidase. 4. Melanoma. 5. Leucemia. 6. Estresse Oxidativo. I. Pasa, Tania Beatriz Creczynski. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

CDU 615.12

VÂNIA FLORIANI NOLDIN

**ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DA ATIVIDADE PRÓ-
INFLAMATÓRIA E ANTITUMORAL DE DERIVADOS
MALEIMÍDICOS**

Esta tese foi submetida ao processo de avaliação pela Banca
Examinadora para a obtenção do Título de:

Doutor em Farmácia

E aprovada na sua versão final em 02 de fevereiro de 2011, atendendo
às normas da legislação vigente da Universidade Federal de Santa
Catarina, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Área de
Concentração de Fármaco-medicamentos.

Dr. Eloir Paulo Schenkel
Coordenador do Programa

BANCA EXAMINADORA:

Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Doutora em Química Biológica
Universidade Federal de Santa Catarina
Presidente

Rivaldo Niero
Doutor em Química
Universidade do Vale do Itajaí
Membro

Lilian S Bernardes
Doutora em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Catarina
Membro

Danilo Wilhelm Filho
Doutor em Fisiologia
Universidade Federal de Santa Catarina
Membro

Maique W. Biavatti
Doutora em Química
Universidade Federal de Santa Catarina
Membro

Ionara R Siqueira
Doutora em Fisiologia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Membro

Florianópolis
Fevereiro/ 2011

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, à você mestre, professora Tânia, e as colegas de laboratório, que instigaram o meu aprendizado e habilidades através de questionamentos e ensinamentos.

À minha família, pelo amor e compreensão em todos estes anos de estudo e trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dar o dom da vida e a graça de ter em meu conviver pessoas tão especiais, com fortes dons no amor, na esperança, na caridade, na inteligência, na amizade, e na paciência ...

A minha mãe, cuja fé, amor e dedicação sempre foram fontes de perseverança para continuar e transpor qualquer dificuldade.

Ao meu maior incentivador de minha formação, Angelo Tadeu, meu agradecimento especial e todo o meu carinho, admiração e amor.

A todos os familiares, em especial meu irmão Dionei e minha cunhada Vanessa, e meus sogros Ernesto e Rosa, bem como, demais cunhados e cunhadas, sobrinhos e sobrinhas, meu muito obrigada pelas orações, pela compreensão, pelo carinho e amor recebido.

Aos meus amigos de Camboriú, que são muitos e não ousou citar, senão padre Alcides, que por vezes me abrigou em Floripa, meu muito obrigado por tudo, inclusive pela compreensão de minha ausência em tantos eventos que deixei de compartilhar com vocês.

Aos amigos do laboratório, em especial a professora Tânia, e colegas de bancada: Claudriana, Evelyn, Clarissa, Andréia Navarrini, Andrea, Maurícia, Francisco, Bruno, Adny, Laura e demais colegas, pelo convívio e aprendizado.

Aos professores Dra. Fátima C. Buzzi e Dr. Valdir Cechinel Filho, pela amizade e colaboração na síntese das maleimidias. Muito obrigado.

Ao professor Dr. Celso Pilati, pela gentil colaboração na análise histológica. Muito obrigado.

“MUITO OBRIGADO!!!

“Meta a gente busca
Caminho a gente acha
Desafio a gente enfrenta
Desejo a gente mata
Vida a gente inventa
E Sonho ...
A gente Realiza”

(Alexandre Brito)

RESUMO

Derivados maleimídicos, sintetizados a partir da filantimida, apresentam diversas atividades biológicas, sendo as mais relatadas: antifúngicas, antibacterianas e antitumorais. A inflamação é caracterizada por eventos celulares e bioquímicos. A mieloperoxidase (MPO) é uma importante enzima pró-oxidante e microbicida, liberada e ativada durante o processo de fagocitose dos neutrófilos, cuja atividade é essencial para uma efetiva resposta imune inata. O câncer é uma das doenças mais temidas pela sociedade, por causa do estigma de dor e morte. Dentre os diversos tipos de tumores, o melanoma é uma neoplasia maligna originada a partir dos melanócitos, e é a principal causa de morte por doença de pele, pois tem alta capacidade metastática. A leucemia é uma doença mesenquimal caracterizada pela proliferação ou maturação descontrolada de células mieloides e linfoides da medula óssea. A leucemia apresenta alta taxa de cura em crianças, porém, em adultos a taxa de remissão e cura é baixa, devido à resistência das células tumorais aos tratamentos. Este trabalho avaliou a ação de derivados maleimídicos sobre a atividade da enzima mieloperoxidase, além da atividade antitumoral destas substâncias em células de melanoma murino B16F10 e em células de leucemia murino L1210. A atividade da MPO foi monitorada através de métodos espectrofotométricos, através da oxidação da orto-dianisidina. A atividade citotóxica *in vitro* foi avaliada pela viabilidade celular e os mecanismos de morte avaliados por métodos colorimétricos e fluorimétricos. A atividade antimelanoma *in vivo* foi avaliada macroscopicamente e microscopicamente. Dos nove derivados maleimídicos avaliados, apenas dois, alteraram a atividade da MPO. As substâncias *N*-fenil-maleimida (M2) e 4-metil-*N*-fenil-maleimida (M5) induziram a atividade da MPO e a migração celular, indicando possível atividade pró-inflamatória. Quanto à atividade citotóxica *in vitro*, tanto para células melanoma B16F10 quanto para células leucêmicas L1210, os derivados maleimídicos cujo anel imídico apresentava-se ciclizado e sem substituintes, a atividade antitumoral foi significativa em concentrações de 10 µM. O provável mecanismo relacionado a ação antileucêmica é o estresse oxidativo, e o dano mitocondrial induzido pelas maleimidias. *In vivo*, observou-se que M2, M5 e 4-metoxi-*N*-fenil-maleimida (M7), reduziram o tamanho do tumor (57%, 67% e 42% respectivamente), e o número de animais com tumor (22%, 63% e 58% respectivamente). Os tratamentos inibiram a metástase

pulmonar, e também apresentarem baixa toxicidade, conforme parâmetros histológicos, hematológicos e bioquímicos avaliados. *N*-fenil-etil-maleimida (M9) não apresentou atividade antitumoral no modelo avaliado, mas alterou parâmetros bioquímicos, indicando possível ação hepatotóxica. Conclui-se que os derivados maleimídicos apresentam atividade antitumoral, e este efeito está relacionado com a estrutura química, sendo os aspectos mais relevantes a proximidade entre o anel imídico e o anel aromático; a integridade do anel imídico e a ausência de substituintes nestes. O significativo efeito antitumoral *in vivo* observado para M2 e M5, pode também estar relacionado com a ação pró-inflamatória destas substâncias, visto que, vários estudos apontam a ativação da resposta imune inata como mecanismo para aumentar a resposta antimelanoma de quimioterápicos.

Palavras-chave: maleimidas, mieloperoxidase, melanoma, leucemia, atividade biológica, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Maleimide derivatives synthesized from the prototype phyllanthimide show several biological activities, the most reported: antifungal, antibacterial and antitumor. The inflammation process is characterized by cellular and biochemical events. Myeloperoxidase (MPO) is an important pro-oxidant and microbicidal enzyme, released and activated during phagocytosis of neutrophils, whose activity is essential for an effective innate immune response. Cancer is a disease most feared by society, because of the stigma of pain and death. Among the various types of tumors, melanoma is a malignant neoplasm from melanocytes, and is the leading cause of death from skin disease, it has high metastatic capacity. Leukemia is a mesenchymal disease characterized by uncontrolled proliferation and maturation or an increased lifespan of myeloid or lymphoid progenitor cells in bone marrow. Leukemia has a high cure rate for children, but for adults the rate of remission and cure is low due to the resistance of tumor cells to treatment. This study evaluated the action of maleimide derivatives on the activity of MPO, and antitumor activity of these substances in B16F10 murine melanoma cells and murine L1210 lymphoblastic leukemia cells. The MPO activity was monitored by ortho-dianisidine oxidation methods. The cytotoxic activity *in vitro* was assessed by MTT, a colorimetric assay, and mechanisms of death were evaluated by colorimetric and fluorometric methods. Antimelanoma activity *in vivo* was assessed macroscopically and microscopically. Nine maleimide derivatives were tested and only two changed the activity of MPO. The substances *N*-phenyl-maleimide (M2) and 4-methyl-*N*-phenyl-maleimide (M5) induced MPO activity and cell migration, indicating a possible pro-inflammatory activity. The cytotoxic activity *in vitro*, both cell B16F10 melanoma and L1210 leukemia cells to the maleimide derived imide ring whose patient was cyclized without substituents, the antitumor activity was significant at concentrations of 10 μ M. Regarding antileukemia activity, the probable mechanism involved is oxidative stress and mitochondrial damage induced by maleimides. *In vivo*, showed that M2, M5 and 4-methoxy-*N*-phenyl-maleimide (M7), reduced the size of tumor (57%, 67% and 42% respectively), and number of animals with tumor (22%, 63% and 58% respectively). The treatments inhibited lungs metastasis and besides showed low toxicity according histological, hematological and biochemical parameters evaluated. *N*-phenyl-ethyl-maleimide (M9) did not show antitumor activity in model evaluated, but altered biochemical

parameters, indicating a possible hepatotoxic action. We conclude that the maleimide derivatives showed antitumor activity, and this effect is related to chemical structure, being the most relevant aspects promiximity between the aromatic ring and imide ring; the integrity of the imide ring and absence of these substituents. The significant antitumor effect *in vivo* observed for M2 and M5 can also be related to the proinflammatory action of these substances, since several studies indicate that the activation of the innate immune response as a mechanism responsible for the increase response of antimelanoma by chemotherapy.

Keywords: maleimides, mieloperoxidase, melanoma, leukemia, biological activity, oxidative stress.

LISTA DE ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
AIF	Fator indutor de apoptose
ALT	Alanina amino transferase
APAF-1	Fator ativador de proteases 1
AST	Aspartato amino transferase
ATP	Adenosina trifosfato
ATCC	American Type Culture Collection
CDB	Convenção da Diversidade Biológica
DEMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium – meio de cultura Eagle's modificado
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DTNB	5,5'-Ditio-bis(2-nitrobenzoico ácido)
FADD	Proteína domínio de morte associada ao Fas
FAS	Receptor de morte celular
FCCP	Carbonilcianeto- ρ -trifluorometoxifenilhidrazina
GSH	Glutathiona reduzida
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietyl)1-piperazinil]-etanosulfônico
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HClO	Ácido hipocloroso
HRP	Peroxidase de raiz forte
IAPs	Proteínas inibidoras de apoptose
CI_{50}	Concentração inibitória 50%
IL-2	Interleucina 2
JC-1	5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolocarbocyanine iodide
LLA	Leucemia linfoide aguda
M1	Ácido N-fenilmaleâmico
M2 (NFM)	N-fenil-maleimida
M3	Ácido 4-nitro-N-fenilmaleâmico
M4	4-nitro-N-fenil-maleimida
M5 (Me-NFM)	4-metil-N-fenil-maleimida
M6	4-etil-N-fenil-maleimida
M7	4-metoxi-N-fenil-maleimida
M9	N-fenil-etil-maleimida
M10	3,4dicloro-N-fenil-propil-maleimida
MHC	Complexo de histocompatibilidade

MPO	Mieloperoxidase
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NK	Células Natural Killer
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
OMS	Organização Mundial da Saúde
SMAC/DIABLO	Segundo ativador mitocôndrial de caspase / Proteína de ligação-IAP direta com baixo peso
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao acito tiobarbitúrico
Th ₁	Linfócito T auxiliares (helper) 1
TLR	Receptores de transmembrana da família toll-like
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
UVA	Radiação ultravioleta A
UVB	Radiação ultravioleta B
VEGF	Fator de crescimento vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Princípios ativos isolados de plantas medicinais e utilizados na terapêutica.....	31
Figura 2: Imagem de um ramo da planta <i>Phyllanthus sellowianus</i> e estrutura química do alcaloide filantimida isolado de suas partes aéreas.....	33
Figura 3: Esquema da síntese de derivados maleimídicos	34
Figura 4: Estrutura química da maleimida 3-metil-maleimida- <i>N</i> - β -D-glucopiranosídeo.....	34
Figura 5: Representação da fagocitose mediada por neutrófilo e ativação da mieloperoxidase.....	39
Figura 6: Estimativa para 2011 dos tipos de cânceres mais incidentes na população brasileira, exceto os tumores de pele não melanoma.	42
Figura 7: Estrutura química dos derivados maleimídicos.....	61
Figura 8: Avaliação da atividade da mieloperoxidase <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> e atividade “scavenger” dos derivados maleimídicos.....	63
Figura 9: Avaliação da atividade antitumoral e toxicidade dos derivados maleimídicos em camundongos com melanoma subcutâneo (células B16F10).....	84
Figura 10: Fluxograma da avaliação dos mecanismos de citotoxicidade dos derivados maleimídicos em linhagem de células leucêmicas murinas L1210.	110

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
1.1 PRODUTOS NATURAIS E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS	29
1.2 ASPECTOS GERAIS DA INFLAMAÇÃO	35
1.2.1 Eventos celulares envolvidos na inflamação	37
1.3 CANCER	41
1.3.1 Morte celular e alvos terapêuticos	44
1.3.2 Espécies reativas e defesas antioxidantes	47
1.3.3 Melanoma	53
1.3.4 Leucemia	57
2 METODOLOGIA / RESULTADOS	61
2.1 ARTIGO ACEITO - PHARMACOLOGICAL REPORTS	62
2.2 ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA CÂNCER CHEMOTHERAPY & PHARMACOLOGY	83
2.3 ARTIGO A SER SUBMETIDO A REVISTA EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES	109
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	137
3.1 N-PHENYL-MALEIMIDE DERIVATIVES AS MIMETIC AGENTS OF THE PRO-INFLAMMATORY PROCESS: MYELOPEROXIDASE ACTIVATION	137
3.2 ANTITUMORAL ACTIVITY AND TOXICITY OF MALEIMIDE DERIVATIVES IN A PRE-CLINICAL MELANOMA MOUSE MODEL	142
3.3 INDUCTION OF APOPTOSIS BY CYCLIC MALEIMIDE DERIVATIVES IN A LEUKEMIA CELL LINE: INVOLVEMENT OF OXIDATIVE STRESS AND MITOCHONDRIAL DAMAGE	150
4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	155
REFERÊNCIAS	157

1 INTRODUÇÃO

1.1 PRODUTOS NATURAIS E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS

Os primeiros relatos de cuidados com a saúde feitos pelo homem remontam às sagradas escrituras e ao papiro de Ebers (aproximadamente 1500 a.C.), o qual apresenta um registro detalhado de remédios usados no Egito antigo. Encontram-se listados aproximadamente 700 substâncias utilizadas para tratamentos, sendo estas de origem animal e vegetal (TAINTER; MARCELLI; 1959; PINTO *et al.*, 2002; ABOELSOUD, 2010).

A fitoterapia chinesa é tão antiga que sua história se confunde com a história da própria Medicina Tradicional Chinesa, primeiramente relatada no livro denominado de Clássico do Imperador Amarelo (Huang Di Nei Jing), dedicado a acupuntura, a fitoterapia, a orientação alimentar e a prática de exercícios físicos como as principais modalidades terapêuticas. A partir do final da dinastia Han (25-220 a.D.), época em que o Nei Jing recebeu suas mais importantes contribuições, é que a tradição fitoterápica chinesa realmente se inicia com a publicação do livro conhecido como O Clássico da Matéria Médica do Divino Fazendeiro e do Tratado do Frio Nocivo, do estudioso Zhang Zhong, que enfatizava que o sabor de uma substância determinava parcialmente sua função terapêutica (EHLING, 2001).

No século XVI, o médico suíço conhecido como Paracelsus (1493-1541), formulou a “Teoria das Assinaturas”, baseada no provérbio “semelhante cura semelhante”. Acreditava-se que a forma, a cor, o sabor e o odor das plantas estavam relacionados com as suas propriedades terapêuticas (TAINTER; MARCELLI; 1959; TUROLLA; NASCIMENTO, 2006; BARREIRO; BOLZANI, 2009).

O uso de plantas medicinais é relatado desde o início das organizações civis até os dias atuais, o qual está documentado em diferentes países, de acordo com a cultura local. Conforme dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 80% da população mundial utiliza a medicina tradicional na atenção primária à saúde, e medicamentos derivados de produtos naturais, tais como os fitoterápicos, são utilizados por cerca de 20% da população de países desenvolvidos atendidos nos sistemas de saúde (ITHARAT; OORAIKUL, 2007).

Conforme estimativas da Convenção da Diversidade Biológica (CDB), o Brasil detém entre 15 e 20% de toda a biodiversidade mundial, o que inclui aproximadamente 55 mil espécies de plantas. Este patrimônio genético tem um valor econômico-estratégico inestimável para vários setores da indústria, especialmente para a indústria farmacêutica (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Os produtos naturais representam uma importante fonte de substâncias ativas com diversidade e complexidade molecular. Através de reações de síntese ou semi-síntese, muitas destas substâncias podem ser otimizadas para o desenvolvimento de medicamentos para tratar doenças que assolam as populações dos países em desenvolvimento, e que são negligenciadas pelas indústrias farmacêuticas (FUNARI; FERRO, 2005; HARVEY, 2008; MISHRA *et al.*, 2008).

Historicamente, um grande número de fármacos disponíveis no mercado foi desenvolvido a partir do isolamento de produtos naturais e/ou são derivados destes. A obtenção do principal alcaloide presente na *Papaver somniferum*, a morfina, marcou o início do processo de isolamento de princípios ativos de plantas, seguido da extração de outros como: quinidina, artemisinina, paclitaxel, os alcaloides vincristina e vimblastina (figura 1), e tantas outras substâncias cujo isolamento permitiu a obtenção de fármacos ativos, e/ou serviram como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos potencialmente mais ativos e/ou menos tóxicos (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006; BARREIRO; BOLZANI, 2009; LI; VEDERAS, 2009).

Segundo Brandão e colaboradores (2010), os vegetais representam as maiores fontes de substâncias ativas que podem ser usadas na terapêutica, devido à grande diversidade estrutural de metabólitos produzidos. Tal fato deve-se as recentes e modernas metodologias de isolamento e identificação de compostos, bem como métodos de *screening* biológicos automatizados, que permitem testar *in vitro* milhares de substâncias frente a alvos biológicos específicos em curto espaço de tempo.

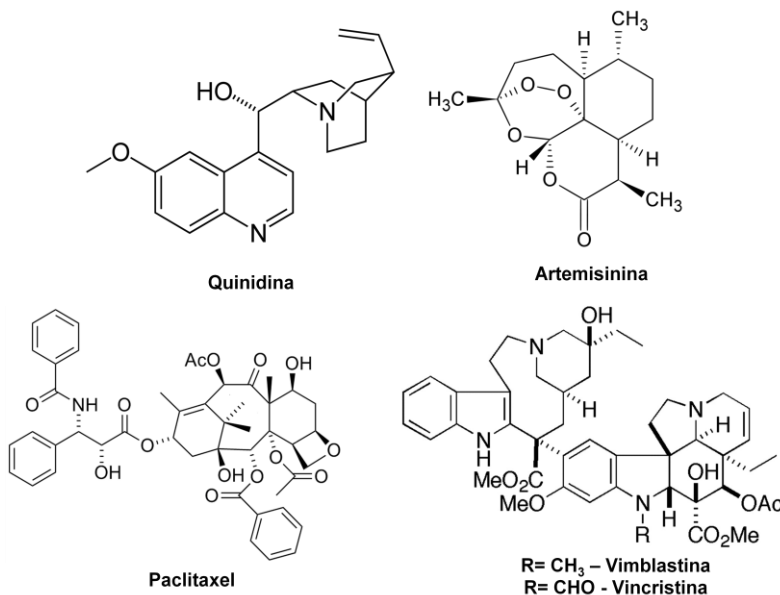


Figura 1: Princípios ativos isolados de plantas medicinais e utilizados na terapêutica.

A pesquisa de novos fármacos concentra-se na fase farmacodinâmica, cujas triagens preliminares usam modelos *in vitro*, tais como enzimas, receptores ou tecidos, para obter a relação entre os novos compostos e sua potência agonista ou antagonista, e posteriormente são realizadas avaliações em modelos *in vivo* para observação do efeito farmacológico (PEREIRA, 2007; HARVEY, 2008). No entanto, muitos dos estudos que se mostram promissores em testes *in vitro* não apresentam boa atividade em testes *in vivo*, e/ou podem apresentar toxicidade, e assim, as substâncias ativas são descartadas (PEREIRA, 2007).

Deve-se salientar, que a sociedade contemporânea passa por uma transição demográfica, evidenciada por um crescimento da população idosa, e com isso, um aumento da prevalência de doenças crônicas, que necessitam de tratamentos complexos e de longa duração, e, portanto, de fármacos com melhor perfil de segurança e eficácia, já que esta é uma população mais suscetível a efeitos indesejáveis e interações medicamentosas, especialmente por causa da politerapia (ALMEIDA *et al.*, 2007).

Assim, a busca de novos fármacos comprovadamente eficazes para prevenir, e ou controlar as doenças, essencialmente as crônico-degenerativas, justifica a pesquisa continuada com derivados sintéticos e ou produtos naturais (ANDRICOPULO *et al.*, 1998; CECHINEL FILHO *et al.*, 2003).

Segundo Dias e Côrrea (2001), os produtos naturais sempre desempenharam um papel muito importante no processo de desenvolvimento de fármacos, visto que o isolamento de metabólitos secundários farmacologicamente ativos tem sido utilizado diretamente na terapêutica, ou como protótipos para modificação molecular, e otimização destas substâncias.

Assim, a diversidade estrutural dos metabólitos secundários oriundos de produtos naturais, associada à química combinatória, que fornece grande número de derivados em curto intervalo de tempo, surge como promissora forma de desenvolvimento de novos fármacos (DIAS; CÔRREA, 2001).

O marco mais importante para o desenvolvimento de fármacos a partir de metabólitos obtidos de plantas foi o isolamento do glicosídeo salicilina, presente nas cascas do salgueiro (*Salix alba*), pelo pesquisador Johann A. Buchner, do Instituto de Farmacologia de Munique em 1828 (VIEGAS JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Somente em 1860, Hermann Kolbe sintetizou o ácido salicílico e seu sal sódico a partir do fenol, iniciando então a comercialização dos salicilatos. Em 1889, Felix Hofmann sintetizou o ácido acetil-salicílico, cuja substância foi posteriormente patenteada pelo laboratório farmacêutico Bayer, e comercializada com o nome de Aspirina®. Este fármaco continua sendo alvo de inúmeras pesquisas sobre sua aplicação terapêutica como analgésico, anti-inflamatório e antiagregante plaquetário (VIEGAS JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006; BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Assim, a química medicinal que estuda as origens moleculares da atividade biológica dos fármacos, tem como principal ferramenta para obtenção de novos fármacos, a síntese orgânica, que predominantemente está baseada em um protótipo oriundo de plantas medicinais. Inserem-se neste contexto as imidas cíclicas, tais como os derivados maleimídicos (ANDRICOPULO *et al.*, 1998; CECHINEL FILHO *et al.*, 2003).

As imidas cíclicas são análogas ao alcaloide natural filantimida (figura 2), isolado das partes aéreas da planta *Phyllanthus sellowianus* (figura 2), a qual é utilizada na medicina tradicional para tratamento de cálculos renais. Estudos *in vitro* com o princípio ativo isolado,

demonstraram atividade antiespasmódica semelhante à papaverina (CALIXTO *et al.*, 1984).

“As imidas cíclicas contêm o grupo $-\text{CO}-\text{N}(\text{R})-\text{CO}-$, sendo R um hidrogênio, grupo alquila ou arila” (CECHINEL FILHO *et al.*, 2003, p. 230). São atribuídas às imidas diferentes propriedades biológicas: sedativa, hipnótica, anticonvulsivante, hipotensiva, diurética, carcinostática, antimitótica, antiespasmódica, analgésica, antifúngica, antibacteriana e inseticida (CECHINEL FILHO *et al.*, 1998; 2003; ANDRICOPULO *et al.*, 1998).

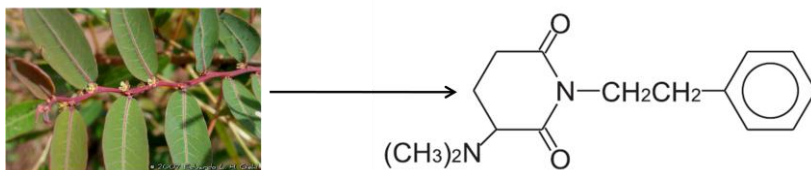


Figura 2: Imagem de um ramo da planta *Phyllanthus sellowianus* e estrutura química do alcaloide filantimida isolado de suas partes aéreas. Fonte: <http://www6.ufrgs.br/fitoecologia/florars/imagens.jpg>

As imidas cíclicas são divididas em subclasses, incluindo as maleimidas, succinimidas, glutarimidas, ftalimidas, naftalimidas e seus respectivos derivados (BUZZI; CORRÊA, CECHINEL FILHO, 2003; CECHINEL FILHO *et al.*, 2003).

O método mais utilizado para obtenção de imidas cíclicas constitui-se no emprego de ácidos dicarboxílicos na presença de quantidade equimolar de amônia ou um composto que possa produzi-la *in situ*, ou ainda, de derivado substituído da amônia com aquecimento que não exceda 200 °C (CECHINEL FILHO *et al.*, 2003).

As maleimidas são imidas cíclicas classificadas em alquilmaleimidas e arilmaleimidas, sendo que as últimas apresentam baixa toxicidade e são de fácil síntese quando comparadas às maleimidas N-alifáticas. A síntese das maleimidas (figura 3) ocorre através da condensação do anidrido maleico com uma amina apropriada em temperatura ambiente, obtendo-se o ácido maleâmico, o qual pode ser ciclizado com uso de agentes desidratantes como ácido acético, acetato de sódio anidro sob aquecimento (ALAA; ABDEL-AZIZ, 2007; SANCHEZ; SANDOVAL; DURAN, 2007; VALENCIA; HERNANDEZ; YÉPES, 2007).

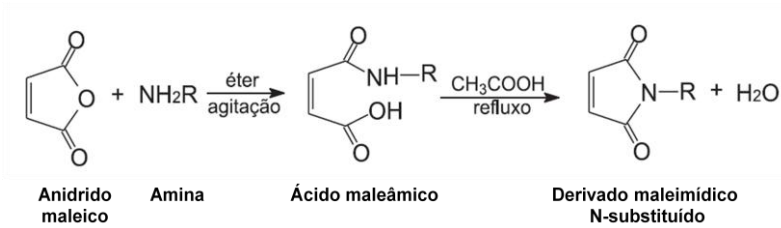


Figura 3: Esquema da síntese de derivados maleimídicos.

Fonte: Adaptado de: CECHINEL FILHO *et al.*, 2003.

Após a síntese, os derivados maleimídicos são purificados e a elucidação estrutural pode ser realizada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear e espectroscopia de infravermelho, cujo método é simples e importante para distinguir os sistemas cíclicos daqueles de cadeia aberta, como os ácidos âmicos, analisando-se as diferenças nas bandas de absorção características dos grupamentos carbonila e carboxila (CECHINEL FILHO *et al.*, 2003).

As maleimidas raramente são encontradas na natureza, sendo que a substância 2-etil-3-metil-maleimida-*N*-β-D-glucopiranosídeo (figura 4) isolada das folhas de *Garcinia mangostana*, parece ser um dos poucos exemplos de maleimidas isoladas de plantas (CECHINEL FILHO *et al.*, 2003).

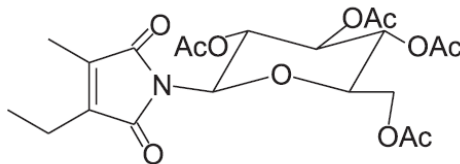


Figura 4: Estrutura química da maleimida 3-metil-maleimida-*N*-β-D-glucopiranosídeo.

Fonte: Adaptado de: CECHINEL FILHO *et al.*, 2003.

Stewart; Polomska e Lim (2007), relataram o isolamento e identificação de dois derivados maleimídicos do fungo *Antrodia camphorata*, cujo extrato das micélias do fungo é utilizado tradicionalmente para tratar hipertensão, inflamações e câncer de fígado.

Estudos com derivados N-fenilmaleimídicos e N-fenilarilmaleimídicos apontam que estes compostos apresentam significativa atividade antifúngica, inclusive contra cepas de *Candida albicans*, cujo fungo apresenta grande resistência contra vários fármacos. Os derivados maleimídicos apresentaram ação fungicida semelhante à anfotericina B (SORTINO *et al.*, 2008).

Em outro estudo, realizado por Yunes e colaboradores (2008), foi avaliada a atividade citotóxica de uma série de 15 derivados de imidas cíclicas em linhagens de células leucêmicas K562 e células endoteliais (cordão umbilical). Todos os compostos analisados apresentaram ação citotóxica em concentrações variando de 10 a 100 μM . Quando avaliada a relação entre estrutura química e atividade biológica, foi observada a importância da conformação plana do anel imídico ao anel aromático.

Prado e colaboradores (2004), avaliaram a ação de vários derivados imídicos sobre o potencial mitocondrial, cujos resultados demonstraram que alguns destes compostos alteraram a cadeia de transporte de elétrons. Estes mesmos autores avaliaram o potencial citotóxico em células B16F10, evidenciando possível ação antimelanoma destes compostos.

Conforme dados da literatura, as maleimididas são promissoras substâncias com potencial terapêutico para tratar diversas doenças ainda sem tratamento específico, e/ou cujos tratamentos apresentam sérios efeitos colaterais, tal como câncer e doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como as patologias neurodegenerativas (CECHINEL FILHO *et al.*, 2003; BARREIRO; BOLZANI, 2009).

1.2 ASPECTOS GERAIS DA INFLAMAÇÃO

A inflamação pode ser definida como o conjunto de alterações bioquímicas, fisiológicas e imunológicas em resposta a estímulos agressivos ao organismo. Ocorre após dano celular causado por micro-organismos (bactérias, vírus), agentes físicos (radiação, trauma, queimaduras), químicos (toxinas, substâncias cáusticas), necrose tecidual e reações imunológicas (IWALEWA *et al.*, 2007; STABLES; GILROY, 2010).

A inflamação é um mecanismo de defesa do organismo para reparo dos tecidos após injúria através de eventos celulares e microvasculares. O processo inflamatório pode ser dividido em três fases distintas. Inicialmente há uma fase aguda, sendo esta caracterizada

por vasodilatação local e aumento da permeabilidade vascular. Em seguida, ocorre uma fase subaguda, com infiltração de leucócitos e células fagocíticas, e finalmente, há a fase de resolução da inflamação, chamada de crônica, com início da regeneração tecidual e fibrose (SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006; IWALEWA *et al.*, 2007).

A reação inflamatória aguda possui uma duração curta e caracteriza-se por uma série de eventos inter-relacionados, entre os quais, aumento no fluxo sanguíneo e permeabilidade vascular, exsudação de fluidos (edema), migração e acúmulo de leucócitos no foco da lesão e liberação de mediadores inflamatórios (SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006; MEDZHITOV, 2008).

De forma objetiva, a inflamação aguda é caracterizada por quatro sinais cardinais: rubor, calor, edema e dor. A perda de função é característica do processo inflamatório crônico (VANE; BOTTING, 1987; PLYTYCZ; SELJELID, 2003).

A transição para a fase crônica é caracterizada pelo envolvimento da resposta humoral específica e reparo tecidual. Comumente, a inflamação crônica sucede um processo inflamatório agudo, mas pode surgir de maneira insidiosa, como resposta de baixo grau, latente e, muitas vezes, assintomática (IWALEWA *et al.*, 2007; MEDZHITOV, 2008).

A fase crônica da inflamação é considerada de duração prolongada, podendo variar de semanas até meses ou anos. Diferente da fase aguda, esta reação é caracterizada por: a) infiltração de células mononucleares como macrófagos, linfócitos e plasmócitos, fato este que reflete em uma reação persistente à lesão; b) destruição tecidual induzida principalmente por células inflamatórias; e c) tentativa de cicatrização por substituição do tecido danificado por tecido conjuntivo, que ocorre através da proliferação de pequenos vasos sanguíneos e fibrose (SUNDERKÖTTER *et al.*, 2003; IWALEWA *et al.*, 2007).

Tanto na resposta de fase aguda quanto na crônica, mediadores inflamatórios atuam localmente e sistemicamente, ativando outras células envolvidas no processo inflamatório (células endoteliais, fibroblastos e células do sistema fagocítico mononuclear), ampliando assim, a resposta inicial ao agente lesivo. Pode ser verificada a ocorrência de febre, hipotensão, leucocitose, caquexia, além de alterações no metabolismo de lipídios e lipoproteínas (VANE; BOTTING, 1987; SUNDERKÖTTER *et al.*, 2003; STABLES; GILROY, 2010).

A resposta inflamatória está diretamente relacionada ao processo de reparação da célula. Desta forma, a inflamação consiste

fundamentalmente de uma resposta protetora, com objetivo de livrar o organismo da causa inicial de uma lesão celular e das consequências desta, observadas pelo aumento de células ou aparecimento de tecidos necróticos (RODRIGUEZ-VITA; LAWRENCE, 2010; STABLES; GILROY, 2010).

No entanto, o estado de inflamação crônica subclínica provoca lesão tissular incipiente por meio da ativação persistente do sistema imune inato, podendo causar posterior manifestação de doenças crônicas não transmissíveis, como as cardiovasculares, diabetes, obesidade, câncer, entre outras. O mecanismo pelo qual estes mediadores pró-inflamatórios levam à manifestação dessas doenças parece envolver a atenuação da atividade insulínica, mobilização de gorduras, disfunção endotelial e estresse oxidativo (IWALEWA *et al.*, 2007; RODRIGUEZ-VITA; LAWRENCE, 2010). Em relação à carcinogenicidade, os possíveis mecanismos são: instabilidade genômica, alteração em eventos epigenéticos e expressão inapropriada de alguns genes, aumento da proliferação celular, resistência a apoptose, neovascularização e outros mecanismos ainda não esclarecidos (ALBINI; SPORN, 2007; KUNDU; SURH, 2008; RODRIGUEZ-VITA; LAWRENCE, 2010).

1.2.1 Eventos Celulares Envolvidos na Inflamação

A inflamação é a resposta do tecido vascularizado a uma agressão local, com envolvimento de células do tecido conjuntivo, incluindo o plasma, as células circulantes, os vasos sanguíneos e os constituintes celulares e extracelulares deste tecido. Entre as células circulantes incluem-se: neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos, basófilos e plaquetas. Já as células próprias do tecido conjuntivo são os mastócitos, que circundam intimamente os vasos sanguíneos, os fibroblastos, os macrófagos residentes e eventuais linfócitos. E finalmente, há a matriz extracelular que é composta por proteínas fibrosas estruturais, glicoproteínas aderentes e proteoglicanos (MEDZHITOV, 2008; STABLES; GILROY, 2010).

O recrutamento de leucócitos para o local onde há lesão é uma das mais importantes funções dos mediadores inflamatórios. Os leucócitos fagocitam agentes ofensivos, destroem bactérias e degradam o tecido necrótico e antígenos estranhos. Essas células ainda podem prolongar a inflamação e induzir lesão tecidual através da liberação de

enzimas, mediadores químicos e radicais livres (WITKO-SARSAT *et al.*, 2000).

Os leucócitos são classificados em dois grupos, os granulócitos ou polimorfonucleares e os agranulócitos ou mononucleares. Os granulócitos possuem núcleo de forma irregular, além de apresentarem no citoplasma grânulos específicos. Distinguem-se em neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Já o núcleo dos agranulócitos possui forma regular e seu citoplasma não apresenta granulações específicas. Para estas células são conhecidos dois tipos distintos, os linfócitos e os monócitos (WITKO-SARSAT *et al.*, 2000; MEDZHITOV, 2008).

Os neutrófilos são as primeiras e as mais abundantes células a chegar ao local da inflamação, e por esta razão, são reconhecidos como a primeira linha de defesa do organismo. Estes polimorfonucleares possuem o citoplasma repleto de grânulos, cujo conteúdo é constituído principalmente por peptídeos antimicrobianos e enzimas proteolíticas (ARNHOLD, 2004).

Considerando essa granulação dos neutrófilos (figura 5), os grânulos ditos específicos ou secundários contêm lisozima, colagenase, gelatinase, lactoferrina, ativador de plasminogênio, histamina e fosfatase alcalina. Já os grânulos chamados de azurófilos ou primários, de tamanho maior, contêm mieloperoxidase, fatores bactericidas (lisozima, defensinas), hidrolases ácidas e uma variedade de proteases neutras (WITKO-SARSAT *et al.*, 2000; ARNHOLD, 2004).

A principal diferença entre grânulos específicos e azurófilos, está em sua mobilização. No caso dos grânulos específicos, estes são secretados rapidamente em meio extracelular e quando há concentrações menores de seus agonistas, enquanto os azurófilos, com maior potencial destrutivo, liberam boa parte do seu conteúdo dentro do fagossoma e necessitam de altas concentrações de agonista para serem liberados no meio extracelular (WITKO-SARSAT *et al.*, 2000).

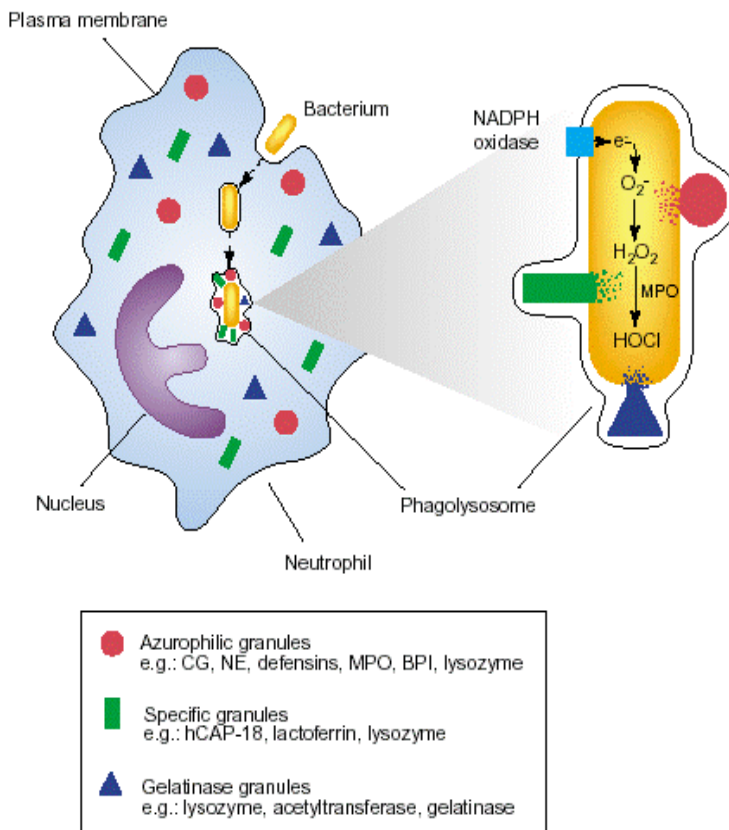


Figura 5: Representação da fagocitose mediada por neutrófilo e ativação da mieloperoxidase.

Fonte: <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/averhoff-petra-2006-05-24/HTML/image002.gif>

A mieloperoxidase (MPO) é uma heme proteína de 140 kDa, liberada durante a fagocitose, pertencente à família das peroxidases. A síntese de MPO ocorre durante a diferenciação mieloide na medula óssea e se completa dentro dos granulócitos no momento que antecede sua entrada na circulação. Essa enzima é encontrada predominantemente nos neutrófilos, monócitos e alguns subtipos de macrófagos teciduais, representando mais de 5% do conteúdo proteico total da célula em neutrófilos e 1% em monócitos (WINTERBOURN; VISSERS; KETTLE, 2000; KLEBANOFF, 2005; LAU; BALDUS, 2006).

A MPO reage com o peróxido de hidrogênio gerando entre 20-400 μM de HClO (ácido hipocloroso - pK_a 7,5), e normalmente está presente como uma mistura de ácido hipocloroso e íon hipoclorito em pH fisiológico (WINTERBOURN; VISSERS; KETTLE, 2000; PANASENKI *et al.*, 2007; YAP; WHITEMAN; CHEUNG, 2007).

A síntese de ácido hipocloroso ocorre no interior do fagossomo. O ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) produzido por oxidases é dismutado a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), com o qual a MPO na presença de haletos, como o íon cloreto, produz o ácido hipocloroso (WITKO-SARSAT *et al.*, 2000; MALLE *et al.*, 2007).

A MPO pode gerar vários agentes oxidantes, e muitos substratos podem ser oxidados por estes, tais como aminoácidos, lipídios, ácidos nucleicos, xenobióticos, etc., gerando radicais livres e/ou modificando as propriedades destas biomoléculas, e, por isso, a superexpressão da MPO está relacionada a danos macromoleculares e degradação tecidual (ARNHOLD, 2004).

Os produtos formados a partir da reação entre o HClO e biomoléculas são importantes marcadores para detecção do estresse oxidativo mediado pela MPO, visto que o HClO apresenta meia-vida curta (YAP; WHITEMAN; CHEUNG, 2007).

A atividade exacerbada da MPO está relacionada à injúria tecidual presente em muitas doenças inflamatórias como artrite, arteriosclerose, câncer, doenças pulmonares e renais, doenças neurodegenerativas, entre outras (HANSSON; OLSSON; NAUSEEF, 2006; LAU *et al.*, 2005; SALAVEJ; SPALTEHOLZ; ARNHOLD, 2006).

Estudos indicam que a alta expressão de genes de MPO está relacionada com a incidência e a severidade de doenças inflamatórias, sendo as mais citadas, a fibrose pulmonar, a esclerose múltipla e vasculites. Por isso, substâncias que inibam ou modulem a atividade da MPO são promissores agentes terapêuticos para doenças inflamatórias crônicas (REYNOLDS; STEGEMAN; TERVAERT, 2002; REYNOLDS *et al.*, 2006).

No entanto, a MPO é essencial para induzir a morte de microorganismos durante a fagocitose e, por isso, exerce papel essencial na defesa imune inata. Ainda, induz a agregação plaquetária e ativação do sistema complemento, participa da detoxificação de toxinas microbianas e está envolvida na modulação de sinalização celular (ARATANI, 2006; KLEBANOFF, 2005; LAU *et al.*, 2005; KNAAPEN *et al.*, 2006; MATTHIJSEN *et al.*, 2007).

Muitos autores ainda sugerem que a completa ou parcial deficiência de MPO, está relacionada com o aumento de infecções e risco de câncer, principalmente em pacientes diabéticos (BABIOR, 2000; KLEBANOFF, 2005; DALE; BOXER; LILES, 2008; ABDULAHAD; STEGEMAN; KALLENBERG, 2009). Por isso, a MPO é um importante alvo para estudos biológicos, visto que sua inibição e/ou indução está implicada em diferentes doenças crônicas.

1.3 CÂNCER

A palavra câncer refere-se ao termo neoplasia, isto é, tumores malignos, caracterizados não somente pelo crescimento descontrolado de células transformadas, mas pela capacidade de se diferenciarem e invadirem tecidos e órgãos, vizinhos ou distantes. Esta capacidade invasiva é denominada de metástase (ALMEIDA *et al.*, 2005).

O desenvolvimento do câncer é um processo complexo de vários estágios, e que normalmente está relacionado a alterações genéticas, as quais podem ser desencadeadas por múltiplos fatores, classificados em genéticos e ambientais. A célula tumoral pode ser decorrente de uma mutação direta e consequente ativação de oncogenes, ou inativação de genes supressores de tumor, o que resulta em proliferação descontrolada, e deflagração do câncer (DORAI; AGGARWAL, 2004; BYRNE *et al.*, 2006; BENSON; LIAU, 2008).

Evidências sugerem que, para ocorrer a proliferação descontrolada das células tumorais, além da alteração no DNA, ocorre significativa alteração no metabolismo energético das células neoplásicas e consequente aumento na geração de espécies reativas de oxigênio. Ainda, a ativação de fatores de indução de hipóxia como HIF-1, regula a homeostasia do metabolismo celular, e exerce papel relevante sobre alguns aspectos da carcinogênese, incluindo imortalização da célula, metástase, angiogênese, capacidade de invasão e reprogramação do metabolismo (LÓPEZ-LÁZARO, 2010).

A hereditariedade é um importante fator para o desenvolvimento do câncer, mas, a maioria dos casos está relacionada a fatores externos associados aos hábitos de vida, que podem induzir mutações genéticas tais como: contaminação por metais, radiações, excesso de produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, inflamações crônicas e xenobióticos (medicamentos, tabaco, álcool, pesticidas, etc.), os quais podem ser determinantes até mesmo, no tipo de tumor desenvolvido

(DORAI; AGGARWAL, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2005; BENSON; LIAU, 2008).

O câncer é a segunda causa de morte por doença no Brasil e no mundo, sendo que os carcinomas são os tumores mais comuns. Os carcinomas de mama, próstata e carcinoma de pele não melanoma são os mais prevalentes, sendo que este último, corresponde a aproximadamente 1 em cada 5 casos novos de câncer (CHAKRABARTY; GEISSE, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2005).

Segundos dados da OMS, em 2008, no mundo ocorreram 12,7 milhões de casos novos de câncer e 7,6 milhões de óbitos. A ocorrência de câncer distribuiu-se de forma homogênea entre homens e mulheres, enquanto a mortalidade é maior no sexo masculino. O câncer de pulmão é o mais frequente no mundo e também em número de óbitos. Os demais tipos de câncer mais incidentes no mundo são: mama, cólon e reto, próstata, estômago e fígado (BRASIL/INCA, 2009).

No Brasil, as estimativas para 2011, apontam para a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer, sendo os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino, e os cânceres de mama e do colo do útero no sexo feminino (figura 6). Estima-se que o câncer de pele do tipo não melanoma (114 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, cujas maiores taxas de incidência ocorrem nas regiões Sul e Sudeste (BRASIL/INCA, 2009).

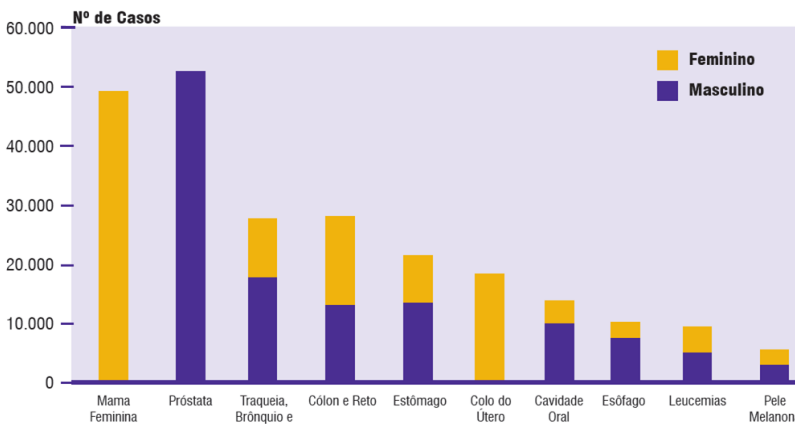


Figura 6: Estimativa para 2011 dos tipos de cânceres mais incidentes na população brasileira, exceto os tumores de pele não melanoma.

Fonte: BRASIL/INCA, 2009.

Através da portaria nº 2.439 de 8 de dezembro de 2005 do Ministério da Saúde, foi adotado a Política Nacional de Atenção Oncológica (PNAO), que reconhece que o câncer é um problema de saúde pública, e determina que as ações para o seu controle no Brasil sejam realizadas por meio de uma Rede de Atenção Oncológica, com a participação direta e indireta do governo federal, das secretarias estaduais e municipais de saúde, das universidades, dos serviços de saúde, dos centros de pesquisa, das organizações não governamentais e da sociedade de forma geral (CASTRO, 2009).

Segundo a portaria, todo o trabalho desenvolvido para o controle do câncer no país deverá respeitar as diferenças de incidência e mortalidade em cada região brasileira, uma vez que a mortalidade por neoplasias apresenta grandes variações entre os estados, decorrentes de perfis heterogêneos de exposição a fatores de risco e modos de vida. Assim, o maior desafio é ampliar as ações de promoção da saúde, prevenção e diagnóstico precoce para reduzir os índices de incidência e mortalidade do câncer, além de propiciar qualidade de vida ao paciente (CASTRO, 2009).

Os três principais tipos de tratamento para o câncer são: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Há ainda, fototerapia dinâmica e imunoterapia, geralmente associadas às primeiras cujas técnicas têm evoluído graças à compreensão da biologia da transformação maligna, e das diferenças no controle da proliferação da célula normal e cancerosa (ALMEIDA *et al.*, 2005; BORGHAEI; SMITH; CAMPBELL, 2009).

Ainda que os tratamentos quimioterápicos convencionais apresentem muitos efeitos indesejáveis, provavelmente tais medicamentos não serão totalmente substituídos, mas novos fármacos serão adicionados à terapêutica já existente, visando novas abordagens, isto é, novos alvos terapêuticos incluindo inibidores de sinais de transdução, inibidores de angiogênese, indutores de apoptose, inibidores de ciclo celular, entre outros (OLIVEIRA; ALVES, 2002; FASS, 2008).

Além disto, busca-se a obtenção de um perfil molecular/genético de cada tumor, a fim de que cada paciente disponha de um tratamento individualizado e específico para o seu caso (terapias com anticorpo monoclonal), aumentando assim, a eficácia do tratamento e diminuindo a incidência de efeitos colaterais (OLIVEIRA; ALVES, 2002; FASS, 2008).

Os quimioterápicos disponíveis contra o câncer são classificados de acordo com o mecanismo de ação, isto é, conforme atuam sobre o ciclo celular, e por isso denominados de fármacos ciclo-celular específicos (ex. antimetabólitos, alcaloides vegetais, hormônios), os

quais atuam contra células em processo de divisão, também denominados de antiproliferativos, e ciclo-celular não específicos (antibióticos naturais, complexos de platina, agentes alquilantes diversos) (ALMEIDA *et al.*, 2005; FASS, 2008).

Os quimioterápicos atuam de forma não específica, isto é, destroem ou inibem o crescimento tanto de células neoplásicas como células normais, especialmente as de crescimento rápido, como as gastrintestinais, capilares e as do sistema hematopoiético e imunológico. Tal evento, explica boa parte dos efeitos colaterais da quimioterapia, tais como: náuseas, vômitos, diarreia ou constipação, perda de apetite e peso, alopecia, suscetibilidade às infecções, dor, febre, depressão, e outros efeitos adversos (OLIVEIRA; ALVES, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2005; COOLBRANDT *et al.*, 2010).

1.3.1 Morte celular e alvos terapêuticos

Novas abordagens genéticas, moleculares e bioquímicas têm sido focadas como possíveis alvos terapêuticos de fármacos antitumorais. A maioria das pesquisas aborda a indução da morte celular por apoptose, tanto via extrínseca como intrínseca, mas também, novos estudos apontam que as células tumorais podem ser induzidas à morte por vias não apoptóticas, tais como necrose, senescência, autofagia e catástrofe mitótica, em especial, as células neoplásicas resistentes à apoptose (OKADA; MAK, 2004).

A fase M do ciclo celular é dividida em mitose (constituída de quatro fases com 3 pontos de “checkpoints”, a fim de corrigir possíveis erros antes da duplicação celular e, se não possível, há a indução da morte) e citocinese. Assim, defeitos nos genes que são necessários para induzir catástrofe mitótica podem contribuir para a tumorigênese (OKADA; MAK, 2004).

A mitose catastrófica envolve uma mitose aberrante, resultado de uma segregação cromossômica ou fusão de células. Geralmente, não é considerada uma forma de morte, mas sim uma sinalização irreversível para a mesma (BROWN; ATTARDI, 2005).

A célula em processo de morte por mitose catastrófica é caracterizada pelas células gigantes que contêm cromossomos não condensados, com múltiplos micronúcleos, e é morfológicamente distinta das outras formas de morte celular (OKADA; MAK, 2004).

As células senescentes apresentam telômeros curtos, e morfologicamente apresentam citoplasma achatado e presença de muitos grânulos. A senescência pode ser induzida pela rápida multiplicação celular, o que pode alterar o tamanho dos telômeros, ou ainda, por outros eventos que provocam o encurtamento dos telômeros, como os danos induzidos ao DNA pelo processo de desenvolvimento do tumor ou pela ativação de oncogenes. A senescência programada é iniciada pela ativação de vários inibidores do ciclo celular (OKADA; MAK, 2004).

A autofagia é um processo adaptativo, controlado geneticamente e ocorre em resposta a um estresse metabólico que resulta na degradação de componentes celulares (DANIAL; KORSMEYER, 2004; LUM; DEBERARDINIS; THOMPSON, 2005). A morte por autofagia é induzida pela depleção de organelas essenciais à sobrevivência da célula, como mitocôndrias e retículo endoplasmático; a diminuição da sinalização de sobrevivência celular; desregulação das enzimas lisossomais e ativação de sinais para apoptose (TORMO *et al.*, 2009).

A necrose ocorre em resposta a severos traumas e ou injúrias celulares, sendo o estresse oxidativo uma importante causa de indução de morte por necrose (CURTIN; DONOVAN; COTTER, 2002).

A necrose é um processo de destruição desregulada, resultado de uma catástrofe bioenergética, incompatível com a sobrevivência celular. É caracterizada pela presença de vacúolos no citoplasma, pela perda da integridade das membranas plasmáticas e das organelas, pelo aumento do volume celular e por indução de inflamação nos tecidos vizinhos em decorrência da liberação do conteúdo celular e de moléculas inflamatórias, que culmina em injúrias às células vizinhas (CURTIN; DONOVAN; COTTER, 2002; OKADA; MAK, 2004).

A apoptose é uma forma altamente regulada de morte celular na qual a célula participa ativamente de sua morte (CURTIN; DONOVAN; COTTER, 2002). “O termo apoptose (do grego *apó* = separação, *ptôsis* = queda), designa a forma fisiológica de morte celular que ocorre segundo programa genético que desencadeia processo de autodigestão controlada” (PAROLIN; REASON, 2001, p.138).

A apoptose é caracterizada por alterações morfológicas e bioquímicas, que incluem: despolarização mitocondrial, diminuição do volume celular, perda da aderência da matriz celular, condensação da cromatina, fragmentação nuclear, formação dos corpos apoptóticos que são fagocitados pelos macrófagos teciduais sem desencadear resposta inflamatória, evitando assim injúrias às células vizinhas (CURTIN;

DONOVAN; COTTER, 2002; OKADA; MAK, 2004; CHIPUK; GREEN, 2005).

A mitocôndria exerce papel-chave na regulação da morte por apoptose. Três mecanismos relacionados à mitocôndria estão fortemente ligados à indução apoptótica: interrupção do transporte de elétrons e metabolismo energético (diminuição da produção de ATP), liberação de proteínas ativadoras de caspases (citocromo C), e alteração do potencial redox da célula (aumento da produção de ânion superóxido e de peróxido de hidrogênio e lipoperoxidação) (GREEN; REED, 1998).

A apoptose pode ser iniciada pela ativação de receptores de morte, pela privação de fatores de crescimento celular, pelo estresse oxidativo e consequente despolarização mitocondrial, e ativação de caspases executoras. Dentre os fatores que regulam a apoptose destacam-se: as proteínas caspases, proteínas da família Bcl-2 e a proteína p-53 (KIECHLE; ZHANG, 2002; AMARANTE-MENDES, 2003; PHILCHENKOV, 2004).

As caspases são enzimas aspartato-específicas, presentes entre as membranas celulares e mitocondriais, no citoplasma, no retículo endoplasmático e núcleo da célula, na forma de zimogênios (ALGECIRAS-SCHIMNICH; BARNHART; PETER, 2002). São executoras da morte por apoptose e compreendem duas classes diferentes: as iniciadoras (caspases 2, 8, 9 e 10) e as efetoras (caspases 3, 6 e 7) que clivam substratos específicos e são responsáveis pelas características típicas deste tipo de morte (KIECHLE; ZHANG, 2002; AMARANTE-MENDES, 2003; RIEDL; SHI, 2004).

Existem duas vias principais que levam à ativação das caspases: a via extrínseca, ou citoplasmática, e a via intrínseca, ou mitocondrial. A via extrínseca é induzida quando há ativação dos receptores de morte pelos seus respectivos ligantes, sendo os dois mais estudados o FAS e TNF α . Tais receptores, quando estimulados, associam-se, através de proteínas adaptadoras como a FADD, à caspase-8 e/ou à caspase-10, ativando-as e acionando as caspases executoras (KIECHLE; ZHANG, 2002; AMARANTE-MENDES, 2003; PHILCHENKOV, 2004; RIEDL; SHI, 2004).

A via intrínseca ou mitocondrial é iniciada por sinais provenientes do interior da célula. As mitocôndrias sofrem desacoplamento e liberam para o citosol, o citocromo C, as proteínas Smac/DIABLO (segunda ativadora das caspases derivada da mitocôndria) e o AIF (fator indutor de apoptose). O citocromo C liberado liga-se ao APAF-1 (fator ativador de proteases – 1). Esse complexo, na presença de ATP, ativa a caspase-9, que ativará a caspase-

3. Por outro lado, a Smac inativa as IAPs (proteínas inibidoras de apoptose), ativa a caspase-3 e culmina em apoptose (KIECHLE; ZHANG, 2002; AMARANTE-MENDES, 2003; PHILCHENKOV, 2004; RIEDL; SHI, 2004).

A proteína nuclear p-53 é ativada para reparar danos no DNA e promove a apoptose quando não é possível reparar o DNA alterado. A apoptose é acionada através da transcrição de vários genes reguladores da ativação e supressão da apoptose (PHILCHENKOV, 2004). Existem fortes evidências da participação desta proteína na supressão da tumorigênese, uma vez que a maioria das neoplasias apresenta mutações no gene p-53, que codifica a proteína p-53, ou defeitos na sua regulação (ATTARDI, 2005).

As proteínas da família Bcl-2 exercem papel fundamental no mecanismo de sobrevivência e morte celular. Algumas atuam como proteínas antiapoptóticas e protegem a célula da morte (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1), enquanto outras atuam como pró-apoptóticas (Bax, Bak, Bad, Bid). A expressão das proteínas pró-apoptóticas influencia na liberação de várias moléculas que atuam efetivamente na indução da apoptose celular, tais como: citocromo C, pró-caspases 2, 3 e 9, fatores de indução de apoptose (IAPs), endonucleases, proteínas Smac/DIABLO (PHILCHENKOV, 2004; GHOBRIAL; WITZIG; ADJEU, 2005).

Segundo Okada e Mak (2004), a superexpressão de proteínas antiapoptóticas como Bcl2, Bcl-XL, fator nuclear κ B (NF- κ B), podem estar relacionadas à resistência à apoptose, detectada em muitas células tumorais malignas.

1.3.2 Espécies reativas e defesas antioxidantes

O termo radical livre refere-se a átomos e moléculas que possuem número ímpar de elétrons na última camada eletrônica. Este não pareamento torna estas moléculas instáveis e altamente reativas. Para se tornarem compostos estáveis, estas moléculas desestabilizam outras biomoléculas, assim, gerando uma reação em cadeia (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; PANNU; SINGH, 2006).

Os radicais livres que possuem um elétron não pareado centrado em átomos de oxigênio e nitrogênio são denominados respectivamente de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio

(ERN) (LEONG *et al.*, 2002; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; GUANG-JIN *et al.*, 2006).

As ERO's dividem-se em dois grupos: os radicalares e os não radicalares. As principais espécies reativas radicalares são: hidroxil (HO^\bullet), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroxila (ROO^\bullet) e alcooxila (RO^\bullet). O peróxido de hidrogênio e o ácido hipocloroso são os principais representante não radicalares. Já o óxido nítrico (NO^\bullet), óxido nítrico (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-) são exemplos de ERN's (SZABO *et al.*, 1994; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

Dentre as espécies reativas citadas, o radical hidroxila é a espécie mais reativa e deletéria ao organismo (GUTTERIDGE; HALLIWEL, 1988; KEHRER, 2000). Pode-se originar fisiologicamente a partir da reação entre H_2O_2 e metais de transição. Além disso, a partir do H_2O_2 a mieloperoxidase presente em fagócitos pode converter o peróxido de hidrogênio em ácido hipocloroso, o qual apresenta potente ação oxidante e está envolvido no processo de fagocitose, especialmente de proteínas (WINTERBOURN, 1985; WINTERBOURN *et al.*, 1992; ZAVODNICK *et al.*, 2002).

Os organismos aeróbicos estão diretamente expostos a produção de espécies reativas, uma vez que estas são produzidas fisiologicamente pelas mitocôndrias durante o processo de produção de energia (GUTTERIDGE; HALLIWEL, 1988; VICENTINO; MENEZES, 2007). Quando são produzidas de forma controlada, desempenham papel vital, atuando na regulação da sinalização celular, síntese de substâncias biológicas importantes, proliferação celular, fagocitose e expressão gênica (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; BERRA; MENCK; DI MASCIO, 2006).

No entanto, quando ocorre o aumento na produção das espécies reativas ou radicalares, ou ainda, a diminuição de agentes antioxidantes, estas passam a desempenhar um papel prejudicial ao organismo (USBERCO; SALVADOR, 1996). A situação na qual a síntese de espécies reativas excede a capacidade do organismo de inibir sua síntese ou de inativá-las, denomina-se estresse oxidativo (BARBOSA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2006).

Há fatores que contribuem para exacerbação do dano oxidativo ou diminuição da capacidade antioxidante do organismo, dentre eles: predisposição genética, fatores ambientais como radiação ultravioleta (UV), exposição ao tabaco, bebida alcoólica, e propriedades intrínsecas

específicas de grupos de células (VICENTINO; MENEZES, 2007; CHORILLI; LEONARDI; SALGADO, 2007).

Dentre os efeitos tóxicos do oxigênio destaca-se a peroxidação dos lipídeos de membrana (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Entre todas as estruturas celulares, a mais suscetível e atingida pela ação das espécies reativas e radicalares é a membrana celular, em decorrência da peroxidação lipídica. Este processo oxidativo altera a permeabilidade e estrutura das membranas lipídicas causando a perda da seletividade na troca iônica, e liberação do conteúdo de organelas, formação de produtos citotóxicos, e em condições extremas a morte celular (KOPPENOL, 1990; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Acredita-se que o evento primário para a reação em cadeia de lesões e danos biomoleculares por espécies reativas e radicalares é a lipoperoxidação. O processo de peroxidação lipídica é dividido em três fases: a iniciação, propagação e terminação (CASALINO; SBLANO; LANDRISCINA, 1996; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A lipoperoxidação é iniciada pela oxidação de um ácido graxo insaturado, mediada por espécies reativas e propagada por radicais peroxilas. Resultando na formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos, tais como o malondialdeído, 4-hidroxinonenal e isoprostanos, substâncias detectáveis em amostras biológicas e empregados para se avaliar o estresse oxidativo (LIMA; ABDALLA, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 2003).

Os danos oxidativos à biomoléculas, ocasionados por espécies reativas ou radicalares podem induzir a inativação enzimática, mutação, ruptura de membrana, aumento na aterogenicidade de lipoproteínas plasmáticas, culminando na morte celular (LIM *et al.*, 2006; CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

O desequilíbrio entre a produção de EROs e ERNs, e o sistema de defesa antioxidante endógeno, pode causar uma série de mudanças fisiológicas que caracterizam o estresse oxidativo, o qual pode culminar em morte celular (McCONKEY, 1998; ALLEN; TRESINI, 2000) e estão associadas a diferentes doenças (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Por isso, os danos oxidativos encontram-se relacionados com a etiologia de diversas patologias incluindo as doenças degenerativas, câncer e envelhecimento podendo ser diretamente a causa ou o fator agravante (BIANCHI; ANTUNES, 1999; HALLIWELL, 1999; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Evidências têm mostrado que as células tumorais apresentam maior estresse oxidativo quando comparado às células normais;

associado à ativação de alguns oncogenes e ao aumento da atividade metabólica (HILEMAN *et al.*, 2004).

Enquanto um elevado ou moderado nível de estresse oxidativo é potencialmente citotóxico e bloqueia a proliferação, por induzir células à apoptose e até à necrose, um baixo nível de estresse pode estimular a divisão celular e o crescimento tumoral (DREHER; JUNOD, 1996).

Sob estresse oxidativo, as células normais podem entrar num processo de adaptação, principalmente das suas defesas antioxidantes (SCHAFER; BUETTNER, 2001). No entanto, algumas células tumorais apresentam capacidade de adaptação limitada à geração de espécies reativas (PELICANO *et al.*, 2004).

Outro fator importante resultante da indução de espécies reativas na célula tumoral é a oxidação de proteínas (MARSHALL; MERCHANT; STAMLER, 2000; MALLIS; BUSS; THOMAS, 2001). A inibição das proteínas da cadeia respiratória, como o citocromo *c*, pode ativar as vias das caspases e induzir a célula à apoptose. Além disso, a lipoperoxidação da membrana mitocondrial pode levar à liberação de outros fatores indutores de morte celular (SASTRE; PALLARDO; VINA, 2000; PELICANO *et al.*, 2003).

O aumento na concentração de espécies reativas também está associado à ativação da via de sinalização JNK/SAPK, a qual está envolvida na ativação de genes de proteínas necessárias para a apoptose (DAVIS; RONAI; TEW, 2001).

Os antioxidantes são substâncias que tem a capacidade de retardar ou prevenir a deteriorização, dano, ou destruição provocada pelo estresse oxidativo (CHORILLI; LEONARDI; SALGADO, 2007). As substâncias antioxidantes inibem ou atrasam os processos oxidativos de maneira eficaz, podendo ser classificadas em enzimáticos, solúveis, nutricionais e sequestradores de metais de transição (VICENTINO; MENEZES, 2007).

Os antioxidantes possuem diferentes mecanismos de ação, sendo os principais: o impedimento da formação de radicais livres; interceptação de radicais livres gerados pelo metabolismo celular, ou por fontes exógenas; reparo das lesões causadas pelas espécies reativas e o aumento da síntese de enzimas antioxidantes (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Os antioxidantes exógenos provêm da dieta, especialmente de produtos naturais, como frutas, vegetais, organismos marinhos, entre outros, que atuam prevenindo e auxiliando as defesas endógenas das consequências deletérias do estresse oxidativo (NORDBERG; ARNER, 2001; LIM *et al.*, 2006). Os principais exemplos de antioxidantes

exógenos são: vitaminas A, C e E, os polifenóis (flavonoides) e carotenoides (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007; CHORILLI; LEONARDI; SALGADO, 2007).

Os antioxidantes endógenos são classificados em enzimáticos e não-enzimáticos (VASCONCELOS *et al.*, 2007). As defesas antioxidantes enzimáticas compreendem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), NADPH-quinona oxidoreductase, glutationa peroxidase (GPx), e enzimas de reparo (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

O sistema de defesa enzimático desempenha as seguintes funções: a SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2); a CAT converte o H_2O_2 em oxigênio molecular e água (HALLIWEL, 1999; VASCONCELOS *et al.*, 2007). As enzimas catalases estão localizadas em uma organela chamada de peroxissoma. Possuem uma das taxas mais altas de “turnover” (rotatividade ou renovação): uma molécula de CAT pode converter seis milhões de moléculas de H_2O_2 em água e oxigênio a cada minuto (VALKO *et al.*, 2006).

A família das glutationas peroxidases (GPx) reduz H_2O_2 e outros peróxidos à água ou álcool (RAYMAN, 2000). A família de GPx integra o grupo de selenoproteínas, que têm, em seu sítio ativo o selênio (Se), obtido da dieta ligado à metionina (FARFANI; DOMENE; PADOVANI, 2001). A GPx, catalisa a redução de peróxidos em geral, utilizando a glutationa reduzida como co-fator (HALLIWEL, 1999; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

A GR é a enzima responsável por reduzir a glutationa oxidada (GSSG) em glutationa reduzida (GSH) mantendo assim, elevada a razão GSH:GSSG (NOCTOR *et al.*, 2002).

Desta forma, os agentes antioxidantes enzimáticos, removem cataliticamente radicais e espécies reativas, protegendo as células e os tecidos do estresse oxidativo (BIANCHI; ANTUNES, 1999; BERRA; MENCK; DI MASCIO, 2006).

O sistema antioxidante não enzimático compreende substâncias tais como: a glutationa e proteínas com grupamento tiol (SH), coenzima Q, ácido úrico, billirubina, NADPH e NADH, flavonoides, vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (α -tocoferol), β -caroteno (precursor da vitamina A), clorofilina, L-cisteína, curcumina. Nesta classe encontram-se também proteínas ligadoras de metais, como: ceruloplasmína, metalotioneína, albumina, transferrina, ferritina, mioglobina, sendo que, dentre estes antioxidantes há os de fonte endógena e os provindos de uma dieta adequada ou via suplementação (VANNUCCHI *et al.*, 1998;

BIANCHI; ANTUNES, 1999; BERRA; TEIXEIRA *et al.*, 2003; MENCK; DI MASCIO, 2006).

A GSH é a primeira e a mais importante defesa antioxidante não-enzimática intracelular contra produtos tóxicos de oxigênio, especialmente na mitocôndria, local onde, com alta intensidade, ocorre a síntese de intermediários reativos de oxigênio. Sua forma oxidada é a GSSG, glutationa dissulfito. A característica antioxidante da GSH é determinada pelo grupamento – SH (sulfidril), presente no resíduo cisteína (MASELLA *et al.*, 2005).

A GSH é sintetizada intracelularmente pela ação de duas enzimas citosólicas. A gama-glutamilcisteína sintetase (γ -GCS), que utiliza o glutamato e cisteína como substratos, e a glutationa sintetase (BALLATORI *et al.*, 2005).

A GSH atua como co-fator de diversas enzimas de detoxificação como GPx e GST, é *scavenger* do radical hidroxil e do oxigênio singleto, detoxifica o H_2O_2 e lipoperóxidos pela ação catalítica da GPx, participa da regeneração de importantes antioxidantes como vitamina C e E para suas formas ativas (JONES *et al.*, 2000).

Assim, as substâncias antioxidantes não enzimáticas, atuam por diferentes mecanismos de ação: complexação de íons metálicos; captura de radicais livres; decomposição de peróxidos; inibição de enzimas responsáveis pela geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e a modulação de vias sinalizadoras celulares (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Os antioxidantes em doses adequadas são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelas espécies reativas a biomoléculas, portanto, auxiliam na prevenção e no tratamento do envelhecimento, de doenças degenerativas, como câncer e aterosclerose (CHORILLI; LEONARDI; SALGADO, 2007).

Entretanto, o excesso de antioxidantes redutores pode gerar a inibição da proliferação celular, por prevenir o estado transitório da oxidação e minimizar a adaptação ao estresse oxidativo, como também reduzir metais de transição livres que tornam-se potentes catalisadores da cascata iniciada por espécies reativas e radicalares (BIANCHI; ANTUNES, 1999; CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007; CHORILLI; LEONARDI; SALGADO, 2007).

1.3.3 Melanoma

O melanoma é uma neoplasia maligna originada a partir dos melanócitos, células responsáveis pela pigmentação cutânea, sendo a principal causa de morte por doença de pele (CARVALHO *et al.*, 2004). Caracteriza-se pela alta capacidade de infiltração no sistema nervoso central (SNC), correspondendo ao terceiro tumor metastático mais comum, depois dos cânceres de pulmão e mama (EWEND; CAREY; BREM, 1996; MEIER *et al.*, 2004).

O melanoma é o estágio final da carcinogênese melanocítica, no qual a instabilidade genética das células iniciadas leva a um aumento da sua capacidade proliferativa e de invasão. O melanoma cutâneo é classificado em quatro grupos clínico-histológicos: melanoma em lentigo maligno; melanoma disseminativo superficial; melanoma nodular e melanoma acral lentiginoso (SOUZA; FISCHER; SOUZA, 2004).

O melanoma cutâneo subtipo lentigo maligno corresponde a 5% dos melanomas em caucasianos, e é frequentemente diagnosticado em mulheres e pessoas com idade superior a 60 anos em áreas anatômicas intensamente expostas ao sol. O subtipo mais comum em indivíduos de pele clara é o disseminativo superficial (70% dos melanomas diagnosticados), comum em jovens nas áreas menos expostas ao sol (costas, braços, ombro, perna e coxa) e entre os mais velhos nas mais expostas (cabeça e pescoço) (SAIDA, 2001; SOUZA; FISCHER; SOUZA, 2004).

O subtipo nodular é o segundo mais comum entre caucasianos, e corresponde a 10-12% dos melanomas diagnosticados. O subtipo mais raro é o melanoma acral lentiginoso, que ocorre predominante nas palmas, solas e leito ungueal em negros (SAIDA, 2001; SOUZA; FISCHER; SOUZA, 2004).

Morfologicamente, o melanoma maligno caracteriza-se por sua assimetria, diâmetro variável 1 - 6 mm, sem delimitações, isto é, não apresenta bordas definidas e tem pigmentação variada devido à má distribuição da melanina. Em alguns casos, pode ocorrer ulceração (WAGNER *et al.*, 2000; MARTÍN *et al.*, 2008).

O melanoma representa aproximadamente 4% de todas as neoplasias cutâneas, entretanto é responsável por 65-80% das mortes relacionadas a câncer de pele (LEE; TOMSU; VON ESCHEN, 2000; JEMAL *et al.*, 2009; FARAONE *et al.*, 2009). A incidência mundial de

melanoma vem aumentando de 3% a 7% anualmente (LENS; DAWES, 2004; LUI *et al.*, 2007; CONESA *et al.*, 2009).

No Brasil, estima-se que 6 mil casos novos sejam diagnosticados a cada ano, o que já representa uma incidência de 1,2% das neoplasias estimadas para o ano de 2011, prevalecendo maior número de casos nos estados do Sul, cuja prevalência está diretamente relacionada a população predominantemente de pele clara, e geograficamente, estes estados recebem maior radiação UV, principalmente durante os meses do verão (CARVALHO *et al.*, 2004; ASHTON-PROLLA *et al.*, 2008; BRASIL/INCA, 2009).

Com o aumento da prevalência do melanoma, tem se observado maior propensão à disseminação extracutânea, e um significativo aumento nos relatos de casos de metástases. Sua disseminação ocorre preferencialmente pela via linfática para órgãos vitais, como o pulmão, sistema nervoso central e mesentério (TOMASICH *et al.*, 2003; OLIVEIRA FILHO; SILVA, 2007).

Os fatores de risco para o melanoma são: predominantemente a exposição à radiação ultravioleta, particularmente até os vinte anos de idade; residir em maiores altitudes em combinação com fatores endógenos como tipos de pele, olhos azuis, cabelos ruivos; predisposição à formação de nevos melanocíticos; incapacidade para bronzeamento (pele vermelha após exposição solar); imunodeficiência e predisposição genética (LEITNER, 2006; MARTÍN *et al.*, 2008; FARAONE *et al.*, 2009). Também, o número de nevos comuns e nevos atípicos, são fatores relevantes para o desenvolvimento de melanoma (WAGNER *et al.*, 2000; FARAONE *et al.*, 2009).

Confirmadamente, o principal fator de risco exógeno para o melanoma é a exposição à radiação ultravioleta. Muitos estudos sugerem que queimaduras solares intensas e intermitentes, especialmente em crianças e adolescentes, estão fortemente implicadas no desenvolvimento posterior de melanoma (GARBE; EIGENTLER, 2007).

Leitner (2006), relata que a alta incidência de melanoma e demais carcinomas de pele, provavelmente se devem à diminuição mundial da camada de ozônio, e isto acarretou em um aumento brusco da radiação ultravioleta, especialmente da radiação do tipo UVB (280-320 nm), a qual está relacionada com fenômenos de fotossensibilidade e queimaduras solares. Também contribui para a gênese do melanoma, a exposição a fontes artificiais de radiação ultravioleta, como a exposição a lâmpadas que emitem radiação ultravioleta de comprimento de onda

mais longo (UVA) (MOURÃO, 2002; SOUZA, FISCHER; SOUZA, 2004).

Os mecanismos pelos quais a radiação ultravioleta pode danificar o DNA e causar o carcinoma de pele, inclusive o melanoma, devem-se à excitação direta ao DNA pela radiação UVB e à geração de espécies reativas de oxigênio causadas pela radiação UVA, o que justifica o envelhecimento celular observado de forma mais intensa nas câmaras de bronzamento (SOUZA; FISCHER; SOUZA, 2004).

Assim, a incidência anatômica do melanoma parece ser compatível com a magnitude da radiação sofrida, especialmente em atividades ao ar livre, tais como ombros, costas, cabeça e pescoço, e em mulheres, também nos membros superiores (SOUZA; FISCHER; SOUZA, 2004; MARTÍN *et al.*, 2008).

Atualmente a proporção de melanomas *in situ* é maior que a de melanomas invasores, e, por isso, são facilmente tratados com processo cirúrgico, já que o crescimento é lento e dificilmente penetram na membrana basal, quando diagnosticado precocemente. No entanto, a possibilidade do paciente desenvolver outro melanoma nas demais regiões do corpo é dez vezes maior nos dois primeiros anos do que em indivíduos saudáveis (LEITNER, 2006).

As opções terapêuticas incluem a excisão cirúrgica, terapia fotodinâmica, quimioterapia, imunoterapia, bioquimioterapia (associação da imunoterapia e quimioterapia) e radioterapia, sem apresentar grande impacto na sobrevida global nos casos de melanoma metastático. Apenas 10% a 20% dos pacientes em tratamento com quimioterapia têm resposta satisfatória (EWEND; CAREY; BREM, 1996; TARHINI; AGARWALA, 2005; KASPER *et al.*, 2007).

A radioterapia é um método que utiliza radiações ionizantes que destroem as células neoplásicas. O número de aplicações tem relação direta com a extensão, localização do tumor e estado de saúde do paciente. Sua maior indicação é para o tratamento paliativo de metástases sintomáticas em ossos e cérebro (SHEN *et al.*, 2000).

A terapia fotodinâmica consiste da utilização de um agente fotossensibilizador (porfirinas ou ftalocianinas), luz com comprimento de onda adequado e oxigênio molecular, que gera a produção de agentes letais que inativam as células tumorais, tal como o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), mas apresenta pouca efetividade no tratamento de melanoma metastático (KOLAROVA *et al.*, 2007).

O fármaco dacarbazina foi o primeiro quimioterápico aprovado pelo FDA para tratamento do melanoma metastático, no entanto, apresenta eficácia limitada, com aumento de sobrevida variando entre

7% a 30% quando em monoterapia durante um ano (SERRONE *et al.*, 2000; AVRIL *et al.*, 2004; TREISMAN; GARLIE, 2010).

Alguns protocolos para tratamento quimioterápico do melanoma metastático consistem de outros fármacos, tais como: nitrosureias (carmustina, lomustina, fotemustina), análogos da platina (cisplatina, carboplatina), as vincas (vimblastina, vincristina, vindesina e vinorelbina) e os taxanos (paclitaxel e docetaxel) (EWEND; CAREY; BREM, 1996; MIDDLETON *et al.*, 2000).

A poliquimioterapia (combinação de fármacos) geralmente resulta em aumento da resposta, que varia entre 30% a 50%. Comumente associa-se dacarbazina e seu análogo temozolomida, com cisplatina, vimblastina e/ou carmustina ou fotemustina. Todavia, vários estudos apontam poucas vantagens da terapia combinada em relação à monoterapia (CHAKRABARTY; GEISSE, 2004; TREISMAN; GARLIE, 2010).

A imunoterapia, que potencializa as respostas celulares contra células tumorais, apresenta-se como uma importante terapia adjuvante no tratamento do melanoma (TREISMAN; GARLIE, 2010). Vários trabalhos têm mostrado significativos resultados antimelanoma, inclusive diminuindo o processo de metástase, quando estimulada a resposta imunológica com agentes sintéticos e ou com as próprias citocinas, sendo as principais a interleucina-2 (IL-2) e a interferona alfa (CHAKRABARTY; GEISSE, 2004; RIKER *et al.*, 2005; KASPER *et al.*, 2007).

No entanto, resultados mais promissores têm sido obtidos quando associados quimioterápicos como dacarbazina com interferona e ou IL-2. Esta combinação entre quimioterápicos e imunomoduladores é denominada de bioquimioterapia, e alguns estudos apontam que aumenta a sobrevida em 15%, assim como aumenta o tempo para remissão do tumor (SAIDA, 2001; KASPER *et al.*, 2007; TREISMAN; GARLIE, 2010).

A identificação de vias moleculares envolvidas na sinalização e regulação do crescimento e metástase do melanoma propiciou o desenvolvimento de novos e potenciais fármacos antimelanoma, tais como: inibidores de tirosina quinase (mesilato de imatiniba, temsirolimos), antiangiogênicos (bevacizumaba - anticorpo monoclonal contra fator de crescimento vascular (VEGF)), indutores de apoptose (oblimersen sódico - anticorpo anti-Bcl-2), potencializadores da resposta imunológica (anticorpos anti-CTLA-4 - intensificam a resposta antitumoral dos linfócitos T), inibidores de proteossoma (bortezomiba),

entre outros (QUEIROLO; ACQUATI, 2006; KASPER *et al.*, 2007; TREISMAN; GARLIE, 2010).

1.3.4 Leucemia

Leucemia é uma doença caracterizada pela proliferação e maturação descontrolada ou pelo aumento expansivo das células progenitoras mieloides ou linfoides da medula óssea (PLASSCHERT *et al.*, 2004; BURKE; STARZELL, 2008). A leucemia é classificada de acordo com a célula primária que a originou e com a progressão da doença: leucemia linfóide aguda (LLA); leucemia linfóide crônica (LLC); leucemia mieloide aguda (LMA) e leucemia mieloide crônica (LMC). A ocorrência de leucemia linfocítica aguda é cinco vezes mais frequente que a leucemia mieloide (BELSON; KINGSLEY; HOLMES, 2007; BURKE; STARZELL, 2008).

Dos cânceres infantis, a leucemia é o tipo mais frequente na maioria das populações, correspondendo entre 25% e 35% de todos os tipos, com exceção da Nigéria, onde esse percentual é de 45%. Conforme dados do INCA para 2011, no Brasil são esperados 10 mil casos novos de leucemia (1,9% em relação aos demais tipos de cânceres), cuja incidência é maior para o sexo masculino (BRASIL/INCA, 2009).

A LLA ocorre frequentemente em crianças, as quais comumente respondem efetivamente ao tratamento, apresentando altas taxas de cura, enquanto que a ocorrência em adultos é menos frequente, porém a remissão após quimioterapia é menor, provavelmente devido à diferença na sensibilidade das células leucêmicas de crianças e adultos à ação dos medicamentos (ZWEIDLER-McKAY; HILDEN, 2008), e também, porque dentre os 20-30% dos adultos apresentam LLA Filadélfia positiva, isto é, tem uma alteração citogenética nos cromossomos BCR e ABL, que determina um pior prognóstico (PULTE; GONDOS; BRENNER, 2009).

A LLA infantil possui bom prognóstico, com 95% de remissão completa após quimioterapia. É mais comum em crianças brancas do que negras e em meninos do que meninas. Os fatores de risco associados ao desenvolvimento de leucemia incluem: radiação ionizante, hidrocarbonetos, pesticidas, álcool, drogas ilícitas, cigarros, infecções e fatores genéticos (BELSON; KINGSLEY; HOLMES, 2007).

A LLA resulta na supressão da hematopoiese, mas também promove alterações em outros órgãos devido à infiltração de blastos, principalmente no fígado, baço, nódulos linfáticos (linfonodos), gônadas, e sistema nervoso central. Os principais sinais e sintomas são: infecções sistêmicas recorrentes, fadiga, febre, equimoses, petéquias, dores nas articulações, inflamação e ulcerações na mucosa oral, e outros sintomas (FADERL; JEHA; KANTARJIAN, 2003; PUI; JEHA, 2007; BURKE; STARTZELL, 2008; ZWEIDLER-McKAY; HILDEN, 2008).

O tratamento da LLA é realizado com diferentes fármacos administrados via oral, intravenoso ou intratecal, em regimes sequenciais de dose e tempo, dividido em quatro fases cujos objetivos são (BURKE; STARTZELL, 2008):

- indução: promover a redução do número de blastos;
- consolidação: promover uma diminuição significativa de blastos e recuperação da medula óssea;
- intensificação: visa atingir as células leucêmicas resistentes;
- manutenção: garantir a remissão da doença.

No Brasil, na década de 1980, deu-se início ao primeiro protocolo brasileiro multicêntrico de tratamento da LLA infantil, baseado no protocolo do Grupo Europeu Berlim-Frankfurt-Münster (BFM) para o tratamento da LLA da criança e do adolescente até 15 anos de idade, formando-se, assim, o Grupo Cooperativo Brasileiro de Tratamento de Leucemia Linfóide Aguda na Infância (GBTLI-LLA-80), e a partir deste, outros protocolos foram estabelecidos, aumentando o percentual de cura para 70-75% e melhorando a qualidade de vida do paciente portador de LLA. Todos estes protocolos adotam como critério de risco, os dados clínico-laboratoriais pré-tratamento, adaptando a intensidade da quimioterapia e da radioterapia aos diferentes grupos, sendo aperfeiçoados continuamente (ELMAN; PINTO-SILVA, 2007).

Dentre os vários fármacos usados, os mais comuns são: ciclofosfamida, citarabina, vincristina, daunorrubicina, doxorrubicina, 6-mercaptopurina, metotrexato, glicocorticoides, e especificamente para adultos, são adicionados os quimioterápicos etoposida e mitoxantrona (FADERL; JEHA; KANTARJIAN, 2003; PLASSCHAERT *et al.*, 2004; BURKE; STARTZELL, 2008; PULTE; GONDOS; BRENNER, 2009).

O maior avanço no tratamento da LLA está relacionado ao uso de terapias desenvolvidas especificamente para interferir nas características moleculares anormais das células neoplásicas, como por exemplo, o fármaco mesilato de imatinibe, um inibidor competitivo de tirosina quinase. Os blastos comumente expressam antígenos específicos, para os quais foram desenvolvidos anticorpos monoclonais como, rituximab

(anti-CD20), gentuzumab (anti-CD33), alemtuzumab (anti-CD52) e epratuzumab (anti-CD22), que estão sendo utilizados em alguns regimes terapêuticos, porém estudos ainda são necessários para estabelecer a associação com os demais quimioterápicos, bem como o tempo e as doses adequadas (VITALE *et al.*, 2006; CRAZZOLARA; BENDALL, 2009).

Pesquisas pré-clínicas e clínicas apontam outros fármacos como promissores na terapêutica antileucêmica, a qual visa atingir diferentes alvos farmacológicos, principalmente de células resistentes aos quimioterápicos. Os fármacos e principais alvos relatados são: inibidores da histona deacetilase (vorinostat, depsipeptida, romidepsina); inibidores da DNA metilase (decitabina); inibidores de treonina e serina quinases relacionadas a sinalização celular, proliferação e proteínas antiapoptóticas (rapamicina); inibidores da enzima farnesil transferase que diminuem a proliferação e aumentam a sensibilidade à apoptose (tipifarniba, lonafarniba); inibidores de proteasoma (bortezomiba), entre outros (CRAZZOLARA; BENDALL, 2009).

Os pacientes idosos apresentam baixa tolerabilidade aos quimioterápicos quando comparados aos pacientes mais jovens, devido às comorbidades e toxicidade dos quimioterápicos, principalmente sobre os sistemas: hepático, cardíaco e hematológico. Os principais efeitos adversos e colaterais são: pancitopenia, desregulação do sistema imune, xerostomia, náuseas, vômitos, edema, supressão do crescimento em crianças, entre outros (PLASSCHAERT *et al.*, 2004).

Muitas células leucêmicas apresentam mecanismos de resistência à ação dos fármacos, e, por isso, apresentam baixa taxa de remissão após quimioterapia, sendo os fatores mais relevantes a idade, a ploidia do DNA e as características imunofenotípicas. Há relatos de resistência para os fármacos dexametasona, prednisolona, citarabina, daunorrubicina e metotrexato (PLASSCHAERT *et al.*, 2004). Os principais mecanismos de resistência são: superexpressão de glicoproteínas transmembranais ATP-dependentes responsáveis pelo efluxo de fármacos; diferença no metabolismo dos fármacos entre crianças e adultos; alta capacidade de se evadir da apoptose induzida por fármacos, que pode ocorrer pela mutação em receptores transmembranais de morte (receptor FAS), ou devido a superexpressão de proteínas antiapoptóticas como as proteínas da família Bcl2 (FADERL; JEHA; KANTARJIAN, 2003; PLASSCHAERT *et al.*, 2004; VITALE *et al.*, 2006).

O metabólito metotrexato poliglutamato é comumente gerado pelo metabolismo de crianças, e em pequena proporção pelo metabolismo de adultos. Esta forma poliglutamato inibe não somente a enzima dihidrofolato redutase, mas também outras enzimas envolvidas na síntese de purinas, além de se acumular intracelularmente, e, por isso, as crianças apresentam menor resistência a este quimioterápico (PLASSCHAERT *et al.*, 2004).

Diante do exposto, as maleimidas, que já possuem comprovada ação antifúngica, antibacteriana, antitumoral, entre outras, são potenciais moléculas para novos ensaios biológicos frente a diferentes linhagens de células tumorais e respectivos mecanismos de ação.

2 METODOLOGIA / RESULTADOS

Os derivados maleimídicos foram sintetizados no NIQFAR (Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas) da Universidade do Vale do Itajaí/SC, e cedidos pelos professores Dra. Fátima de Campus Buzzi e Dr. Valdir Cechinel Filho, conforme metodologia descrita em Cechinel Filho *et al.*, 1998; 2003.

As estruturas químicas dos derivados maleimídicos utilizados nos ensaios biológicos e suas respectivas denominações estão representadas na figura 7.

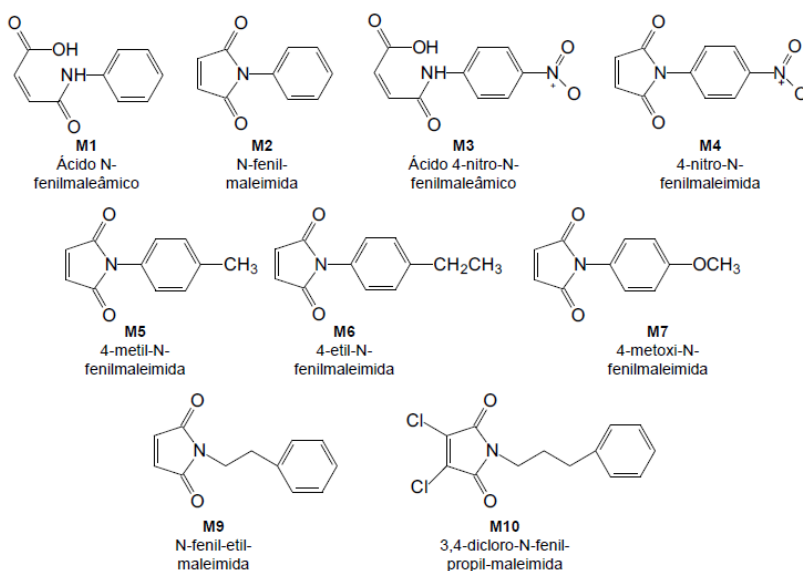


Figura 7: Estrutura química dos derivados maleimídicos.

Fonte: Adaptado de: CECHINEL FILHO *et al.*, 2003.

A metodologia e os resultados estão apresentados no formato de artigos, seguindo as normas de apresentação das revistas, precedidos de objetivos e fluxograma esquemático dos ensaios realizados, e a discussão está apresentada separadamente por artigo, no capítulo 3.

2.1 ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO - PHARMACOLOGICAL REPORTS.

Os objetivos deste trabalho consistiram em:

- avaliar a atividade da enzima mieloperoxidase, presente em homogenato de pulmão, quando incubada com os derivados maleimídicos.

Apenas as maleimidas M2 e M5 induziram a atividade da enzima mieloperoxidase. As demais maleimidas testadas não alteraram a atividade enzimática da mieloperoxidase presente no homogenato de pulmão. Assim, os objetivos citados abaixo referem-se aos testes feitos com as maleimidas M2 e M5.

- avaliar a atividade da enzima mieloperoxidase comercial quando incubada com os derivados maleimídicos;
- avaliar a atividade da enzima mieloperoxidase obtida da lise de cultura primária de neutrófilos, quando incubada com os derivados maleimídicos;
- avaliar a atividade da peroxidase de raiz forte (HRP) comercial quando incubada com os derivados maleimídicos;
- avaliar a atividade “scavenger” de ácido hipocloroso das maleimidas;
- avaliar a atividade da enzima mieloperoxidase obtida da lise de neutrófilos isolados da cavidade “air pouch” de camundongos tratados com os derivados maleimídicos;
- avaliar a migração celular do conteúdo da cavidade “air pouch” de camundongos tratados com os derivados maleimídicos.

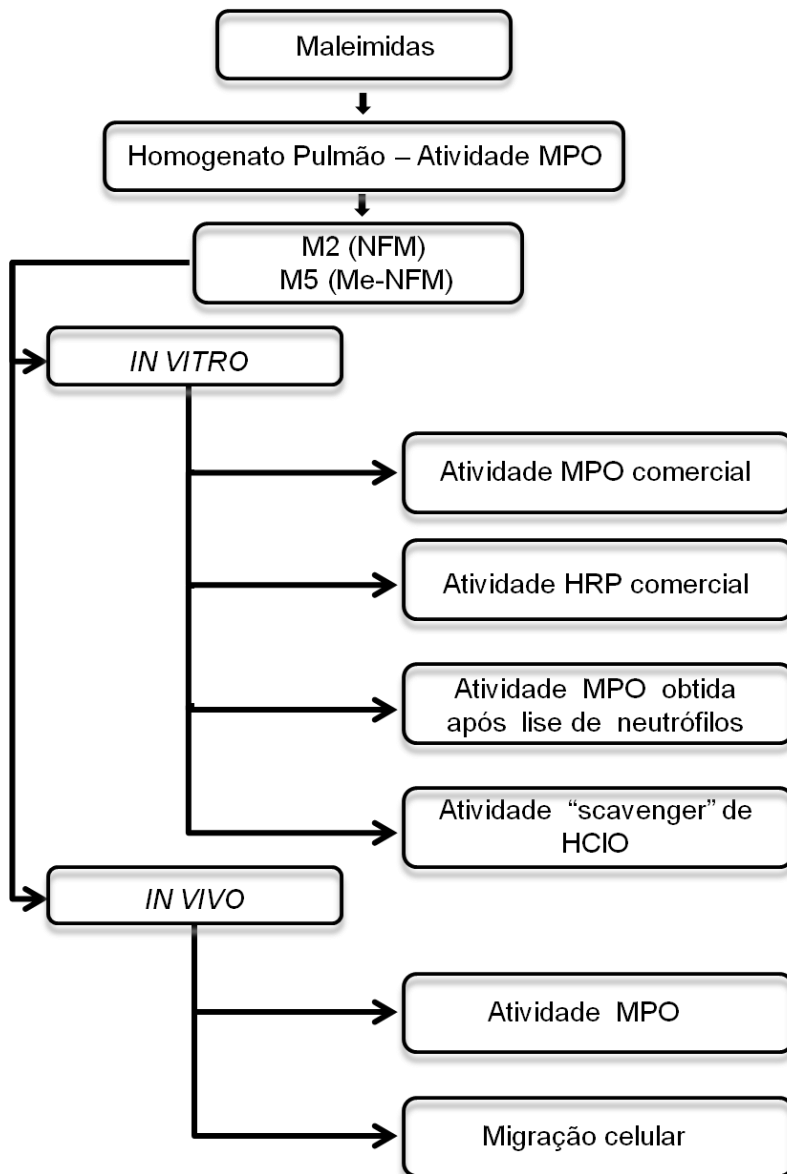


Figura 8: Avaliação da atividade da mieloperoxidase *in vitro* e *in vivo* e atividade “scavenger” dos derivados maleimídicos.

***N*-phenyl-maleimide derivatives as mimetic agents of the pro-inflammatory process: myeloperoxidase activation**

Vânia F. Noldin⁽¹⁾; Silvana V. G. Vigil⁽²⁾; Rafael De Liz⁽²⁾ Valdir Cechinel-Filho⁽³⁾; Tânia S. Fröde⁽²⁾; Tânia B. Creczynski-Pasa^(1,*).

Departamento de Ciências Farmacêuticas (1) e Análises Clínicas (2), Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis - SC, Brazil. (3) Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR), Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALD), 88302-202 Itajaí - SC, Brazil.

Running title: **maleimides as mimetic agents of the pro-inflammatory process**

Abstract:

Myeloperoxidase (MPO) is an important enzyme that catalyzes the reaction between hydrogen peroxide and chloride to generate hypochlorous acid, which oxidizes a range of biomolecules and has been associated with inflammatory diseases. The synthetic compounds *N*-phenyl-maleimide (NFM) and 4-methyl-*N*-phenyl-maleimide (Me-NFM) increased the MPO activity *in vitro* (of isolated enzyme and in isolated cells after animal treatment) and *in vivo* assays. MPO-induction may represent a good model system to investigate the molecular and cellular mechanisms of oxidative cell injury induced by activated neutrophils, and the interactions between damaging species involved in the respiratory burst.

Keywords: *N*-phenyl-maleimides, myeloperoxidase, inflammation, neutrophils, hypochlorous acid.

Abbreviations: ROS - reactive oxygen species, H₂O₂ - hydrogen peroxide, HOCl - hypochlorous acid, MPO - myeloperoxidase, NFM - *N*-phenyl maleimide, Me-NFM - 4-methyl-*N*-phenyl maleimide, HRP - horseradish peroxidase, HBSS - Hank's Buffered Salt Solution, PBS - phosphate buffered saline.

Introduction

Phagocyte white blood cells (neutrophils, monocytes, macrophages and eosinophils) have a crucial role in host defense, since they are highly specialized to carry out phagocytosis and the destruction of foreign microorganisms. The activated neutrophils produce a series of reactive molecules prior to the superoxide anions during the respiratory burst. The superoxide anions are then converted to other reactive oxygen species (ROS), including hydrogen peroxide (H_2O_2), hypochlorous acid (HOCl), hydroxyl radicals ($\bullet\text{OH}$) and singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) [31, 32].

In the neutrophils there are a number of cytotoxic enzymes, in particular myeloperoxidase (MPO), which belongs to a mammalian family of peroxidases, located within azurophilic granules [16, 17]. It is a 140-kDA heme enzyme abundantly expressed in polymorphonuclear cells, accounting for up to 5 % of total cellular protein, released during the phagocytosis [16].

The gene family of mammalian peroxidases includes myeloperoxidase, eosinophil peroxidase, lactoperoxidase, which are present in exocrine secretions and its relationships to host defense mechanisms and human disease, and thyroid peroxidase, which is involved in the thyroid hormone synthesis. These peroxidases are significantly homologous with the fungal chloroperoxidase and the horseradish peroxidase [14].

The peroxidases, mainly the MPO reacts with halide ions (Cl^- , Br^- , I^-) and pseudo-halide thiocyanate ions (SCN^-) to produce hypochlorous acid (HOCl) and their respective hypohalous acids [21].

Hypochlorous acid oxidizes a range of biomolecules, it reacts with nitrogen contained in biological macromolecules, principally amino groups, to form chloramines derivatives that can degrade to aldehydes; with thiols and methionyl residues, nucleotides, unsaturated lipids, amino acids, apolipoproteins and lipoproteins [17, 32].

MPO has been reported to be a relevant factor in tissue injury in many inflammatory processes such as rheumatoid arthritis, arteriosclerosis, cancer, renal and pulmonary disease, neurodegeneration, and vasculitis, as well as organ damage after renal ischemia reperfusion, among others [13, 19, 20, 24]. In contrast, this enzyme is essential to kill microorganisms, it plays a protective role in innate immunity against infectious diseases, and it induces platelet aggregation and detoxification of microbial toxins and is involved in the modulation of cell signaling pathways [2, 17, 18, 19].

Cyclic imides such as *N*-phenyl-maleimides, a type of stable cyclic α,β -unsaturated ketone, are solid yellow compounds, obtained easily through the reaction of maleamic acids and acetic anhydride in a medium containing sodium acetate as a catalytic agent. These maleimides contain an imide ring and a general structure -CO-N(R)-CO- that confers hydrophobic and neutral characteristics. The pharmacological activity of cyclic imides has been reported, including antibacterial, antifungal, antinociceptive, anti-spasmodic and antitumoral [5, 28].

Several types of inflammatory models allow hypothesis testing, including *in vitro* tests with an enzyme, for example MPO, to characterize the role of a range of mediators and cells involved in the inflammatory process and to study new drugs and/or therapeutic strategies for inflammation treatment [12, 22]. In this context, the carrageenan-induced air pouch is a known model of acute inflammation which enables the evaluation of cell migration and pro-inflammatory mediators in cavity lavages [3, 9]. In addition, cell culture and other *in vitro* tests are widely used as models to study induced oxidative stress and the activities of pro-inflammatory enzymes.

In this study we evaluated *N*-phenyl-maleimides as new selective biomarkers to MPO inducer using *in vitro* and *in vivo* experiments.

Materials and Methods

Chemicals

Sodium chloride (NaCl); potassium chloride (KCl); calcium chloride (CaCl₂); potassium phosphate buffer (KH₂PO₄), sodium phosphate buffer (NaH₂PO₄); sodium borohydride; hydrogen peroxide (H₂O₂); sodium hypochlorite (NaOCl); dimethyl sulphoxide (DMSO); ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA) were purchased from Merk, Darmstad, Germany; carrageenan; May-Grünwald-Giemsa stain; Trypan blue, θ -dianisidine, heparin, hexadecyl trimethyl-ammonium bromide (HTMAB); sodium azide, 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), horseradish peroxidase and myeloperoxidase were purchased from Sigma® (St. Louis, MO, USA). All other reagents were of analytical grade. Ultrapure Milli-Q water was used throughout.

Animals

Swiss mice, weighing 18–22 g and male Wistar rats weighing 160–200 g, were housed under standardized conditions (room at constant temperature (25 °C) with alternating 12 h periods of light and darkness and 50-60% humidity) and fed a standard mouse diet with water *ad libitum* before use. All experiments adhered to the guidelines on ethical standards of investigation of experimental procedures in animals [33]. This study was approved by the Committee for Ethics in Animal Research (CEUA) of our university and performed in accordance with the norms of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA), protocol number 23080.007040/2006-39. Efforts were made to reduce the number of animals used.

Drugs

The synthesis of *N*-maleimide and *N*-substituted maleimide was carried out in a previously reported two-step procedure [15]. Reactions of maleic anhydride with the appropriate amine in the presence of glacial acetic acid at room temperature generated the corresponding *N*-substituted maleamic acid. The maleamic acid intermediates were subsequently cyclized to the corresponding *N*-phenyl-maleimides (Fig. 1) by heating in the presence of acetic anhydride containing catalytic amounts of sodium acetate [4].

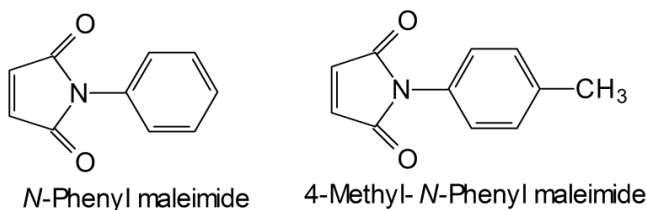


Fig. 1: Structure of maleimides.

The cyclic imides were synthesized at NIQFAR (Universidade do Vale do Itajaí), Itajaí, SC, Brazil), and their structures were confirmed by spectroscopic methods. The compounds were solubilized in DMSO and used at different concentrations, depending on the test. In each case

the effect of the solvent alone was monitored. The solvent did not affect the experimental systems used.

Assay for myeloperoxidase activity – in vitro test

Obtaining of MPO enriched lung homogenate

The lungs were obtained from male Wistar rats. The tissue was homogenized in ice-cold phosphate buffer (50 mM, pH 6.0), containing 0.5% HTMAB and freeze-thawed three times. The samples were centrifuged at 12,000 g at 4 °C for 20 min. The major peroxidase activity in the supernatant is mainly of the MPO, although other peroxidases such eosinophil peroxidase may be present [22, 23, 29].

Enzyme assay

The reaction medium containing 50 mM NaH_2PO_4 at 25 °C, 0.167 mg/ml θ -dianisidine-2HCl, and 0.005% H_2O_2 with or without increasing concentrations of maleimides. The reaction was started by the addition of the supernatant containing MPO (4 mg protein/ml). Sodium azide (250 μM) was used as a control that run in parallel with the experiments, inhibiting completely the activity. The activity was determined by the slope of the absorption curve set at 450 nm. The same procedure was performed to evaluate the effect of both maleimides on commercial purified MPO activity as well as to build an analytical curve of MPO activity [25, 29].

Hypochlorous acid scavenging activity

Preparation of hypochlorous acid

The HOCl (70 μM) was prepared immediately before use by adjusting a solution of NaOCl to pH 6.6 with KH_2PO_4 (50 mM). The concentration of HOCl was further determined spectrophotometrically at 290 nm using the molar absorption coefficient of $350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [6].

Preparation of 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB)

TNB was prepared according to a previously described procedure [6]. Briefly, to a 1 mM solution of DTNB in 50 mM potassium phosphate

buffer (pH 6.6), containing 5 mM EDTA, 20 mM sodium borohydride was added. The resulting solution was incubated at 37 °C for 30 min. The concentration of TNB was determined by measuring the absorbance at 412 nm using the molar absorption coefficient of $13.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Hypochlorous acid scavenging assay

The assay was performed at room temperature in a cuvette containing a $70 \mu\text{M}$ TNB solution, with or without *N*-phenyl maleimides (0-100 μM). The absorbance was measured at 412 nm before and 5 min after the addition of HOCl (25 μM).

Myeloperoxidase activity induction in isolated neutrophils

Isolation of Neutrophil

Neutrophils were isolated, at room temperature, after washing the exudate dorsal skin (induced air pouch cavity) of six non treated animals with 1.0 ml of sterile PBS. The isolated neutrophils were resuspended in HBSS, pH 7.35, containing 1.6 mM CaCl_2 . The viability of neutrophils in the cell preparations was considered 95%, determined by the Trypan blue method.

Induction of MPO

Neutrophils (1×10^6) were incubated with HBSS in 24-well microplates without compounds for 1.3 h, and were maintained at 37 °C in a 5% CO_2 humidified atmosphere. Briefly, increasing concentrations of the compounds (25-100 μM) dissolved in DMSO (0.01% final concentration) were added and diluted with HBSS followed by incubation for 1 h. The detergent hexadecyl trimethyl-ammonium bromide (HTMAB – 0.5 %) was used to lyse the cells to release MPO. The enzyme activity was determined by the 3,3-dimethoxybenzidine (θ -dianisidine) oxidation method monitored at 450nm. The method consists of the addition of θ -dianisidine (0.125 mg/ml) and H_2O_2 (0.001%) dissolved in phosphate buffer (pH 6.2) and incubation for 15 min at 37°C. The reactions were stopped by adding 1% sodium azide solution and the plates were centrifuged at 258 g for 10 min at room temperature. The myeloperoxidase activity was expressed as percent of oxidation θ -dianisidine / 1×10^6 cells [11, 30].

Assay for leukocyte migration, exudation, and myeloperoxidase activity – in vivo test

Experimental protocol

In this experimental protocol, different groups of animals received air injection on three alternate days to induce the air pouch. On the sixth day the animals received carrageenan (Cg: 1%) by subcutaneous route (s.c.) and 24 h later the animals were sacrificed by ether overdose [3]. The animals were fixed onto a surgery table and an incision in the dorsal skin was made perforating the air pouch. The cavity was washed with sterile PBS (pH 7.6, composition mmol: NaCl 137, KCl 2.7 and phosphate buffer salts 10) containing heparin (20 IU/ml) [3]. In this protocol a dose-response assay was carried out.

Different animal groups were treated (0.5 h before Cg) with different doses of Me-NFM (100-400 μ M) administered by intraperitoneal route (i.p.). Another group of animals received NFM (100-400 μ M, i.p.) also administered 0.5 h before Cg. The leukocyte migration as well as MPO activity, were analyzed 24 h after carrageenan injection. In summary the animals were equally divided in four experimental groups as following: Group 1: positive control group: animals treated only with carrageenan (Cg 1%), Group 2: negative control group: animals treated only with sterile saline (NACl 0.95%), Group 3: animals treated with Me-NFM plus Cg, Group 4- animals treated with NFM plus Cg.

Quantification of leukocyte migration

After killing the animals, samples of the air pouch cavity fluid were collected to determine the total and differential leukocyte contents. Total leukocyte counts were determined in a Newbauer chamber, and cytopsin preparations of exudates were stained with May-Grünwald-Giemsa for the differential count, which was performed with an optical microscope under an oil immersion objective and 100 x magnifications [10].

Quantification of myeloperoxidase activity

In-house assays of both myeloperoxidase were employed according to the methods developed by Rao et al. [22]. Using conventional reagents, the concentration of each enzyme was estimated by means of

colorimetric measurements (absorbance of 450 nm) in an ELISA plate reader (Organon Teknika, Roseland, NJ, USA). One unit of MPO is defined as the activity of the enzyme that oxidizes 1 mol of H₂O₂/min. The results were expressed as mU/ml (MPO). Detailed descriptions of these assays have been published previously [11].

Statistical analysis

All results are the mean \pm S.E.M. All statistical tests were performed using Instat® version V2.05a, and the statistical significance was assessed by using ANOVA followed by the Dunnett's test. When necessary we also used the Student's *t* test for the *in vivo* assay. P values < 0.05 were considered to be significant.

Results

The compound Me-NFM significantly induced an increase of MPO activity, whose results of the kinetic curve are presented in the figure 2A. This assay was carried out with the supernatant obtained from lung homogenate. The activation was significant only above 75 μ M. The NFM maleimide also promoted the enzyme activation, although this result was not statically significant (data not shown). In this assay, the Me-NFM increased effectively the MPO activity in a concentration-dependent manner ($K_{0.5}$ 84 \pm 0.3 μ M), showing a maximum induction (85 %) at 100 μ M.

The Me-NFM also induced an increase in activity of the purified MPO obtained commercially. The effect was significantly from 50 μ M (Fig. 2B). The activity increase was concentration-dependent and a $K_{0.5}$ of 62.85 \pm 3.52 μ M was obtained and showing a maximum induction (45%) at 100 μ M. The results obtained with NFM were significant only with concentrations above 75 μ M (data not shown).

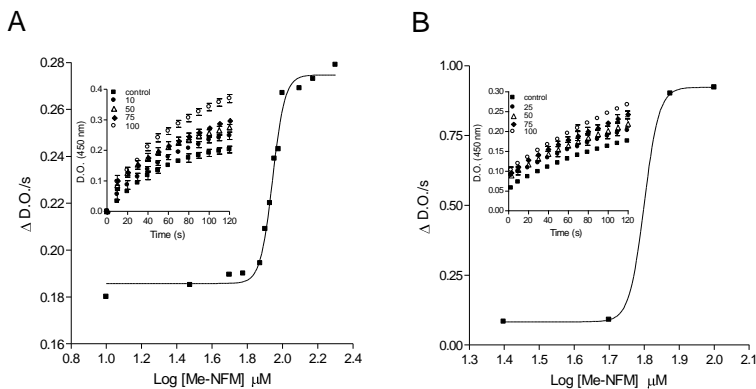


Fig. 2: Effect of Me-NFM maleimide on MPO activity. A – Enzyme obtained from the lung supernatant, B – Enzyme obtained commercially. The enzyme activities were measured spectrophotometrically following the oxidation of θ -dianisidine by hypohalous acids produced by the enzymes. The values of the enzyme activities were calculated from the slope of the curves shown in the inset. Optical density of control groups was taken as 100% of oxidation of θ -dianisidine. Data are presented as mean \pm S.E.M. of three identical experiments performed in triplicate.

Both maleimides also promoted a significant increase ($\sim 30\%$) in horseradish peroxidase (HRP) activity tested up to 100 μM – (data not shown). Although with concentrations of maleimides higher than 50 μM the HRP activity was drastically inhibited. This assay was accomplished to analyze the selectivity of the maleimides.

In figure 3 are presented the poor HOCl scavenge activity of the compounds. They were tested up to 100 μM and in this condition the compounds were not able to scavenge significantly the reactive specie.

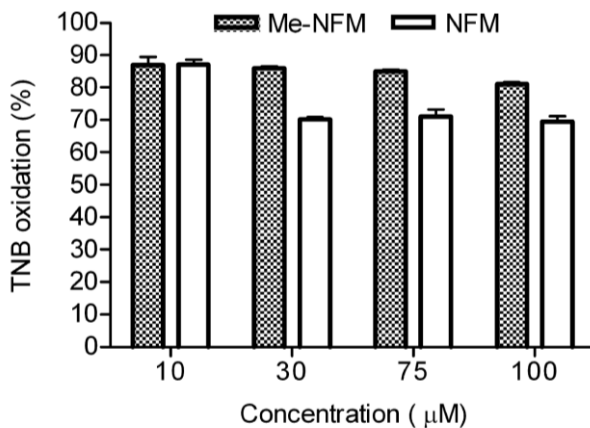


Fig. 3: Effect of Me-NFM and NFM maleimide on the oxidation of TNB into DTNB by HOCl. The assay was monitored spectrophotometrically at 412 nm. The amount of TNB unchanged after incubation was calculated and expressed as percentage of the initial value. Data are presented as mean \pm S.E.M. of three identical experiments performed in triplicate.

The Me-NFM and also the NFM, caused a significant increase in myeloperoxidase activity at the concentrations studied (50 to 100 μ M) when neutrophils were incubated with the compounds for 1 hour at 37 $^{\circ}$ C in a 5% CO₂ humidified atmosphere (Fig. 4).

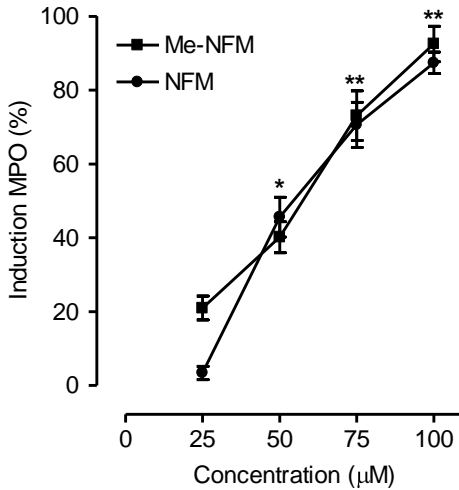


Fig. 4: Effect of Me-NFM and NFM maleimide on MPO activity after neutrophil lysing obtained from mouse air pouch model. The enzyme activity was measured spectrophotometrically following the oxidation of θ -dianisidine by HOCl produced by the enzyme. Optical density of control groups was taken as 100% of oxidation of θ -dianisidine. Data are presented as mean \pm S.E.M. of three identical experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$, compared to control groups, using ANOVA followed by the Dunnett's test.

Furthermore, Me-NFM caused a significant increase of both total and differential leukocytes migration and MPO activity (in vitro and in vivo assays).

In the inflamed animals with carrageenan and pretreated with 4-methyl-N-phenyl-maleimide (Me-NFM) (100-400 μ M) we observed an effective increase of leukocyte migration into the air pouch cavity from 44.2 ± 3.6 to $47.5 \pm 8.6\%$ ($p < 0.01$), neutrophils from 26.6 ± 8.1 to $32.7 \pm 11.0\%$ ($p < 0.05$), and mononuclear cells from 130.1 ± 37.1 to $147.7 \pm 14.8\%$ ($p < 0.01$) in comparison with positive control group (animals treated only with carrageenan) (Fig. 5).

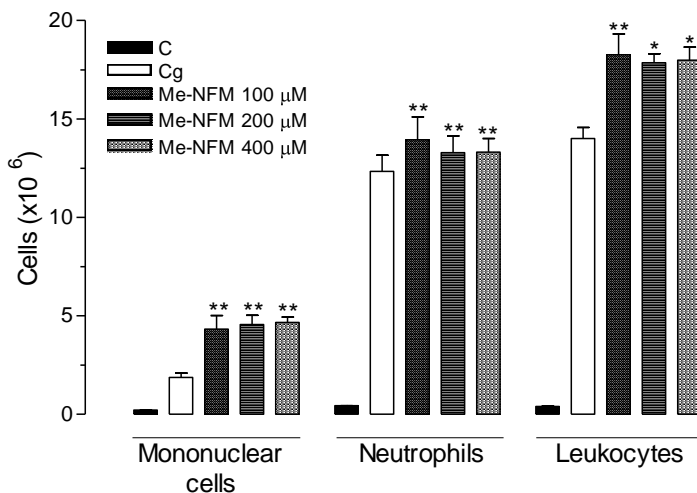


Fig. 5: Effect of Me-NFM maleimide (100 to 400 μ M) on leukocyte migration in the mouse air pouch model. The compound was administered to different groups of animals 0.5 h before the inflammation induction by carrageenan (1%). C = response in animals treated only with sterile saline (NaCl 0.9 %). Cg = response in animals treated only with carrageenan. N = 5 animals. Data are presented as mean \pm S.E.M. of three identical experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, compared to control groups, using ANOVA followed by the Dunnett's test or Student's *t* tests.

On the other hand, the inflamed animals pretreated with N-phenyl-maleimide (NFM) at the same doses did not modify leukocyte migration in the case of neutrophils or mononuclear cells when compared with positive control group ($p > 0.05$) (data not shown).

Additionally, inflamed animals pretreated with Me-NFM maleimide at a dose of 200 μ M also suffer a significant enhancement of myeloperoxidase activity (~ 22 %) ($p < 0.01$) (Fig. 6). On the other hand inflamed animals pretreated with NFM at the same doses did not modify this inflammatory parameter ($p > 0.05$) (results not shown).

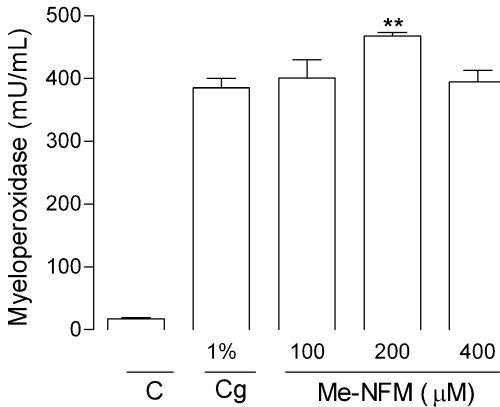


Fig. 6: Effect of different concentrations of Me-NFM on myeloperoxidase activity of neutrophils in a mouse air pouch model compared with carrageenan-only control. The enzyme activity was measured spectrophotometrically following the oxidation of θ -dianisidine by HOCl produced by the enzyme. Optical density of control groups was taken as 100% of oxidation of θ -dianisidine. Data are presented as mean \pm S.E.M. of six identical experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, compared to control groups, using ANOVA followed by the Dunnett's test.

Discussion

Many *in vivo* and *in vitro* experiments are used to investigate the role of neutrophils in the inflammatory process, especially in relation to MPO activity. The ability to isolate murine neutrophils permits the search for new drugs with anti-inflammatory activity or new pharmacological tools to study the inflammatory process [7]. In this study, the activation of MPO enzyme was observed in the assay with isolated enzyme and that one obtained from lung supernatant (Figs. 2A and 2B). The values of $K_{0.5}$ were $62.85 \pm 3.52 \mu\text{M}$ and $84 \pm 0.3 \mu\text{M}$ respectively for Me-NFM. The values of $K_{0.5}$ probably differ because in the supernatant there are other proteins.

The compounds were also tested for their capability to scavenge HOCl showing very low reactivity with the reactive species. If the compounds were HOCl scavengers they could somehow change the reaction equilibrium of the enzyme.

In primary culture, when neutrophils were treated for 1 hour with Me-NFM. The total cellular MPO activity was determined in 1×10^6 neutrophils lysed with HTMAB plus θ -dianisidine and H_2O_2 as the colorimetric agent for detection spectrophotometrically (Fig. 4). In this case the compounds showed similar performance in terms of MPO induction: Me-NFM $K_{0.5} = 54.47 \mu M$ and NFM $K_{0.5} = 58.9 \mu M$.

The actions involving MPO activity were studied, in particular the inhibition of the enzyme as a potential target for the discovery of new drugs for anti-inflammatory therapies, since MPO-mediated damage is not limited to intraphagosomal microbes, but can trigger a variety of inflammatory diseases [2, 17, 26, 32].

The MPO released has been shown to be important in the leukocyte activation prior to neutrophils and adhesion molecules [8, 26]. MPO has also been described as an activator of a complement system [20]. Many authors suggest that complete and partial myeloperoxidase deficiency is strongly associated with a high number of infections and cancer risk. MPO deficiency is a rare event, but humans in this condition have an increased susceptibility to systemic vasculitis [1] and infectious diseases.

HOCl is known for its ability to modify various molecules via chlorination. It is responsible for the sulfhydryl oxidation of plasma membrane proteins, inactivates α_1 -antiprotease, activates collagenase, and depletes antioxidant substances [17].

MPO catalyzes the reaction of HOCl formation, a powerful oxidant agent, and it is the major antimicrobial component contained in neutrophils. The induction of MPO activity could be applied to support therapies, to enhance the efficacy of the microbicidal drugs. Therefore, is the induction or inhibition of MPO-activity good or bad? Although the MPO enzyme plays an important role in the body's defense mechanism, the main results of its activity are harmful to the human organism. In this case, MPO-induction may represent a good model system to investigate the molecular and cellular mechanisms of oxidative cell injury, induced by activated neutrophils, and the interactions between damaging species involved in the respiratory burst. The phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) is used to stimulate neutrophils and degranulation of specific granules *in vivo* and *in vitro*

tests, and the *N*-phenyl-maleimide substances are a good alternative to enhance the activity of MPO, to simulate conditions of inflammation and sepsis.

N-phenyl-maleimide appears to be a promising pharmacological tool to study new strategies for therapeutic interventions modulating the activity of MPO at different points: MPO active site blocking, irreversible inhibition through the use of oxidized inhibitors, and application of HOCl scavengers to prevent initiation and propagation of diseases triggered by this activation.

In vivo, the air pouch model of acute inflammation has been widely used to test the efficacy of anti-inflammatory drugs and the factors involved in inflammation due to a significant enhancement of neutrophils 24 h after carrageenan administration in the air pouch in mice. This inflammation model mimics the inflammatory response that occurs in patients with rheumatoid arthritis, an important inflammatory and chronic disease [27].

The enhancement of myeloperoxidase levels is observed in the first phase of the inflammatory reaction in the animal inflammation models, such as pleurisy and air pouch, and the myeloperoxidase levels are well correlated with neutrophil influx [3, 11].

In conclusion, the mechanism of MPO activation by *N*-phenyl-maleimides is still a matter to be studied, however they are good candidates as a pharmacological tool to study inflammatory reactions in animal inflammation models and *in vitro* tests, since the quantization of MPO mass and its activity, as well as analysis of its derivatives (MPO-biomarkers), enables the discovery of new strategies for the treatment of inflammatory processes. In addition to gaining a better understanding of the action of MPO and its effect on the body, its monitoring may serve as a prognosis of disease progression.

Acknowledgements

This study was supported by grants from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FAPESC (Fundação de Amparo à Pesquisa de Santa Catarina). This paper forms part of the doctoral studies of Vânia F. Noldin on the Pharmacy post-graduation course/UFSC.

References

1. Abdulahad WH, Stegeman CA, Kallenberg CG: The role of CD4⁽⁺⁾ T cells in ANCA-associated systemic vasculitis. *Nephrology*, 2009, 14, 26-32.
2. Aratani Y: Role of myeloperoxidase in the host defense against fungal infection. *Jpn J Med Mycol*, 2006, 47, 195-199.
3. Benincá JP, Montanher AB, Zucolotto SM, Schenkel EP, Fröde TS: Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Passiflora edulis*. *Food Chem*, 2007, 104, 1097-1115.
4. Cechinel Filho V, Pinheiro T, Nunes RJ, Yunes RA, Cruz AB, Moretto E: Antibacterial activity of *N*-phenylmaleimides and related compounds. Structure-activity relationships. *Farmaco*, 1994, 49, 675-677.
5. Cechinel Filho V, Campos F, Corrêa R, Nunes JR, Yunes RA: Aspectos químicos e potencial terapêutico de imidas cíclicas: uma revisão da literatura. *Quim Nova*, 2003, 26, 230-241.
6. Ching TL, De Jong J, Bast A: A method for screening hypochlorous acid scavengers by inhibition of the oxidation of 5-thio-2-nitrobenzoic acid: application to anti-asthmatic drugs. *Anal Biochem*, 1994, 218, 377-381.
7. Cotter MJ, Norman KE, Hellewell PG, Ridger VC: A novel method for isolation of neutrophils from murine blood using negative immunomagnetic separation. *Am J Pathol*, 2001, 159, 473-481.
8. Dale DC, Boxer L, Liles WC: The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood*, 2008, 112, 935-945.
9. Delano DL, Montesinos MC, D'eustachio P, Wiltshire T, Cronstein B: An interaction between genetic factors and gender determines the magnitude of the inflammatory response in the mouse air pouch model of acute inflammation. *Inflammation*, 2005, 29, 1-7.
10. Saleh TS, Calixto JB, Medeiros YS. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. *Br J Pharmacol*, 1996, 118(3), 811-819.

11. Fröde TS, Medeiros YS: Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Mediators Inflamm*, 2001, 10, 223-227.
12. Saleh TS, Calixto JB, Medeiros YS. Effects of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. *Peptides*. 1999, 20(8), 949-956.
13. Hansson M, Olsson I, Nauseef WM: Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Archs of Biochem Biophys*, 2006, 445, 214-224.
14. Henderson JP, Heinecke JW: Myeloperoxidase and eosinophil peroxidase: phagocyte enzymes for halogenation in humans. *The Handbook of Environmental Chemistry*, 2003, 3, 201-214.
15. Kalgutkar AS, Crews BC, Marnett LJ: Design, synthesis, and biochemical evaluation of *N*-Substituted maleimides as inhibitors of prostaglandin endoperoxide synthases. *J Med Chem*, 1996, 39, 1692-1703.
16. Klebanoff SJ: Myeloperoxidase. *Proc Assoc Am Physicians*, 1999, 111, 383-389.
17. Klebanoff SJ: Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol*, 2005, 77, 598-625.
18. Knaapen AM, Güngör N, Schins RPF, Borm PJ, Schooten FJV: Neutrophils and respiratory tract DNA damage and mutagenesis: a review. *Mutagenesis*, 2006, 21, 225-236.
19. Lau D, Mollnau H, Eiserich JP, Freeman BA, Daiber A, Gehling UM, Brümer J, Rudolph V, Münzel T, Heitzer T, Meinertz T, Baldus S: Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/Cd18 integrins. *PNAS*, 2005, 103, 431-436.
20. Matthijsen RA, Huugen D, Hoebers NT, Vries B, Peutz-Kootstra CJ, Aratani Y, Daha MR, Tervaert JWC, Buurman WA, Heeringa P: Myeloperoxidase is critically involved in the induction of organ damage after renal ischemia reperfusion. *Am J Pathol*, 2007, 171, 1743-1752.

21. Panasenki OM, Vakhrusheva T, Tretyakov V, Spalteholz H, Arnhold J: Influence of chloride on modification of unsaturated phosphatidylcholines by the myeloperoxidase/hydrogen peroxide/bromide system. *Chem Phys Lipids*, 2007, 149, 40-51.
22. Rao TA, Currie JL, Shaffer AF, Isakson PC: Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. *Inflammation*, 1993, 17, 723-741.
23. Rao TS, Yu SS, Djuric SW, Isakon PC: Phorbol ester-induced dermal inflammation in mice: evaluation of inhibitors of 5-lipoxygenase and antagonists of leukotriene B4 receptor. *J Lipid Mediat Cell Signal*, 1994, 10, 213-228.
24. Reynolds WF, Stegeman CA, Tervaert JWC: -463 G/A myeloperoxidase promoter polymorphism is associated with clinical manifestations and the course of disease in MPO-ANCA-associated vasculitis. *Clin Immunol*, 2002, 103, 154-160.
25. Rosso R, Vieira TO, Leal PC, Nunes RJ, Yunes RA, Creczynski-Pasa TB: Relation between the lipophilicity of gallic acid N-alkyl esters' derivatives and both myeloperoxidase activity and HOCl scavenging. *Bioorg Med Chem*, 2006, 14, 6409-6413.
26. Schmid-Schönbein GW: Analysis of Inflammation. *Ann Rev Biomed Eng*, 2006, 8, 93-151.
27. Sedgwick AD, Lees P: Studies of eicosanoid production in the air pouch model of synovial inflammation. *Agents Actions*, 1986, 18, 429-438.
28. Sortino S, Cechinel Filho V, Corrêa R, Zacchino S: N-Phenyl and N-phenylalkyl-maleimides acting against *Candida* spp.: Time-to-kill, stability, interaction with maleamic acids. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16, 560-568.
29. Teixeira A, Morfim MP, Cordova CAS, Charão CCT, Lima VR, Creczynski-Pasa TB: Melatonin protects against pro-oxidant enzymes and reduces lipid peroxidation in distinct membranes induced by the hydroxyl and ascorbyl radicals and by peroxynitrite. *J Pineal Res*, 2003, 35, 262-268.

30. Tithof PK, Olivero J, Ruehle K, Ganey PE: Activation of neutrophil calcium-dependent and -independent phospholipases A₂ by organochlorine compounds. *Toxicol Sci*, 2000, 53, 40-47.
31. Vissers MC, Winterbourn CC: Myeloperoxidase-dependent oxidative inactivation of neutrophil neutral proteinases and microbicidal enzymes. *Biochem J*, 1987, 245, 277-280.
32. Winterbourn CC, Hampton MB, Livesey JH, Kettle AJ: Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome: implications for microbial killing. *J Biol Chem*, 2006, 281, 39860-39869.
33. Zimmermann M: Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, 1983, 16, 109-110.

2.2 ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA CANCER CHEMOTHERAPY & PHARMACOLOGY

Os objetivos deste trabalho consistiram em:

- avaliar a citotoxicidade das maleimidias frente a células B16F10 pelo método MTT. As maleimidias que apresentaram citotoxicidade, e concentrações inibitórias baixas, foram selecionadas para os testes *in vivo* e para avaliação do potencial mitocondrial.
- avaliar o potencial mitocondrial através de método fluorimétrico utilizando a sonda JC-1.

Os derivados maleimídicos selecionados para os testes *in vivo* foram avaliados quanto à atividade antitumoral, em modelo de melanoma subcutâneo em camundongos, e toxicidade *in vivo* e em homogenato de fígado.

- quantificar macroscopicamente o número de animais que desenvolveram tumor subcutâneo e metástase pulmonar e mesentérica;
- avaliar o tamanho do tumor através do paquímetro digital;
- avaliar microscopicamente a metástase pulmonar e mesentérica;
- avaliar macroscopicamente os órgãos em relação à cor e tamanho;
- avaliar microscopicamente os órgãos;
- avaliar parâmetros bioquímicos e hematológicos de sangue periférico;
- avaliar parâmetros biométricos;
- avaliar parâmetros relacionados ao estresse oxidativo (TBARS e concentração de GSH) em homogenato de fígado.

A avaliação dos parâmetros de toxicidade foi realizado em camundongos tratados com maleimidias e comparados com os grupos controles tanto nos animais portadores de tumor como em animais apenas tratados com as substâncias analisadas, mas que não eram portadores de melanoma cutâneo.

Foram avaliados parâmetros hematológicos, visto que, a maioria dos quimioterápicos desencadeia leucopenia e anemia; parâmetros bioquímicos, como as transaminases e creatinina, a fim de analisar em especial a função hepática e renal, cujos órgãos são os mais lesados durante a quimioterapia; parâmetros biométricos, como a variação de peso, já que muitos quimioterápicos desencadeiam distúrbios gastrintestinais, causando acentuada perda de peso.

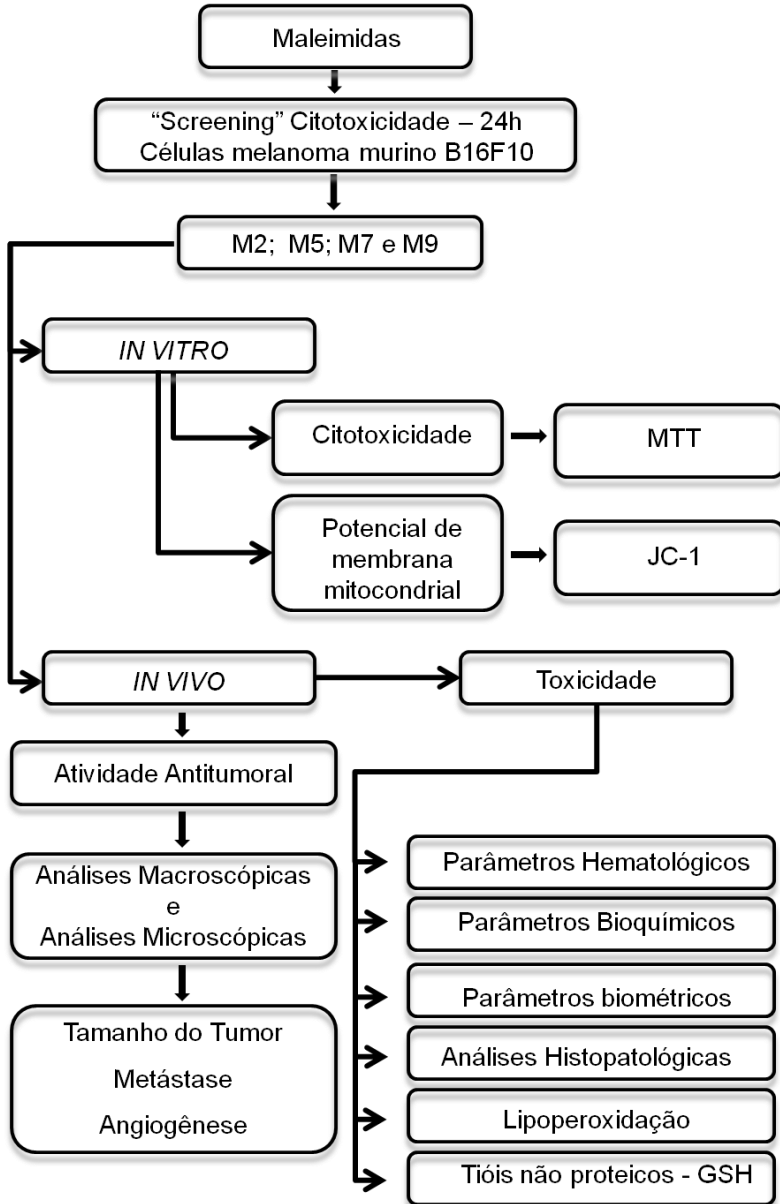


Figura 9: Avaliação da atividade antitumoral e toxicidade dos derivados maleimídicos em camundongos com melanoma subcutâneo (células B16F10).

Antitumoral activity, oxidative stress induction and toxicity of maleimide derivatives in a preclinical melanoma mouse model

Vânia Floriani Noldin^{a,b}, Claudriana Locatelli^{a,b}, Clarissa Amorim Silva de Cordova^a, Angelo Tadeu Noldin^b, Francieli Vanzin^b, Jamim Dajal Faé^b, Fátima Campus-Buzzi^c, Celso Pilati^d, Valdir Cechinel-Filho^c, Tânia Beatriz. Creczynski-Pasa^{a,*}.

^a Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

^b Curso de Farmácia, Universidade do Contestado, Campus Canoinhas, Canoinhas, SC, Brazil.

^c Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR), Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), Itajaí - SC, Brazil.

^d Departamento de Medicina Veterinária, Universidade do Estado de Santa Catarina, Campus Universitário de Lages, Lages, SC, Brazil

Running title: Antimelanoma activity of maleimide derivatives

* Correspondence to: Tânia B. Creczynski-Pasa Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900, CP 476 Florianópolis, SC, Brazil. Tel: + 55 48 3331 8057; fax: + 55 48 33319542; e-mail: taniac@mbox1.ufsc.br

Abstract

Purpose The maleimide derivatives (*N*-phenyl-maleimide (M2), 4-methyl-*N*-phenyl-maleimide (M5), 4-methoxy-*N*-phenyl-maleimide (M7), *N*-phenyl-ethyl-maleimide (M9)) were assessed to evaluate the cytotoxicity against B16F10 cells, and the antitumoral and antimetastatic activity, and parameters of toxicity on mice implanted subcutaneously with B16F10 melanoma cells.

Methods The cell viability was evaluated by MTT and the mitochondrial membrane potential was analyzed by fluorescence in a spectrofluorometer. *In vivo*, we evaluated the growth and persistence of solid tumors, lung metastasis, mesentery metastasis by macroscopic and microscopic analysis. The blood was collected from the ocular puncture vein for hematological and biochemical analysis. The liver homogenates were assayed according to assay protocol to analysis of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and non-protein thiol substances (NPSH).

Results The maleimides derivatives reduced the number of lung metastasis and inhibited tumor growth. The treatments with M5 and M7 showed low toxicity because minor alterations in hematological and biochemical parameters were observed, and only the treatment with M9 promoted intense oxidative stress as well as alterations in limited numbers of hepatic enzymes. The effects of maleimides shown in this work can be related to their chemical structure, principally by the proximity between the imide and aromatic rings, and the neutrophilic characteristics of the substituent groups on the aromatic ring, which can modify their lipophilic properties.

Conclusions These preclinical results suggest that treatments with M5 and M7 may be effective against melanoma.

Keywords: melanoma, antimetastatic, antitumor, maleimides, oxidative stress, subcutaneous tumor, tumor growth.

Introduction

Melanoma is a malignant tumor of melanocytes that predominantly occurs in the skin of Caucasians worldwide. Primary melanoma, once detected, should be surgically removed, and chemotherapy and radical regional lymphadenectomy should focus on metastasis control [1-2]. The leading cause of death in advanced melanoma patients is the formation of metastasis at distant sites. The most frequent metastasis sites for melanoma are the small bowel, liver, bone, brain and lung [2-3]. An evidence-based overview has shown that dacarbazine in monotherapy is the least harmful treatment against melanoma [4].

The alkaloid phyllanthimide isolated from leaves of *Phyllanthus sellowianus* (Euphorbiaceae) has been used as a precursor for the synthesis of cyclic imide analogues [5]. Cyclic imides are organic compounds formed by the group CO-N(R)-CO, R being a hydrogen atom from the alkyl or aryl group, which confers potential biological activity and pharmaceutical applications [6]. Some of these effects appear to be related to the size and electrophilic characteristics of the substituent groups on the imide ring, which can modify their steric properties. The maleimides contain an imide ring that confers hydrophobicity and neutral characteristics to the molecules [7].

The literature contains several studies on the antitumor potential of maleimides. The antiproliferative activity of a series of heteroarylmaleimides and polyheterocondensed imides was tested against human tumor cells (NCI-H460 lung carcinoma), and the IC₅₀ values obtained ranged from 0.84 to 9 μ M [8]. A series of 7-azaindazolyl-indolyl-maleimides and arylmaleimide derivatives showed cytotoxicity and antiproliferative effects in vitro against various human cancer cell lines. These works also show moderate protein kinase C inhibitory activity and the possible involvement of the mitochondrial-mediated pathway of apoptosis in the antiproliferative activity of some maleimides on KB cells [9-11].

However, maleimides have never been studied against melanoma in vivo. Therefore, we evaluated the antitumor activity and toxicity of four maleimides: *N*-phenyl-maleimide (M2), 4-methyl-*N*-phenyl-maleimide (M5), 4-methoxy-*N*-phenyl-maleimide (M7), and *N*-phenyl-ethyl-maleimide (M9) (Fig. 1) in preclinical melanoma mouse model.

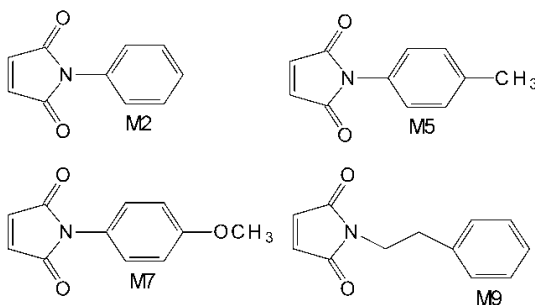


Fig. 1 Chemical structure of maleimides

Materials and methods

The cell culture media, serum and antibiotics were purchased from GIBCO (São Paulo, Brazil). Dimethyl sulfoxide (DMSO) and ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA) were purchased from Merk (Darmstad, Germany). JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolocarboyanine iodide) was purchased from Invitrogen. HEPES [N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)] sodium salt, Trypan blue, MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide], trypsin, DTNB [5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)], and TBA (thiobarbituric acid) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), and all reagents were commercial products of the highest available purity.

Drugs

The four maleimides employed were synthesized at NIQFAR - University of Itajaí Valle, Itajaí, SC, Brazil. Their structures were confirmed by spectroscopic methods [6, 12]. The synthesis of the *N*-substituted maleimide derivatives was achieved by the reaction of maleic anhydride with the appropriate amine in the presence of glacial acetic acid at room temperature, which generated the corresponding *N*-substituted maleamic acids. The maleamic acid intermediates were subsequently cyclized to the corresponding *N*-arylmaleimides by heating in the presence of acetic anhydride containing catalytic amounts of sodium acetate [12-13].

The compounds were solubilized in DMSO and used in different concentrations. Controls were run in parallel to monitor the possible interference of DMSO with the assays. The final DMSO concentration was 0.1% in the *in vitro* assays and 2% in the *in vivo* assays. In these conditions, the solvent did not interfere with the assays.

Tumor cell line

Tumor cell line of B16F10 murine melanoma was acquired from ATCC, Manassas, VA. The cells were cultivated in cell culture flasks of 75 cm² in DMEM supplemented with 10% of inactive fetal bovine serum, 100U/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin and 10mM HEPES (pH 7.4). Every 2-3 days, cells were passaged by removing 90% of the supernatant and replacing it with the fresh medium. The cells were cultured in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37 °C and then harvested with trypsin:EDTA (0.05:0.03 w/v) solution.

In vitro model

Evaluation of cytotoxicity

The cell viability with or without the compounds was measured by MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], a colorimetric assay [14]. The B16F10 cells were incubated for 24, 48 and 72 h in 96-microwell plates (at a density of 3×10^4 , 1.5×10^4 and 1×10^4 cells/0.2 ml, respectively) with maleimides in a concentration range of 1 to 100 µM. Next, the cells were carefully washed, and a MTT solution prepared in fresh medium was added and further incubated for 2 h at 37 °C and 5% CO₂. The medium was removed, and DMSO was added to dissolve the crystalline formazan formed. The number of living cells is directly proportional to the intensity of the blue solution formed, which is quantitatively measured by a microplate reader at 550 nm wavelength. The results were expressed as a percentage of the absorbance of the control. Cell viability of the control cells corresponds to 100%, and half of the inhibitory concentration is called IC₅₀. All experiments were performed in triplicate.

Mitochondrial potential measurements

To explore the effect of maleimides on the mitochondrial membrane potential, the lipophilic cationic probe fluorochrome 5,58,6,68-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1) was used. JC-1 is a green fluorescent monomer at depolarized membrane potentials or a red fluorescent J-aggregate at hyperpolarized membrane potentials. Cells were plated at 5×10^5 cells/well in 24-well dishes and treated with the maleimides for 1 h. Afterward, JC-1 (10 $\mu\text{g/ml}$) was added and incubated for 20 min at 37 °C (5% CO_2). The cells were washed twice with PBS, resuspended in PBS, and an aliquot was used to measure the fluorescence in a spectrofluorometer (Perkin Elmer LS55). The excitation wavelength for JC-1 is 488 nm, and the red and green emission fluorescence were detected at 590 nm and 527 nm, respectively [15-16]. The mitochondrial potential was presented as a ratio of 590/527 fluorescence and compared with the control. An electron transport chain uncoupler (FCCP 1 μM) was used as a positive control.

Subcutaneous in vivo model

Drugs and Animals

The maleimides were dissolved in 100% DMSO and diluted in PBS at a final concentration for injection in each animal (maleimides = 0.27 mg/kg body weight). Swiss female mice, weighing around 25 g each and ageing from 6 to 8 weeks were used in the *in vivo* experiments. The mice were maintained under specific pathogen-free conditions. The animals were separately housed in ventilated cages under a controlled light cycle (12 h light/12 h dark) at a standard room temperature (22-24 °C) and a relative humidity of 50-60% and were allowed access to a conventional diet and water *ad libitum* during entire experiment period. The animals were kept under these conditions for at least one week before the experimental procedures.

Animal care was in accordance with institutional ethical guidelines according to the Care Standards for Laboratory Animals previously approved by the University's Ethics Committee for Animal Use on the Principles of Animal Care.

Experimental dorsal tumor growth and metastasis

Tumor formation was performed in mice by subcutaneously inoculation in dorsal region of 2.5×10^5 B16F10 cells suspended in 0.2 ml of

phosphate-buffered saline [3, 17-18]. This procedure was done in all animals except for animals of the group 1 (control group) and groups 3, 5, 7, and 9 which correspond to four groups to explore the toxicity of maleimides.

Fourteen days after tumor cell injection, when a solid mass appeared (3 mm diameter), the animals were divided randomly in five groups with ten animals each (groups 2, 4, 6, 8, and 10 depending on the treatment).

All animals were weighed before and after treatments. The groups distribution are detailed as follow: the treatment was administered in alternate days for one week (four administrations), by intraperitoneal route.

The groups were named as follow: Group 1 (G1): The negative control received only the vehicle (2% DMSO in PBS); Group 2 (G2): Ten dorsal melanoma-bearing animals treated with vehicle (positive control); Group 3 (G3): Five animals treated with the solution of M2; Group 4 (G4): Ten dorsal melanoma-bearing animals treated with the solution of M2; Group 5 (G5): Five animals treated with the solution of M5; Group 6 (G6): Ten dorsal melanoma-bearing animals treated with the solution of M5; Group 7 (G7): Five animals treated with the solution of M7; Group 8 (G8): Ten dorsal melanoma-bearing animals treated with the solution of M7; Group 9 (G9): Five animals treated with the solution of M9; Group 10 (G10): Ten dorsal melanoma-bearing animals treated with the solution of M9.

After 24 h the last treatment the animals were anesthetized and blood was collected from the ocular puncture vein into heparinized propylene tubes for hematological and biochemical analysis. Subsequently, the animals were killed and all organs excised and fixed with a 10% formaldehyde solution for histopathological analysis. A portion of liver was reserved under refrigeration for biochemical analysis (TBARS and NPSH) on the same day.

The tumors were carefully removed and their sizes were measured with a pachymeter. The entire process was monitored by photo documentation, and the characteristics of the tumors were annotated. The tumors were sent for histological analysis. The tumor growth inhibition was calculated using the following formula: percentage of inhibition (%) = $100(A - B)/A$, in which A= tumors average size of the control group (G2) and B= tumors average size of the treated group. The macroscopic tumor nodules present in the mesentery and lung were also counted and measured with a pachymeter.

Toxicity observation – biochemical and hematological analyzes

Drug toxicity indexes such as weight loss, behavior changes, and feeding patterns were continuously observed during the whole treatment. To clarify potential side effects in the treated mice, the tissues were assayed according to assay protocol described below.

Biochemical analysis

Samples of blood were centrifuged at 3500 rpm for 15 minutes. The remaining serum was frozen at -20 °C for subsequent analysis. The biochemical parameters determined were: serum total protein (TP), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransaminase (ALT), gamma-glutamyl transferase (GGT), urea and creatinine. For biochemical parameters evaluation an automated equipment and GoldAnalisa® system kits for diagnosis were used following the manufacturer's descriptions.

Hematological studies

Hematological analysis including total white blood cell count (WBC) and differential leucocytes counts and red blood cell count (RBC), hemoglobin concentration (Hb), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) were analyzed using standard hematological method as described by Dacie and Lewis [19]. Hematocrit (Hct) was determined by micro-capillary centrifugation at 3000 rpm for 10 minutes and was evaluated with a calibrated scale after sedimentation of the red blood cells.

Level of non-protein thiol substances

NPSH substances were determined as described by Ellman [20]. The tissues fractions were obtained after homogenization in 1 volume of 12% trichloroacetic acid followed by centrifugation. An aliquot of the supernatant was added to phosphate buffer (at final concentration of 800 mmol/l at pH 7.4) and 500 μ mol/DTNB. The color development resulting from the reaction between DTNB and thiols reached the maximum in 5 min and remained stable for more than 30 min. To calculate the amount of NPSH substances in the tissue samples, a standard curve using glutathione was made in parallel.

Determination of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) level

TBARS were determined in the supernatant by the method of Ohkawa et al. [21], in which malondialdehyde as the major end-product of fatty acid peroxidation, reacts with thiobarbituric acid to form a colored complex. Briefly, samples were incubated at 100 °C for 60 min in a medium containing 0.45% sodium duodecyl sulfate, 100 mM hydrochloric acid, 1.4 M acetic acid, at pH 3.4 and 0.6% thiobarbituric acid. After centrifugation the reaction product was determined at 532 nm.

Histological studies

The all organs and tumors, after being removed from the animals, were washed in PBS, fixed in 10% neutral buffered formaldehyde solution dehydrated in graded alcohol for 24 h and then processed according to histopathological protocols. The histological analyses were performed in 4- μ m sections stained with hematoxylin and eosin and observed by a pathologist in a blind manner. Histological damages were identified by analyzing 80 randomly selected fields with an Olympus BH2-RFCA microscope at a magnification of 200 or 400 X.

Statistical analysis

The data were statistically evaluated by variance analysis. Post hoc comparisons of individual means with the controls were completed using the Dunnett multiple comparison test. Values of $P < 0.05$ were considered significant.

Results

In vitro

Table 1 shows the IC₅₀ values of the four maleimides tested. The compounds induced significant cytotoxicity in B16F10 melanoma cells, and the IC₅₀ values for M2, M5, M7, and M9 decreased as a function of incubation time, indicating their probable anti-proliferative activity.

This analysis of cytotoxic activity is based on the ability of living cells to reduce the MTT majority by mitochondrial dehydrogenases. This result indicates that the compounds are acting via mitochondria.

The next step was then to investigate whether the compounds could interfere with mitochondrial membrane potential. It is an important parameter of mitochondrial function and is used as an indicator of different cell death mechanisms, including apoptosis.

Table 1 Cytotoxicity of maleimides toward B16F10 melanoma cells

Time (h)	Mean IC ₅₀ (μM) ±S.E.M			
	M2	M5	M7	M9
24	13 ± 0.8	18 ± 0.9	17 ± 0.5	11 ± 0.9
48	8 ± 1.2	12 ± 1.4	11 ± 1.1	9 ± 1.1
72	7.5 ± 0.9	8.5 ± 1.1	5.4 ± 1.2	4.5 ± 1.3

Cell viability was assayed by MTT.

As shown in Fig. 2, the 10 μM maleimides significantly decreased the mitochondrial membrane potential, similarly to a carbonylcyanide-ρ-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP), a protonophore and potent uncoupler of oxidative phosphorylation in mitochondria. The loss of the mitochondrial membrane potential may be the primary event related to cytotoxicity observed in the MTT assay.

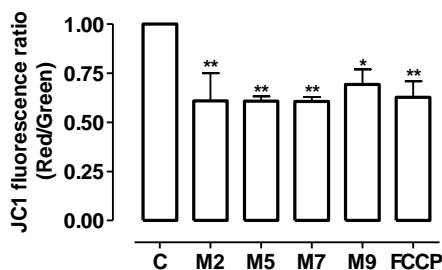


Fig. 2 Effect of maleimides on mitochondrial membrane potential in B16F10 cells. The mitochondrial membrane potential was analyzed using a JC-1 fluorescent probe. The cells were incubated with maleimides (10 μM) for 1 h and FCCP (1 μM). A decrease in the red/green ratio indicates a decrease in the mitochondrial membrane potential in comparison with the control. * P < 0.05; ** P < 0.01

In vivo evaluation of antimelanoma activity

All animals tolerated the subcutaneous injection of melanoma cells and intraperitoneal injections of maleimides. The mice grew and developed normally, and none died during the experiment. The time course of the assay was 21 days. On the first day, the mice were inoculated with melanoma cells, and after 15 days, there was a palpable tumor nodule in the dorsal region of the animals. The mice were separated in their respective groups, and the treatments were then initiated.

Macroscopically, the melanoma tumor showed a rounded or ovoid morphology with an irregular multinodular surface and well-defined by a thin capsule of conjunctive appearance (Fig. 3A-3H). Some tumors were highly pigmented whereas others contained variable pigmentation. Additionally, some mice had melanoma cells infiltrated in adjacent tissues as muscle, skin, and fat, making them difficult to separate for analysis. This phenomenon was most evident in G2 and G4 mice, which presented mesentery metastasis.

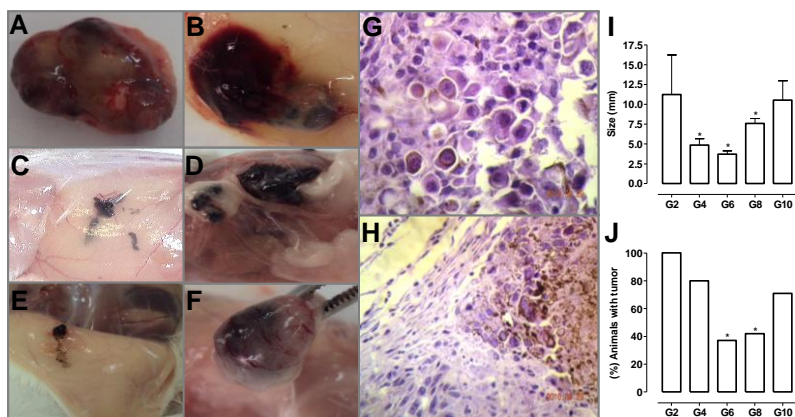


Fig. 3 Maleimides reduced the tumor size and the number of animals with tumors. (A; B) Images showing the macroscopic appearance of the tumor after twenty-one days of B16F10 cell subcutaneous injection in mouse treated with vehicle (G2). (C) Images showing the macroscopic tumor appearance from a mouse treated with (0.27 mg/kg) M2 (G4); (D) M7 (G8); (E) M5 (G6); (F) M9 (G10); (G) Images (400 x) of tumor sections stained with HE from a mouse treated with vehicle (G2); (H)

M2 (G4) (Images 200 x). (I) Mean tumor size in mice after twenty-one days of subcutaneous injection of B16F10 cells. (J) Percentage of animals that developed tumors after twenty-one days of subcutaneous injection of B16F10 cells. * $P < 0.05$ compared to G2

Different responses of malignant melanoma treated with maleimides derivatives were observed by in vivo and in vitro assays. The maleimides showed consistent cytotoxicity for melanoma cells in the in vitro assay, principally M2 and M9. However, in the in vivo experiment, M9 (G10) did not inhibit tumor growth (10.53 ± 2.44 mm), showing a tumor size reduction of only 6%, and the number of animals with tumors ($71 \pm 6\%$) did not decrease. M2 (G4) did not reduce the number of animals with tumors ($80 \pm 2.5\%$) but was however able to reduce the tumor size significantly (4.86 ± 0.8 mm). This decrease represents 57% of the melanoma tumor growth inhibition.

The treatment with M5 (G6) significantly reduced the tumor size (3.73 ± 0.4 mm, 67% tumor size reduction), and only $37 \pm 2\%$ of mice developed a tumor. M7 (G8) inhibited 32% of the tumor growth (7.59 ± 0.61 mm), and only $42 \pm 4\%$ of mice developed a tumor. Briefly, tumor growth was significantly reduced by treatment with M2, M5 and M7 but not with M9 (Fig. 3I), and the groups that received M5 and M7 showed significantly reduced numbers of mice with tumors (Fig. 3J). The lungs (Fig. 4E, 4F) and the mesentery (Fig. 4G, 4H) from mice inoculated with B16F10 cells and treated with maleimides were examined postmortem. The macroscopic and microscopic pulmonary and mesentery nodules were determined and compared. Macroscopically visible, the tumor nodules showed black pigment spots of approximately 1-3 mm in diameter and tending to be fused.

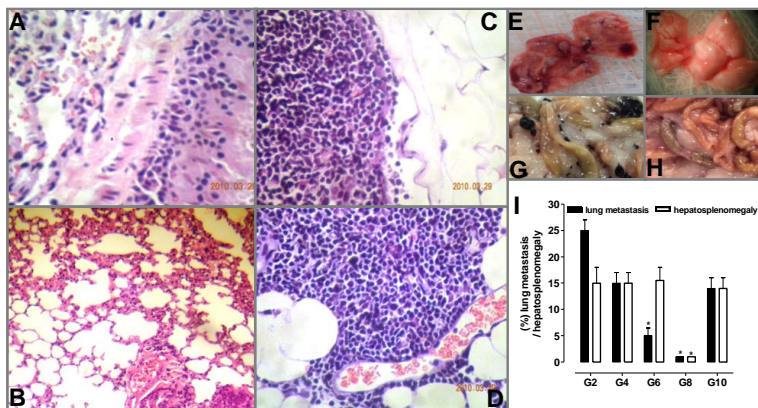


Fig. 4 Macroscopic and microscopic characteristics of lung and mesentery metastasis. (A; B) Images (400 x and 200 X, respectively) of mice lung sections stained with G2 and G6 HE. (C; D) Images (400 x) of mice mesentery sections stained with G2 and G4 HE. (E; G) Images showing the macroscopic characteristics of the metastatic nodules from lung and mesentery of the untreated mice (G2) and (F; H) the mice treated with M5 (G6). (I) Percentage of the pulmonary metastatic and hepatosplenomegaly. * $P < 0.05$ compared to G2

Secondary metastasis in the lungs and mesentery appeared more frequently in the positive control group (G2) (Fig. 4A, 4C, 4E, 4I), while treatment with M5 (G6), and M7 (G8) reduced lung metastasis (Fig. 4B, 4F, 4I) and mesentery metastasis (Fig. 4H). The lungs of G2 animals showed evident tumor nodules, whose cells showed a prominent nucleolus and intracellular melanin deposition, and clear areas of necrosis were also detected. M2 (G4) inhibited 10% of lung metastasis development, and several points of mesentery metastasis were only observed macroscopically with this treatment, which was confirmed microscopically (Fig. 4D). Among the animals treated with M5, only two showed lung metastasis microscopically, but not macroscopically. Only the treatment with M7 (G8) reversed the hepatosplenomegaly caused by the melanoma tumor (Fig. 4I).

Toxicity evaluation

Biochemical and hematological analyses

To evaluate the toxicity produced by maleimides, the hematological profiles of the animals were determined and compared with the respective values obtained for the control group (G1). The results of the hematological parameters of the animals are shown in Table 2.

The hemoglobin values decreased significantly in the G2 mice (10 g/dl), in the G4 mice treated with M2 (9.7 g/dl) and in the G10 mice treated with M9 (8 g/dl) when compared with the G1 mice (13 g/dl). The reduction of hemoglobin was probably induced by the tumor because the G6 and G8 animals also showed reduction of this parameter, but not significantly. The mice of G6 treated with M5 showed a significant increase in the hematocrit (35%) when compared to G1 animals (28%).

Table 2 Hematological parameters after treatment with maleimides

Parameters	Tumor ^a	Controls	M2	M5	M7	M9
		(G1/G2)	(G3/G4)	(G5/G6)	(G7/G8)	(G9/G10)
Erythrocytes ($\times 10^6 \pm \times 10^3$)	-	2.7 \pm 2.5	2.9 \pm 3.0	2.9 \pm 2.5	2.9 \pm 8.9	2.7 \pm 2.5
	+	2.4 \pm 8.6	2.8 \pm 3.3	2.8 \pm 4.9	2.4 \pm 6.0	2.7 \pm 2.0
Leukocytes ($\times 10^3$)	-	5.9 \pm 1	4.9 \pm 2	5.8 \pm 1	4.4 \pm 2	5.9 \pm 1
	+	3.4 \pm 2*	4.4 \pm 2	3.4 \pm 4*	3.6 \pm 2*	4.3 \pm 4
MCV (fl)	-	147 \pm 9	90 \pm 6.8	140 \pm 10	101 \pm 2	147 \pm 9
	+	115 \pm 8	99 \pm 5	123 \pm 10	109 \pm 5	103 \pm 9
MCH (pg)	-	49 \pm 2	34 \pm 1.9	45 \pm 3.2	35 \pm 5.9	49 \pm 2
	+	41 \pm 2.8	34 \pm 2.9	38 \pm 3	45 \pm 5.8	36 \pm 8.2
MCHC (%)	-	39 \pm 3	38 \pm 4.8	38 \pm 4.8	34 \pm 7	39 \pm 3
	+	36 \pm 2	34 \pm 2.4	34 \pm 2.4	41 \pm 5.7	35 \pm 9.8
Hemoglobin g/dl	-	13 \pm 0.5	10 \pm 2	13 \pm 0.7	10 \pm 0.8	13 \pm 0.5
	+	10 \pm 0.6*	9.7 \pm 0.6*	11 \pm 0.4	11 \pm 0.9	8 \pm 1.8*
Hematocrit (%)	-	28 \pm 3	26 \pm 1.2	26 \pm 2.6	29 \pm 1.8	28 \pm 3
	+	28 \pm 1.6	28 \pm 1.3	35 \pm 3*	26 \pm 4	28 \pm 0.9
Neutrophils (%)	-	19 \pm 2	22 \pm 2	17 \pm 3	17 \pm 2	19 \pm 2
	+	20 \pm 2	18 \pm 4	16 \pm 2	14 \pm 3	16 \pm 3
Mononuclear (%)	-	79 \pm 1	77 \pm 3	83 \pm 2	83 \pm 4	79 \pm 1
	+	80 \pm 7	81 \pm 10	84 \pm 3	85 \pm 4	84 \pm 6
Eosinofil (%)	-	1 \pm 1	2 \pm 1	0	0	1 \pm 1
	+	1 \pm 0.5	2 \pm 1	0	0	1 \pm 1

Data are expressed as mean and mean of the standard deviation (mean \pm SD). a Tumour: minus (-): G1, G3, G5, G7 and G9 (n=5); plus (+): G2, G4, G6, G8 and G10 (n=10). fl = femtolitres; pg = picogram. * P < 0.05 (comparison to G2); • P < 0.05 (comparison to G1).

The G2 mice showed a decrease in the number of leukocytes (3422 cells) when compared with G1 animals (5900 cells). The animals treated with M5 (3400 cells) and M7 (3600 cells) were not able to reverse the leukopenia caused by the tumor development.

The results from murine biochemical studies are summarized in Table 3. Only the treatment with M9 showed possible hepatic toxicity. The enzyme activity values of ALT (165.3 IU/l) and AST (237 IU/l) were changed by treatment with M9 when compared with the activity values of the same enzymes for G1, which were 131 IU/l and 171 IU/l, respectively. M5 increased the values of ALT in relation to G2 (146.3 IU/l). Other parameters did not present significant alterations, which probably represents low toxicity of the maleimides.

Table 3 Serum biochemical parameters after treatment with maleimides

Parameters	Tumor ^a	Controls (G1/G2)	M2 (G3/G4)	M5 (G5/G6)	M7 (G7/G8)	M9 (G9/G10)
ALT (IU/l)	-	131 ± 8.4	116 ± 6.0	146 ± 3.1*	114 ± 9.8	165 ± 7*
	+	102 ± 4.7	98 ± 6.0	100 ± 8.0	108 ± 4.5	113 ± 7
AST (IU/l)	-	171 ± 13.8	130 ± 11	192 ± 17.0	120 ± 13	237 ± 6.1*
	+	180 ± 12.8	161 ± 12.6	142 ± 13	129 ± 12.5	224 ± 23.8
GGT (IU/l)	-	2.3 ± 0.4	1.6 ± 0.6	3.0 ± 0.3	1.3 ± 0.3	1.7 ± 0.3
Total protein (g/dl)	-	2.8 ± 0.3	3.3 ± 0.3	2.1 ± 0.3	2.3 ± 0.6	2.6 ± 0.5
Urea (mg/dl)	-	5.8 ± 0.2	5.4 ± 0.1	5.4 ± 0.2	5.8 ± 0.4	6.7 ± 0.5
Creatinine (mg/dl)	+	5.4 ± 0.1	4.7 ± 0.1	5.2 ± 0.1	5.1 ± 0.3	5.6 ± 0.3
	-	73 ± 3.5	78 ± 3.1	77 ± 7.2	68 ± 10.5	78 ± 7.5
Creatinine (mg/dl)	+	56 ± 4.5	45 ± 1.4	50 ± 2.8	48 ± 4.0	47 ± 4.0
	-	0.38 ± 0.01	0.40 ± 0.03	0.38 ± 0.02	0.38 ± 0.01	0.43 ± 0.03
	+	0.38 ± 0.01	0.38 ± 0.01	0.37 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.36 ± 0.01

Data are expressed as mean and mean of the standard deviation (mean ± SD). a Tumour: without tumour (-);

G1, G3, G5, G7 and G9 (n=5); with tumour (+): G2, G4, G6, G8 and G10 (n=10). *P < 0.05 (comparison to G2); • P < 0.05 (comparison to G1).

Animal body weight changes

At the end of the experiment, the mice were weighed and the variation of body weight was evaluated. There was a statistically significant increase in the body weight of mice treated with M2 (G4). The weight of the animals treated with M7 (G8) increased only by 2-3 g, however this positive weight variation was significantly different from G1 and G2 mice, which gained more weight during the entire experiment (Fig. 5).

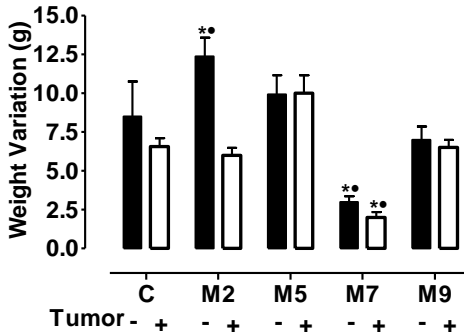


Fig. 5 The body weight variation (g) of all groups. The results represent the mean value and the mean of the standard deviation (mean \pm SD). *P < 0.05 (comparison to G2); **P < 0.05 (comparison to G1).

Oxidative stress in the liver after treatment with maleimides

The levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) increased in the livers of mice bearing treated and untreated melanoma tumors, and this effect was reverted only by treatment with M5 (G6) (Fig. 6A). The mice treated with M7 (G8) and M9 (G10) showed significant increases in TBARS levels (20 and 15 nmol/g tissue, respectively) compared to G1 (2.81 nmol/g tissue). These maleimides seem to trigger an oxidative stress, which may be their mechanism of action. Additionally, M9 also induced alterations in hepatic enzymes (ALT and AST), which are indicative of hepatic toxicity.

However, the liver histology did not reveal any evidence of degenerative changes, steatosis or necrosis. Indeed, microscopic examination of the selected organs did not reveal any treatment-related toxic effects. However, in some mice treated with M7 (G8) and all mice treated with M9 (G10), histological analyses showed megakaryocytic cells in the spleen.

The level of oxidative stress metabolites GSH and NPSH in liver were significantly reduced. The results are shown in the Fig. 6B; animals treated with M5 (G6) (0.45 nM), M7 (G8) (0.21 nM), and M9 (G10) (0.24 nM) are compared with G1 and G2 animals (0.71 nM and 0.63 nM, respectively).

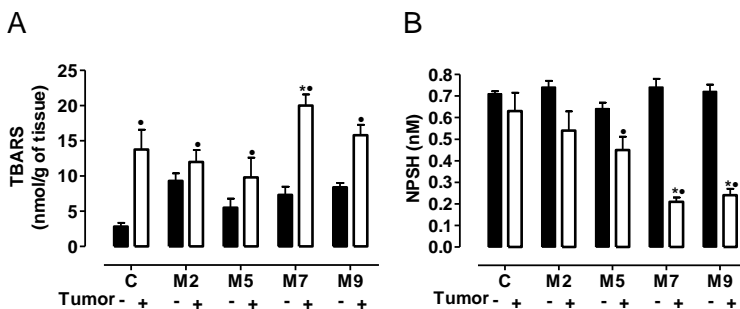


Fig. 6 The oxidative stress parameters in the livers of all groups. (A) TBARS level in mice livers. (B) NPSH level in mice livers. The results represent the mean value and the mean of the standard deviation (mean \pm SD). *P < 0.05 (comparison to G2); **P < 0.05 (comparison to G1)

Discussion

The synthetic cyclic imides such as maleimides are easily obtained with high yields and present satisfactory pharmacological activity. These compounds are hydrophobic and neutral and, therefore, able to cross biological membranes. The results shown in this article, in particular those concerning maleimides M5 and M7, are important because melanoma is a highly aggressive tumor with a great capacity to develop metastasis in distant sites. Although the model used in this work is not the choice model for inducing lung metastasis, we observed that only M2 and M9 mice bearing a melanoma tumor developed pulmonary and mesentery metastasis. This metastatic process was avoided in M5 and M7 treatments.

Mitochondria are indispensable for energy production and are crucial regulators of cell death, principally in the intrinsic pathway of apoptosis [22]. Alterations of mitochondrial membrane potentials were observed when B16F10 cells were treated with the maleimides, and the demonstrated uncoupler effect can be related to the mechanism of action of the cellular death induced by these compounds. It is interesting to note that the cell death induced by maleimides occurs at relatively low concentrations, and the IC_{50} values decreased as a function of cell incubation time, which can be related with their antiproliferative effect.

Curiously, M9, which presented higher cytotoxicity, did not show antitumoral activity in the *in vivo* assay.

Cell death is often associated with disruption of the mitochondrial inner membrane, which is reflected as dissipation of membrane potential and formation of mitochondrial permeability transition pores with subsequent cell death [23].

This result observed *in vitro* suggests that such alterations can be related to the maleimide cytotoxicity. Prado et al. [7] also showed that some maleimides inhibit oxygen consumption in the presence of adenosine diphosphate (ADP), and this effect is related to inhibition of the respiratory chain enzymatic complexes. The change in the mitochondrial potential induced by the maleimides is a very interesting result because alterations of mitochondrial parameters may be related with apoptosis.

The increase in oxidative stress observed by the TBARS and NPSH assay shows that the melanoma tumor induces the production of reactive species and leads to a consequent increase in lipid peroxidation. Growing evidence suggests that cancer cells in general are under increased oxidative stress compared to normal cells, which includes enhanced reactive oxygen species (ROS), increased accumulation of ROS-mediated reaction products and over-expression of antioxidant enzymes [24].

The treatment with M7 strongly induced the lipid peroxidation, suggesting that this effect is related to its mechanism of action. The increased cellular oxidant may be implicated in several signal transduction pathways that eventually lead to the enhanced susceptibility of tumor cells. In previous studies, our group has shown that cytoplasmic and mitochondrial GSH depletion and free radical generation in tumor cells may be implicated in a redox potential alteration inducing cell death by apoptosis, probably through cytochrome c release [25-27]. Compounds that induce the oxidative stress in melanoma cells may provide a candidate target for therapeutic purposes. ROS production and activation of caspase-9 and -3 occur later in the apoptotic process and are frequently reported as a consequence of the redox imbalance [28].

According to the results shown in this article, treatment with M5 and M7 was more effective than treatment with M2 and M9 in the model used in this study because M5 and M7 were effective in the reduction of tumor size and metastatic processes. The differences in the maleimide mechanisms of action are probably due to difference in their chemical structures. M2 is an unsubstituted maleimide, M9 has an ethyl

group between the imide ring and the aromatic ring, and M5 and M7 have substituent groups in the aromatic ring.

According to the structure of maleimides, the distance between the imide ring and the aromatic ring, varied by the introduction of different substituents, may be an important factor related to their activities. Some authors suggest that the distance between the imide ring and the aromatic ring is directly related to the antifungal and antibacterial activities and other biological effects of these molecules [7, 13]. The authors also presented a study of maleimides stability in aqueous medium and proved that these molecules are stable [13].

The antibacterial activity of maleimides reported by Cechinel-Filho et al. [29] indicates that the cyclic imide double bond is an important factor in the activity. The distance between the aromatic and the imide rings when separated by methylene groups does not affect the antibacterial activity. From our results, it appears that the aromatic ring must be connected directly to the imide ring, and the substituent may be linked to the aromatic ring, such as by the methyl group present in M5, which confers more lipophilicity.

Furthermore, the maleimides that possess a type of cyclic α,β -unsaturated ketone have been extensively explored as antitumor drugs because this chemical group usually increases cytotoxicity, DNA binding and topoisomerase I inhibition and acts as possible thiol-alkylating agent of topoisomerase II [30].

Confirming this hypothesis, several reports state that maleimides interact preferably with the hydrophobic domains of enzymes based on the fact that the inactivation of sulfhydryl groups is greatly affected by the side-chain length of the derivatives [9, 31].

Hematological parameters are a valuable tool for assessing injuries in the liver, spleen and bone marrow that are caused by certain substances, and serum aminotransferases activities are known as markers of hepatotoxicity. An increase in the activities of these enzymes indicates possible toxic hepatitis. The results of the present study reveal a marked elevation in AST and ALT activities in mice treated with M9, although microscopic examination of the liver showed no alterations. The maleimides caused few alterations in the hematological parameters, a very good indication against the acute adverse effects associated with usual chemotherapies.

Ordinarily, liver cell damage is characterized by a rise in plasma enzymes (AST, ALT, LDH, GGT, etc.). High concentrations of AST appear in a number of tissues (liver, kidneys, heart and pancreas). However, ALT is primarily localized in the cytosol of hepatocytes.

Therefore, this enzyme is considered a good marker of hepatocellular damage [32].

Splenomegaly is a common pathological change in tumor-bearing states and may be related to the activation of humoral immunity [33]. The splenomegaly observed in melanoma-tumor-bearing mice was reverted only by M7 treatment. However, according to the literature, the splenomegaly in tumor-bearing mice might indicate enhanced Th2-related humoral immunity, and its reduction by treatment implicates the down-regulation of the Th2 response while not affecting the functions of the macrophages and/or natural killer cells [33].

In summary, we showed for the first time that the maleimide derivatives M5, and M7 present relevant pharmacological properties *in vivo*, including antitumoral activity and apparently slight toxicity, although, further studies are required to understand the molecular mechanism of their antimelanoma activity.

Acknowledgments

This study was supported by grants from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) FAPESC (Fundação de Amparo à Pesquisa de Santa Catarina). This article was part of the PhD work of Vânia F. Noldin of the Pharmacy post-graduation course. The research group would also like to thank the Hospital Universitário (HU) for the use of their facilities.

References

1. Sánchez-Del-Campo L, Tárraga A, Montenegro MF, Cabezas-Herrera J, Rodríguez-López JN (2009) Melanoma activation of 3-*O*-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)-(-)-epicatechin to a potent irreversible inhibitor of dihydrofolate reductase. *Mol Pharmaceutics* 6:883-894
2. Chang P, Knapper WH (1982) Metastatic melanoma of unknown primary. *Cancer* 49:1106-1111
3. Salinas-Jazmín N, Fuente M de la, Jaimez R, Pérez-Tapia M, Pérez-Torres A, Velasco-Velázquez MA (2010) Antimetastatic, antineoplastic,

and toxic effects of 4-hydroxycoumarin in a preclinical mouse melanoma model. *Cancer Chemother Pharmacol* 65:931-940

4. Nashan D, Müller ML, Grabbe S, Wustlich S, Enk A (2007) Systemic therapy of disseminated malignant melanoma: an evidence-based overview of the state-of-the-art in daily routine. *J Eur Acad Derm Venereol* 21:1305-1318

5. Pontes ZBVS, Lima EO, Cechinel-Filho V (2007) Profile of susceptibility in vitro of *Trichosporon asahii* and *Trichosporon inkin* strains against cyclic imides. *Braz J Pharm Sci* 43:273-279

6. Cechinel-Filho V, Campos F, Corrêa R, Yunes RA, Nunes RJ (2003) Aspectos químicos e potencial terapêutico de imidas cíclicas: uma revisão da literatura. *Quim Nova* 26:230-241

7. Prado SR, Cechinel-Filho V, Campos-Buzzi F, Corrêa R, Cadena SM, Oliveira MB de (2004) Biological evaluation of some selected cyclic imides: mitochondrial effects and in vitro cytotoxicity. *Z Naturforsch C59*:663-672

8. Ferri N, Beccalli EM, Contini A, Corsini A, Antonino M, Radice T, Pratesi G, Tinelli S, Zunino F, Gelmi ML (2008) Antiproliferative effects on human tumor cells and rat aortic smooth muscular cells of 2,3-heteroarylmaleimides and heterofused imides. *Bioorg Med Chem* 16:1691-1701

9. Ye Q, Cao J, Zhou X, Lv D, He Q, Yang B, Hu Y (2009) Synthesis and evaluation of novel 7-azaindazolyl-indolyl-maleimide derivatives as antitumor agents and protein kinase C inhibitors. *Bioorg Med Chem* 17:4763-4772

10. Yunes JA, Cardoso AA, Yunes RA, Corrêa R, Campos-Buzzi F de, Cechinel-Filho V (2008) Antiproliferative effects of a series of cyclic imides on primary endothelial cells and a leukemia cell line. *Z Naturforsch C63*:675-680

11. Xu G, He Q, Yang B, Hu Y (2009) Synthesis and antitumor activity of novel 4-chloro-3-arylmaleimide derivatives. *Lett Drug Des Discovery* 6:51-55

12. Kalgutkar AS, Crews BC, Marnett LJ (1996) Design, synthesis, and biochemical evaluation of *N*-substituted maleimides as inhibitors of prostaglandin endoperoxide synthases. *J Med Chem* 39:1692-1703
13. Sortino M, Cechinel-Filho V, Corrêa R, Zacchino S (2008) *N*-Phenyl and *N*-phenylalkyl-maleimides acting against *Candida* spp.: time-to-kill, stability, interaction with maleamic acids. *Bioorg Med Chem* 16:560-568
14. van de Loosdrecht AA, Nennie E, Ossenkoppele GJ, Beelen RH, Langenhuijsen MM (1991) Cell mediated cytotoxicity against U 937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study. *J Immunol Methods* 141:15-22
15. Cossarizza A, Baccarani-Contri M, Kalashnikova G, Franceschi C (1993) A new method for the cytofluorometric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-Aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochem Biophys Res Commun* 197:40-45
16. Salvioli S, Ardizzoni A, Franceschi C, Cossarizza A (1997) JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess $\Delta\psi$ changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Lett* 411:77-82
17. Faião-Flores F, Pardi PC, Santos RP, Rando DG, Suárez JAPQ, Maria DA (2008) Antiproliferative and antimetastatic activity of DM-1, sodium 4-[5-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-oxo-penta-1,4-dienyl]-2-methoxy-phenolate, in B16F10 melanoma. *Appl Cancer Res* 28:72-79
18. Siqueira JM, Gazola AC, Farias MR, Volkov L, Rivard N, Brum-Fernandes AJ, Ribeiro-do-Valle RM (2009) Evaluation of the antitumoral effect of dihydrocucurbitacin-B in both in vitro and in vivo models. *Cancer Chemother Pharmacol* 64:529-538
19. Dacie JV, Lewis SM (1993) Calculation of red blood cells, haemoglobin, and erythrocyte indices. In: Dacie JV, Lewis SM (eds.) *Practical Haematology*, Churchill Livingstone, London, pp. 37-113
20. Ellman GL (1959) Tissue sulphhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82:70-77

21. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351-358
22. Fulda S, Galluzzi L, Kroemer G (2010) Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discovery* 9:447-464
23. Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Green DR (2006) Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ* 13:1396-1402.
24. Pelicano H, Carney D, Huang P (2004) ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat* 7:97-110
25. Green DR, Reed JC (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281:1309-1312.
26. Locatelli C, Rosso R, Santos-Silva MC, Souza CA de, Licínio MA, Leal P, Bazzo ML, Yunes RA, Creczynski-Pasa TB (2008) Ester derivatives of gallic acid with potential toxicity toward L1210 leukemia cells. *Bioorg Med Chem* 16:3791-3799
27. Locatelli C, Leal PC, Yunes RA, Nunes RJ, Creczynski-Pasa TB (2009) Gallic acid ester derivatives induce apoptosis and cell adhesion inhibition in melanoma cells: The relationship between free radical generation, glutathione depletion and cell death. *Chem Biol Interact* 181:175-184
28. Biroccio A, Benassi B, Filomeni G, Amodei S, Marchini S, Chiorino G, Rotilio G, Zupi G, Ciriolo MR (2002) Glutathione influences c-Myc-induced apoptosis in M14 human melanoma cells. *J Biol Chem* 277:43763-43770
29. Cechinel-Filho V, Pinheiro T, Nunes RJ, Yunes RA, Cruz AB, Moretto E (1994) Antibacterial activity of N-phenylmaleimides, N-phenylsuccinimides and related compounds, Structure-activity relationships. *IL Farmaco* 49:675-677
30. Jha A, Mukherjee C, Rolle AJ, Clercq E, Balzarini J, Stables JP (2007) Cytostatic activity of novel 4'-aminochalcone-based imides. *Bioorg Med Chem Lett* 17:4545-4550

31. Zentz F, Valla A, Le Guillou R, Labia R, Mathot AG, Sirot D (2002) Synthesis and antimicrobial activities of N-substituted imides. *IL Farmaco* 57:421-426
32. Ramaiah SK (2007) A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. *Food Chem Toxicol* 45:1551-1557
33. Kato Y, Mizuguchi K, Mochizuki H (2005) A novel benzoimidazole derivative, M50367, modulates helper T type I/II responses in atopic dermatitis mice and intradermal melanoma-bearing mice. *Biol Pharm Bull* 28:78-82

2.3. ARTIGO A SER SUBMETIDO À REVISTA EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES

Os objetivos deste trabalho consistiram em:

- avaliar a citotoxicidade das maleimididas frente a células leucêmicas linhagem murino L1210 pelo método MTT em diferentes tempos e concentrações. As maleimididas que apresentaram citotoxicidade, e concentrações inibitórias baixas, foram selecionadas para os demais testes.
- avaliar a citotoxicidade dos derivados maleimídicos em células L1210 associados a catalase e quercetina;
- avaliar o tipo de morte induzida pelos derivados maleimídicos através da eletroforese em gel de agarose, e da morfologia celular avaliada em microscópio de fluorescência;
- avaliar o estresse oxidativo induzido pelos derivados maleimídicos através da determinação da concentração de defesas antioxidantes não enzimáticas, da concentração de espécies reativas através da sonda DCF, da lipoperoxidação e da atividade de enzimas antioxidantes;
- avaliar o potencial mitocondrial através de método fluorimétrico utilizando a sonda JC-1;
- avaliar a concentração de ATP através de método quimioluminométrico.

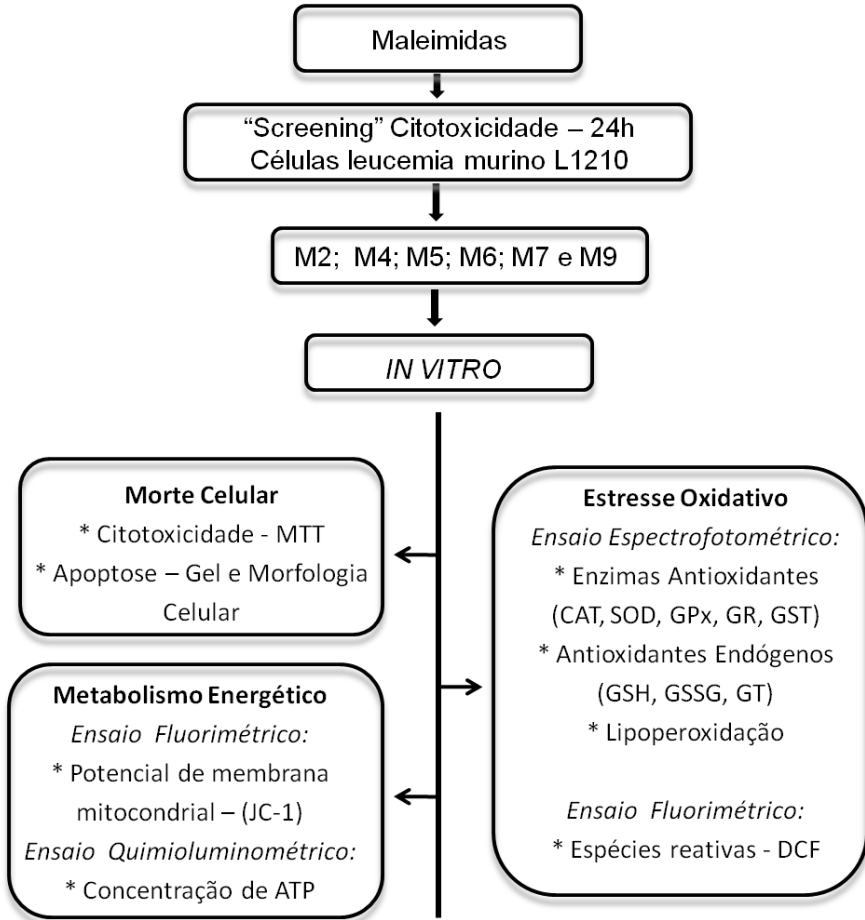


Figura 10: Fluxograma da avaliação dos mecanismos de citotoxicidade dos derivados maleimídicos em linhagem de células leucêmicas murinas L1210.

Induction of apoptosis by cyclic maleimide derivatives in a leukemia cell line: involvement of oxidative stress and mitochondrial damage

Vânia Floriani Noldin^a, Evelyn Winter^a, Bruno Mattei^a, Fátima Campus-Buzzi^b, Valdir Cechinel-Filho^b, Tânia Beatriz. Creczynski-Pasa^{a,*}.

^a Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

^b Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR), Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), Itajaí - SC, Brazil.

* Correspondence to: Tânia B. Creczynski-Pasa Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900, CP 476 Florianópolis, SC, Brazil.

Tel: + 55 48 3331 8057; fax: + 55 48 33319542; e-mail:

taniac@mbox1.ufsc.br

ABSTRACT

Maleimides are an important class of compounds due to the facility of obtaining and chemical structure modification. The insertion of different groups provides expressive pharmacological properties including, antibacterial, antifungal and antitumor, among others. The present study describes the cytotoxicity of maleimide derivatives against L1210 leukemic cells triggered by oxidative stress. Cell viability was assessed by [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT) test and oxidative stress was characterized by the levels of antioxidants enzymes, reactive oxygen species accumulation and lipid peroxidation. Additionally, we evaluated the influence of the compounds on mitochondrial membrane potential and on levels of ATP. The maleimides exhibited potent cytotoxic effects against L1210 cells which died by apoptosis. Cell viability increased when cells were incubated with catalase, indicating that the cytotoxic effects are related to oxidative stress. This was confirmed by the increase of reactive oxygen species and lipid peroxidation. Moreover, maleimides derivatives induced alteration in mitochondrial membrane potential and ATP depletion. The antileukemic effects of maleimides can be related to their chemical structure, principally by the integrity of the imide ring and the proximity between the imide and aromatic rings. Also, the neutrophilic characteristics of the substituent groups on the aromatic ring influence the antitumor activity. Maleimide derivatives showed significant cytotoxicity to L1210 leukemia cells indicating that these compounds might be promissory antitumoral agents to be investigated.

Keywords: leukemia, L1210, maleimides, catalase, mitochondrial membrane potential.

1. Introduction

Leukemia is a disease of mesenchymal characterized by an uncontrolled proliferation and maturation or an increased lifespan of myeloid or lymphoid progenitor cells in bone marrow (Plasschaert et al., 2004; Burke and Startzell, 2008). The leukemia is classified based on the primary cell line origin (lymphoid or myeloid) and progression of the disease (acute or chronic) (Burke and Startzell, 2008). The acute lymphocytic leukemia (ALL) occurs five times more frequently than myelogenous leukemia (Belson et al., 2007).

The treatment of ALL incorporates multiple drugs into regimen-specific sequences of dose intensity and time intensity. The drugs used include cyclophosphamide, cytarabine, vincristine, daunorubicin, methotrexate, glucocorticoids, and others according to the disease remission (Faderl et al., 2003; Plasschaert et al., 2004; Burke and Startzell, 2008; Pulte et al., 2009).

The poorer clinical outcome of adults compared with children is reflected in low complete remission rates and a possible explanation for this could be the difference in drug sensitivity of leukemic blasts between children and adults, as a difference in drug metabolism between children and adults (e.g. methotrexate polyglutamated), and overexpression of P-glycoprotein an ATP-dependent transmembrane drug-efflux pump (Plasschaert et al., 2004; Vitale et al., 2006).

The antileukemic therapy may involve the inhibition of cell proliferation or direct induction of cell death by the activation of diverse apoptosis signaling pathways (Stahnke et al., 2003). Therefore, novel therapeutic approaches are needed to complete remission and also to ameliorate the quality of life of patients with ALL, principally the adults whose low remission-induction therapy suggests acquired treatment resistance (Pui and Jeha, 2007). The development of new drugs is justified to improve efficacy and to reduce the toxicity of chemotherapy, moreover, by alternative mechanisms of action (Vitale et al., 2006).

Cyclic imides belong to an important class of compounds synthesized using of phyllanthimide molecule as a model. This alkaloid was isolated from aerial parts of *Phyllanthus sellowianus* (Cechinel Filho et al., 2003). The maleimide derivatives showed important antifungal, antibacterial, analgesic and antitumor activities demonstrated by in vitro and in vivo assays (Cechinel Filho et al., 1998; Wang et al., 2000; Prado et al., 2004; Sortino et al., 2008).

Mentioning particularly anticancer activity, a series of maleimide derivatives exhibited cytotoxic and antiproliferative activities toward K562 leukemic cell line (Yunes et al., 2008); Prado et al. (2004), showed significant cytotoxicity of maleimide derivatives against B16F10 melanoma cells and a potent inhibition of oxygen consumption by mitochondria in the presence of maleimides indicating their possible influence in the electron transfer respiratory chain. Therefore, in this study we evaluated the cytotoxicity of maleimide derivatives against L1210 leukemic cells and its influence on the relation between oxidative stress and cell death.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The cell culture media were purchased from Cultilab (São Paulo, Brazil). Serum and antibiotics were purchased from GIBCO (Grand Island, NY). Dimethyl sulfoxide (DMSO) and ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA) were purchased from Merk (Darmstadt, Germany). JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolocarboyanine iodide) was purchased from Invitrogen, the luciferin-luciferase kit was purchased from Bioorbit (Tuku, Finland). HEPES [N(-2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)] sodium salt, Trypan blue, MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide], DTNB [5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)], DCFH-DA (2,7-dichlorofluorescein diacetate), acridine orange, ethidium bromide, and TBA (thiobarbituric acid) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), and all reagents were commercial products of the highest available purity.

2.2. Drugs

The maleimides employed were synthesized at NIQFAR - University of Itajaí Valle, Itajaí, SC, Brazil, and their structures were confirmed by spectroscopic methods (Kalgutkar et al., 1996; Cechinel Filho et al., 1998; 2003). The synthesis of the *N*-substituted maleimide derivatives was achieved by reaction of maleic anhydride with the appropriate amine in the presence of glacial acetic acid at room temperature that generated the corresponding *N*-substituted maleamic

acids. The maleamic acid intermediates were subsequently cyclized to the corresponding *N*-arylmaleimides by heating in the presence of acetic anhydride containing catalytic amounts of sodium acetate (Kalgutkar et al., 1996; Cechinel Filho et al., 2003; Sortino et al., 2008).

The maleamic acids and maleimide derivatives (Fig. 1) were solubilized in DMSO, and controls were run in parallel to monitor the possible interference of the solvent with the assays. The final DMSO concentration was 0.1%. In these conditions, the solvent did not interfere with the assays.

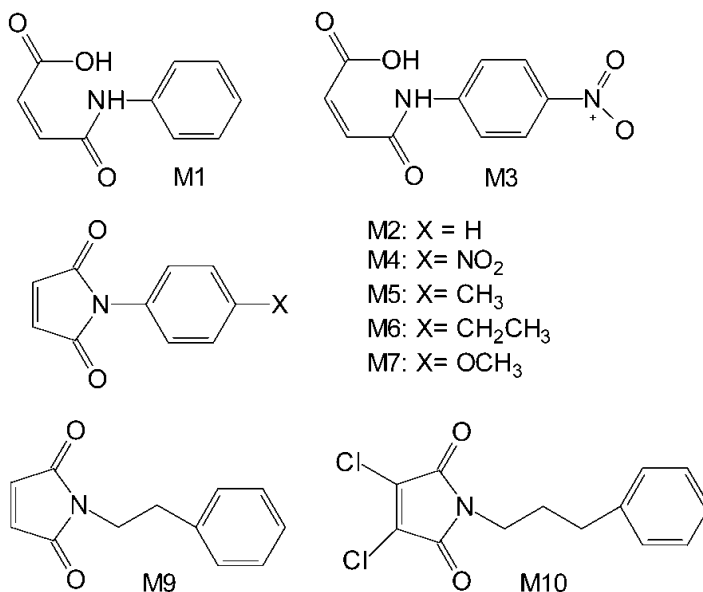


Fig. 1. Chemical structure of maleimides. *N*-phenyl-maleamic acid (M1), *N*-phenyl-maleimide (M2), 4-nitro-*N*-phenyl-maleamic acid (M3), 4-nitro-*N*-phenyl-maleimide (M4), 4-methyl-*N*-phenyl-maleimide (M5), 4-ethyl-*N*-phenyl-maleimide (M6), 4-methoxy-*N*-phenyl-maleimide (M7), *N*-phenyl-ethyl-maleimide (M9), dichloro-*N*-phenyl-propyl-maleimide (M10).

2.3. Tumor cell line

Murine L1210 lymphoblastic leukemia cells were obtained from American Type Culture Cell (ATCC) - Manassas, VA. The cells were cultivated in cell culture flasks of 75 cm² in DMEM supplemented with 10% of inactive fetal bovine serum, 100U/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin and 10mM HEPES (pH 7.4). The cell culture was maintained at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. Every 1-2 days, cells were passaged by removing 90% of the supernatant and replacing it with fresh medium. In all experiments, viable cells were checked in the beginning of the experiment by trypan blue exclusion.

2.4. Evaluation of cytotoxicity

The cell viability with or without the compounds were measured by MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]. This assessment of cytotoxicity is based on the ability of living cells to reduce the yellow product MTT to a blue formazan product (van de Loosdrecht et al., 1991). Cells were plated in 96-well microplates at 1 x 10⁵ cells/well and incubated for 2, 4, 6 and 24 h, and at 5 x 10⁴ and 3 x 10⁴ cells/well for 48 and 72 h, respectively, with the maleimides in a range of 1 to 100 µM.

To evaluate the cytotoxicity of maleimides in combination with catalase and quercetin, 1 x 10⁵ cells/well were incubated for 24 h with 15 µM alone or plus catalase (5000 U/ml), or quercetin (25 µM). To verify if catalase and quercetin could themselves to prejudice the cells, a control with the same additions without the maleimides was run in parallel;. After incubation at 37 °C, cells were carefully washed, and a MTT solution (5 mg/ml) prepared in fresh medium was added and further incubated for 2 h at 37 °C and 5% CO₂. The medium was removed, and DMSO was added to dissolve the crystalline formazan formed, and the absorbance was measured at 540 nm using a microwell system reader.

The results were expressed as a percentage of the absorbance of the control. Cell viability of the control cells corresponds to 100%, and half of the inhibitory concentration is called IC₅₀. All experiments were performed in triplicate.

2.5. Analysis of DNA Fragmentation.

The isolation of apoptotic DNA fragments was based on the method of Han (1997). Briefly, 3×10^6 L1210 cells were treated with the compounds (10 μM for each compound) for 24 h. Cells were then washed with cold PBS and incubated with lysis buffer (10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.25% NP-40, 0.5 g/l proteinase K) at 50 °C for 2 h. DNA was then precipitated with 2.5 vol of ethanol at 25 °C overnight and dried in air. After washing with ice-cold 70% ethanol, the pellets were dissolved in TE buffer containing 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, and 0.6 g/ml RNase A, and they were further incubated at 37 °C for 1 h. Horizontal electrophoresis was performed at 150 V using a 1% agarose gel with TAE (Tris-acetic acid and EDTA) as the running buffer. The gel was stained with ethidium bromide and visualized by a 2UV Transilluminator (MacroVue UV-20 Hoefer) for ladder formation.

2.6. Cellular morphological observation

To observe changes in cellular morphology, the acridine orange/ethidium bromide double staining method was performed (Baskic et al., 2006). Acridine orange is taken up by both viable and nonviable cells and emits green fluorescence if intercalated into double stranded nucleic acid or red fluorescence if bound to single stranded nucleic acid. Ethidium bromide is taken up only by nonviable cells and emits red fluorescence by intercalation into DNA.

L1210 cells (5×10^5 cell/well) were incubated with maleimides (10 μM) for 4 h. After incubation, cells were carefully washed and resuspended in PBS and the dye mixture (5 mg/ml acridine orange and 5 mg/ml ethidium bromide in distilled water). The suspension was immediately examined by fluorescence microscopy (Nikon Eclipse TS100) at 400 X magnification. We distinguished the cell types according to the fluorescence emission and the morphological aspect of chromatin condensation in the stained nuclei: viable cells have uniform bright green nuclei with organized structure; apoptotic cells have green nuclei, but perinuclear chromatin condensation is visible as bright green patches or fragments; late apoptotic cells have orange to red nuclei with condensed or fragmented chromatin and necrotic cells have an uniform orange to red nuclei with organized structure (Baskic et al., 2006).

2.7. Preparation of Homogenates

Cell homogenates were prepared to complete the lipid peroxidation, glutathione and enzyme assays. For this, cells (6×10^6 cells) were treated with the compounds ($10 \mu\text{M}$) for 24 h. After, cells were washed twice with PBS, lysed with 20 mM phosphate buffer at pH 7.4, 150 mM NaCl and 1% Triton X-100, sonicated for 20 seconds and centrifuged at 10000 rpm for 10 min. The supernatants (homogenates) of each sample were maintained at -20°C .

2.7.1. Enzyme Assays

Glutathione Peroxidase (GPx) was assayed according to Flohé and Gunzler (1984). NADPH oxidation was monitored by its decrease in absorbance at 340 nm ($\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), using $150 \mu\text{g/ml}$ of protein. Catalase activity was determined according to Aebi (1984) using $60 \mu\text{g/ml}$ of protein. In this assay, the disappearance of H_2O_2 was evaluated by measuring the decrease in absorbance at 240 nm (molar extinction coefficient: $\epsilon = 40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Glutathione reductase was assayed according to Carlberg and Mannervick (1975), and the NADPH oxidation, which resulted from GSSG reduction by GR, was determined by its decrease in absorbance at 340 nm ($\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) using $150 \mu\text{g/ml}$ of protein. Glutathione S-transferase was assayed according to Keen et al. (1976), using $60 \mu\text{g/ml}$ of protein. In this assay, GST induces the conjugation of GSH (0.15 M) with CDNB. The conjugate was detected spectrophotometrically at 340 nm. The results were normalized by protein concentration and expressed as percentages of enzyme activity.

2.7.2 Glutathione Measurement

Total glutathione (GSH + GSSG) was measured using the glutathione reductase method (Tietze, 1969). In this assay, homogenate ($50 \mu\text{g/ml}$ of protein) was transferred to a 96-well plate, to which a solution containing $75 \mu\text{M}$ 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), $120 \mu\text{M}$ NADPH, 4 U/ml glutathione reductase (GR) and 10 mM EDTA in 200 mM phosphate buffer at pH 8.0 was added. The absorbance was measured at 405 nm using a microwell system reader. The concentration of total glutathione (TG) and GSH were calculated using GSH as a standard and were normalized by protein concentration. The content of GSSG was calculated as follow: $\text{GSSG} = (\text{TG} - \text{GSH})/2$. GSSG is

equivalent to 2 GSH according to the following reaction: $\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{GSH} + \text{NADP}^+$ in the presence of GR. The results were expressed as percentages.

2.7.3 Lipid Peroxidation Measurements

Lipid peroxidation was evaluated using the method of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), as described previously (Bird and Draper, 1984). Briefly, the homogenate was incubated under agitation in a buffer containing 60 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 mM DPTA, 500 μl 12% TCA and 0.73% TBA. The mixture was boiled for 2 h, cooled on ice and centrifuged at 10000 rpm for 5 min. The absorbance of the supernatant was measured at 535 nm. The results were calculated using the molar extinction coefficient for malondialdehyde (the major substance) and expressed in nanomoles of TBARS per microgram of protein. Protein content was determined by Lowry's method (Lowry et al., 1951).

2.8 Reactive Oxygen Species (ROS) Detection

Intracellular ROS formation was determined using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), which is oxidized to dichlorofluorescein (DCF) in the presence of ROS (Sauer et al., 2003). 5×10^5 L1210 cells were incubated with the compounds (10 μM) for 4 h at 37 °C. After incubation the cells were washed with fresh culture medium and 10 μM DCFH-DA were added followed by 30 min at 37 °C and then washed four times with PBS. The DCF fluorescence signal was measured using a Perkin-Elmer LS55 spectrofluorometer. The results were normalized by the cell death percentage detected after 4 h of incubation.

2.9 Mitochondrial potential measurements

To explore the effect of maleimides on the mitochondrial membrane potential, the lipophilic cationic probe fluorochrome 5,5,8,6,6,8-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1) was used. JC-1 is a green fluorescent monomer at depolarized membrane potentials or a red fluorescent J-aggregate at hyperpolarized membrane potentials (Cossarizza et al., 1993; Salvioli et al., 1997). Cells were plated at 5×10^5 cells/well in 24-well dishes and treated with the maleimides for 1 h. Afterward, JC-1 (10 $\mu\text{g/ml}$) was added and incubated for 20 min at 37

°C (5% CO₂). The cells were washed twice with PBS, re-suspended in PBS, and an aliquot was used to measure the fluorescence in a spectrofluorometer (Perkin Elmer LS55). The excitation wavelength for JC-1 is 488 nm, and the red and green emission fluorescences were detected at 590 nm and 527 nm, respectively. The mitochondrial potential was presented as a ratio of 590/527 fluorescence and compared with the control. A decrease in the red/green ratio indicates a decrease in mitochondrial membrane potential. An electron transport chain uncoupler (FCCP 1 μM) was used as a positive control.

2.10 ATP Measurement

The intracellular ATP content was determined by a bioluminescence assay measuring the light output from the luciferin-luciferase reaction. First, 1×10^6 L1210 cells were treated with the compounds for 2, 4, 6 and 24 h. The cell extracts were obtained by homogenization with 1.25% trichloroacetic acid, then kept on ice for 30 min and neutralized with 1 M Tris-acetate at pH 7.5. After centrifugation, the supernatants were used for ATP quantification following the manufacturer's protocol. The results were normalized by the cell death percentage that occurs during the respective period of incubation.

2.11 Statistical Analysis

The results were expressed as the means \pm S.E.M. All results were statistically evaluated by variance analysis. Post hoc comparisons of individual means with the controls were completed using the Dunnett multiple comparison test. Values of $P < 0.05$ were considered significant.

3. RESULTS

Nine maleimides were tested and six of them induced significant cytotoxicity and antiproliferative activity against L1210 cell line, presenting relatively low IC₅₀ values which decrease after cells treatment in different times of incubation (Table 1).

Table 1

Cytotoxicity of maleimides toward L1210 leukemia cells.

Time (h)	Mean IC ₅₀ (μM)					
	M2	M4	M5	M6	M7	M9
24	17 ± 1.1	26 ± 1.3	15.2 ± 1.0	19.5 ± 1.2	14.9 ± 0.8	12.4 ± 0.9
48	12 ± 0.9	16.3 ± 0.8	12.2 ± 0.9	10.8 ± 1.2	11.1 ± 0.9	8.2 ± 1.0
72	8.2 ± 0.9	8.2 ± 0.9	10.1 ± 1.1	9.2 ± 0.9	6.4 ± 1.0	4.4 ± 1.2

Cell viability was assayed by MTT. IC₅₀ in μM ± S.E.M

The maleimides also induced cell death by apoptosis, characterized by DNA internucleosomal breakdown (Fig. 2) and by the acridine orange/ ethidium bromide test (Fig 3).

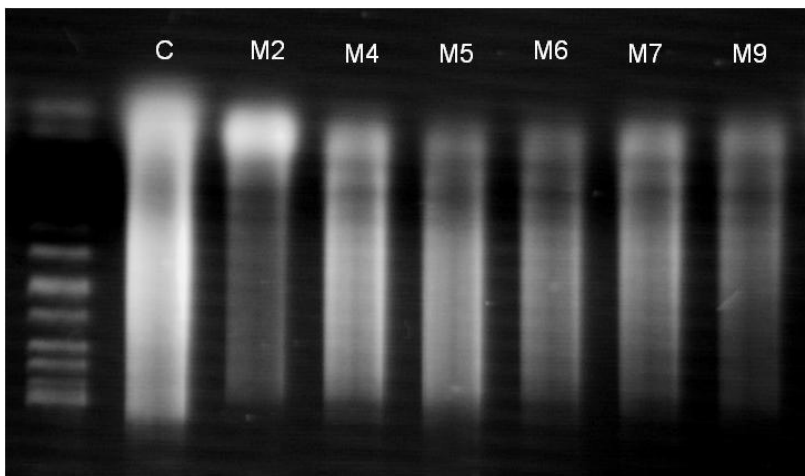


Fig. 2. DNA fragmentation in L1210 cells induced by maleimide derivatives. The cells (3×10^6) were treated with the compounds $10 \mu\text{M}$ for 24 h. The DNA was analyzed by agarose gel electrophoresis.

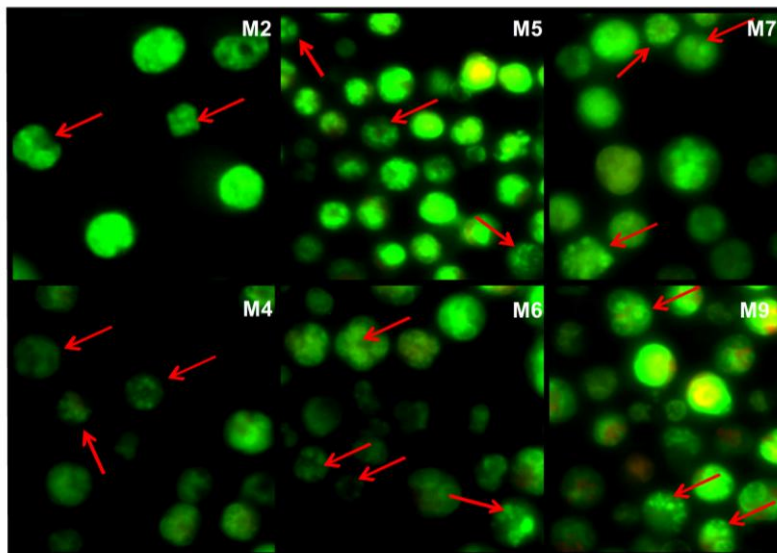


Fig. 3. Images of apoptotic L1210 cells stained with acridine orange/ethidium bromide. At 400 X magnification.

The results showed in the Figure 2 and 3 can be related with cell death by apoptosis.

The cytotoxic effects of maleimides on L1210 cells may be associated to high levels of reactive oxygen species production. Thus we evaluated the cytotoxicity of maleimides combined with catalase or quercetin (Table 2). All treatments associated with catalase increased cell viability indicating that the probably mechanism of action of maleimides may be implicated with generation or diminished detoxification of reactive oxygen species, principally the hydrogen peroxide. The association between maleimide and quercetin increased the percentage of viable cell, although only the treatment with M4 was statistically significant. Quercetine also did not show cytotoxicity at the concentration used, although the literature describes it may have antitumoral activity.

Table 2

Comparison of cell viability between treatments with maleimide derivatives alone (15 μ M) and associated with catalase (1000 U) or quercetin (25 μ M) against L1210 cells.

Treatment (15 μ M)	Viable cells (%)		
	Maleimide	Maleimide plus catalase	Maleimide plus quercetin
M2	27.3 \pm 3	59.2 \pm 4.7 ^{**}	43.3 \pm 4
M4	38.3 \pm 0.7	69.6 \pm 1.4 ^{**}	56 \pm 4 ^{**}
M5	34 \pm 3	66.4 \pm 4 ^{**}	50.3 \pm 6
M6	36.7 \pm 3.2	53.3 \pm 4.4 [*]	44.2 \pm 3.5
M7	36.5 \pm 3.8	58.8 \pm 4.3 [*]	44.6 \pm 4
M9	28.8 \pm 2	50.9 \pm 3.1 ^{**}	28.5 \pm 1.2

* P<0.05 ; ** P<0.01

The activities of enzymatic defenses against ROS attack in L1210 cell line were evaluated after treatment with maleimides, including catalase, glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase and glutathione reductase. The maleimide derivatives inhibited the catalase activity (Fig. 4A) and the GPx activity was increased (Fig. 4B). The function of GPx is supplementary to catalase activity in elimination of H₂O₂ especially in tissues or compartments which devoid this enzyme. The increase of GPx activity is related probably with catalase inhibition and peroxides levels increase, and also due to the increase of ROS generation by maleimides (Fig. 6A). The maleimides significantly inhibited the activity of GR (Fig. 4D) and presented distinct action on GST activity which is important to cellular defenses in detoxification process (Fig. 4C).

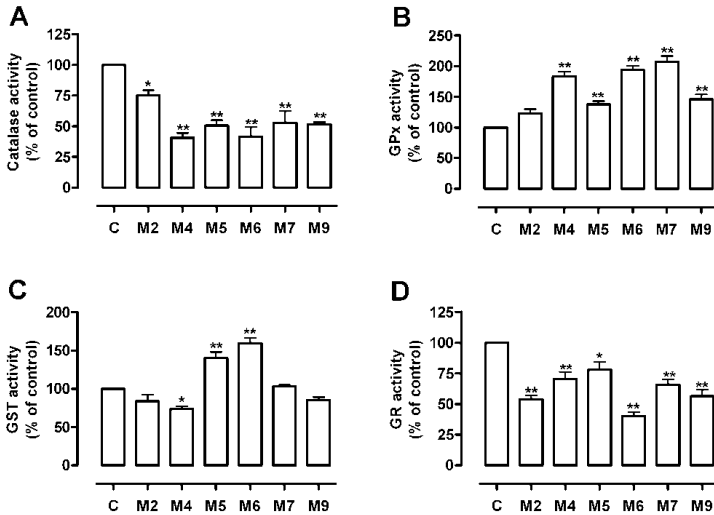


Fig. 4. Effect of maleimides on L1210 antioxidant enzymes activities. Cells were incubated for 24 h with maleimides (10 μ M). The results were presented as percentage of the control. (A): catalase; (B) glutathione-peroxidase; (C) glutathione-S-transferase; (D) glutathione reductase. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

All maleimides increased glutathione oxidized (Fig. 5A). Only M2 significantly increased GT content (Fig. 5B) and all of them did not change GSH content (Fig. 5C). The ratio of GSH/GSSG of control was 1.63 and the values decreased with treatments: M2 (1.18); M4 (1.46); M5 (1.36); M6 (1.32); M7 (1.30) and M9 (1.34).

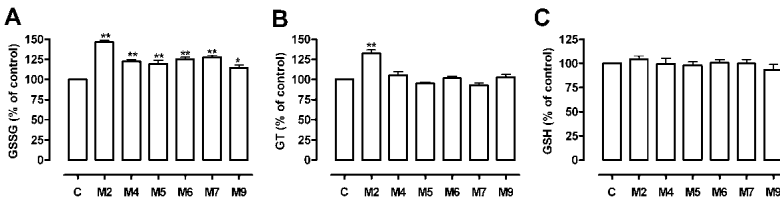


Fig. 5. Effect of maleimides on glutathione content in L1210. The cells were incubated for 24 h with maleimides (10 μ M). The results are

presented as percentages of the controls. Content of (A): GSSG; (B) GT and (C) GSH. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Due to the decrease in maleimides cytotoxicity in the presence of catalase (Table 2), we evaluated the generation of ROS using DCFH-DA, fluorescence probe which is oxidized in the presence of reactive species, and by prolonged lipid peroxidation. All maleimides significantly increased the ROS generation (Fig. 6A), with probable involvement of H_2O_2 , because the compounds inhibited the catalase activity (Fig. 4A). Also, all maleimides induced lipid peroxidation of cell membrane, but the effect was significant only for M2, M6, M7 and M9 (Fig. 6B).

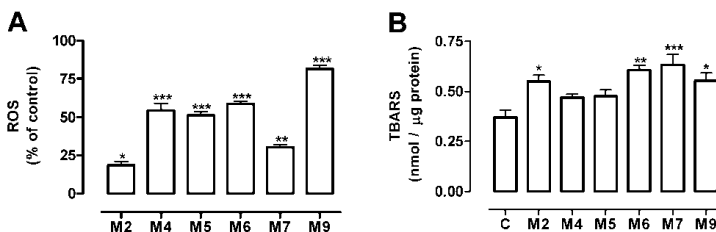


Fig. 6. Effects of maleimides in ROS generation and lipid peroxidation in L1210 cells. The cells were incubated with maleimides (10 μ M) for 24 h. (A) ROS formation was detected by DCFH-DA. The results are expressed as percentage of the control cellular fluorescence (zero % fluorescence). (B) Lipid peroxidation was measured by the TBARS method. The results are expressed as nmol TBARS/ μ g protein. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

The generation of ROS induced by maleimides is an inevitable consequence of mitochondrial respiration, whose ATP requirements are correlated with the level of metabolic activity. Thus, we evaluated the effect of maleimides on mitochondrial membrane potential and on intracellular ATP concentration.

The maleimides reduced the mitochondrial membrane potential in approximately 60% in relation to the control (Fig. 7). Carbonylcyanide-*p*-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP), a molecule with known properties of disturbing mitochondrial membrane potential was used as an assay control, reduced 30%.

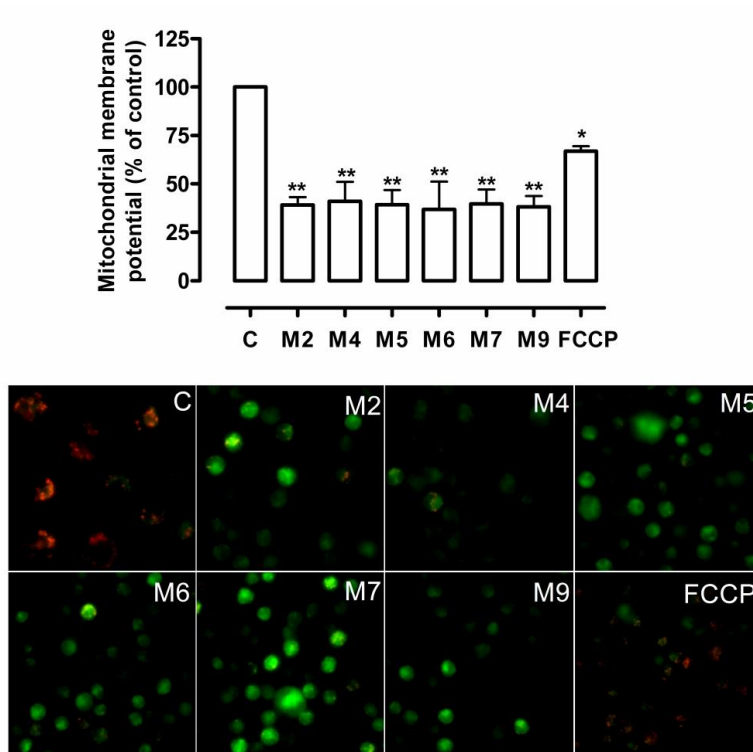


Fig. 7. Effects of maleimides on mitochondrial membrane potential of L1210 cells. The cells were incubated with maleimides (M2, M4, M5, M6, M7, M9) at 10 μ M and FCCP 1 μ M for 4 h. The images were obtained by fluorescence microscopy at 400 x magnification and the membrane potential was quantified spectrofluorimetrically. The results are expressed as percentage and the values of the controls were considered 100%. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

As mitochondria are responsible by 80% of ATP production to cell surviving and the maleimides are able to disturb the mitochondrial membrane potential and promoted cell death, it was expected that ATP intracellular concentration would change. Except the M7, the other maleimides firstly increased the level of ATP (after 2 h of incubation with maleimides) and lately, the compounds promoted ATP depletion (Fig. 8). M7 decreased the level of ATP from the beginning.

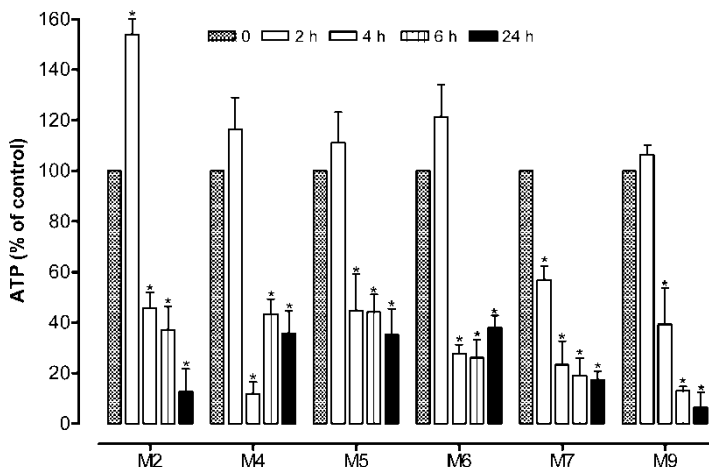


Fig. 8. Effect of maleimides on intracellular ATP concentration of L1210 cells. The cells were incubated for 2, 4, 6 and 24 h with maleimides (10 μ M) and the results were presented as percentage of the control. ATP concentration was monitored by the luciferin-luciferase assay. * $p < 0.05$.

4. Discussion

The results of this study demonstrated that murine lymphoblastic leukemia (L1210) cells present significantly susceptibility to maleimides because low concentrations of the compounds induced cell death and changed important parameters of cellular viability. Yunes et al. (2008), reported that maleimide derivatives showed cytotoxicity and antiproliferative activities at concentrations between 10 and 100 μ M against endothelial cells and K562 leukemic cell line.

Prado et al. (2004), also showed a decreased on the viability of peritoneal macrophages and B16F10 melanoma cells after incubation these cells with cyclic imides, including maleimide derivatives.

The respective maleimides acid forms and maleimides with a carbon chain between the imide ring and aromatic ring presented no effect on cell viability (data not shown), indicating that to antileukemic activity is necessary the integrity of imide ring. Yunes et al. (2008),

reported that the imide and aromatic rings must be directly bound, since any separation of methylene groups generates inactive compounds (e.g. M10), and imide ring should be planar and must have double bonds.

Similarly the relation between maleimides chemical structure and its biological activity were showed by Sortino et al. (2008). The authors reported that antifungal activities of maleimides were related with intact maleimide ring.

The maleimides studied here induced cell death by apoptosis observed by DNA breakdown pattern. Moreover, the apoptotic bodies formation were observed in cells by double staining with acridine orange/ethidium bromide, confirming the kind of cell death. Probably the maleimides induce apoptosis-independent of caspases via, because they did not change the caspase 3 and caspase 8 activities (data not shown), or by others caspases which were not evaluated.

The development of drugs that can effectively trigger apoptosis in cancer cells has been receiving considerable attention, and several imide derivatives, including maleimide compounds are presenting potential cytotoxic, DNA binders and apoptosis inducers (Wang et al., 2000; Abdel-Aziz, 2007; Cui et al., 2010). A series of novel 7-azaindazolyl-indolyl-maleimides showed moderate antiproliferative activity and induced apoptosis in human cancer cell lines including K562 (human erythromyeloblastoid leukemia) and different carcinomas cell lines (Ye et al., 2009).

The increased L1210 cells viability when incubated concomitantly maleimides and catalase, and the inhibition of catalase activity by maleimides indicate that their possible mechanism of cytotoxicity is related with oxidative stress, principally by accumulation of H_2O_2 .

H_2O_2 is one of the major ROS in the cell and the catalase is the primary and most efficient enzyme that reacts with H_2O_2 to form water and molecular oxygen. H_2O_2 low levels results in apoptosis, high levels can lead to necrosis or caspase-independent apoptosis (Curtin et al., 2002).

A differential cytotoxic effect towards tumor cells may be possible based on reduced ability to scavenging free radicals, due to the inhibition of enzymatic antioxidants activities or increase in the generation of ROS (Tisdale and Mahmoud, 1983; Pelicano et al., 2004).

The L210 cell line typically exhibits enzymatic and non-enzymatic processes for cytoprotection against oxidative damage. Depletion of ROS by overexpression of antioxidant enzymes such GSH-peroxidase or catalase, or by antioxidants, prevents cell death triggered

by TNF- α , cytotoxic drugs, UV, and irradiation (Lin et al., 1993; Huang et al., 2003).

Lin et al. (1993), related that Se-deprived leukemia cells, which are severely deficient in glutathione peroxidase activity, are much more vulnerable to the cytotoxic effects of drugs, and these cells accumulate markers of oxidative damage more rapidly than the controls, e.g., lipid hydroperoxides and thiobarbituric acid-reactive compounds.

Kiyomiya et al. (2001), found lower levels of antioxidants enzymes such SOD, GPx and CAT in the mitochondria of L1210 cells. Thus, is probably that maleimide derivatives exert cytotoxic effects on L1210 cells through the accumulation of ROS due to inhibition of radical scavenging enzymes and by generation of oxidative stress, as evidenced experimentally by the increase of ROS cell content (Fig. 6A) and lipid peroxidation (Fig. 6B). The lipid peroxidation decreases the fluidity of the biological membranes and increases the membrane permeability (Pelicano et al., 2004). There are evidences that these effects could induce the release of proteins from the mitochondria inner membrane which is critical event in the induction of cell death dependent and independent of caspase activation as cytochrome c, Smac/Diablo and apoptosis-inducing factor (AIF) (Okada and Mak, 2004; Dias and Bailly, 2005; Kong et al., 2006).

In previous studies, our group have shown that free radical generation in tumor cells may be implicated in a redox potential alteration inducing cell death by apoptosis, probably through cytochrome c release (Locatelli et al., 2008; Locatelli et al., 2009). Winter et al. (2010), also reported cytotoxicity and apoptosis cell death was induced by mitochondrial injury and oxidative stress in L1210 cell incubated with naphthylchalcones.

The idea of inducing cancer cell death by ROS-mechanisms is based on the different redox states in normal and tumor cells, because many types of malignant cells present increased levels of ROS, and the levels of enzymatic defenses altered, suggesting stress adaptation. Therefore, tumor cells present increased intrinsic oxidative stress and handling ROS levels by redox manipulation using drugs is an important strategy to induce cell death (Tisdale and Mahmoud, 1983; Trachootham et al., 2009).

The use of pharmacological agents that promote ROS generation in cancer cells have been effective in many cases, however the resistance to those agents may also be developed; for example, multidrug resistant HL-60 leukemia cells were shown to be resistant to the cytotoxic effect of H₂O₂ due to the elevated levels and high activity

of catalase (Trachootham et al., 2009). Also, Pelicano et al. (2004), reported that recent studies demonstrated a significantly increased in the expression of superoxide dismutase and catalase in chronic lymphocytic leukemia and ovarian cancer, suggesting that malignant cells of different cancer types exhibit heterogeneity in levels of oxidative stress and antioxidant mechanisms, and can develop resistance by overexpression of antioxidant enzymes.

Additionally, ROS generation can be associated with the malfunction of the mitochondrial respiratory chain which can initiate the apoptotic event. The incubation of L1210 cells with maleimides induced depletion of intracellular ATP (Fig. 8) and loss of mitochondrial membrane potential (Fig. 7).

Here we showed that initially, the ATP concentration increased (except with M7) and later it was drastically reduced. This effect is related to apoptosis, because apoptosis cell death requires ATP. One evident physiological difference in cells undergoing apoptosis versus necrosis is the intracellular levels of ATP, which are rapidly decreased in necrotic cell death and only later in apoptotic cell death. The apoptosis depends on initially intracellular ATP levels (Eguchi et al., 1997).

Loss of mitochondrial membrane potential induced by maleimides is important event to cell death, since mitochondria play a central role in different cell death pathways leading to either apoptosis or necrosis. The mitochondrial transmembrane depolarization result in formation of mitochondrial permeability transitory pore, and the mitochondria loss their membrane permeability control, releasing internal proteins that signaling of different pathways that lead to cell death, principally apoptosis (Grenn; Reed, 1998; Galindo et al., 2003).

Summarizing, the maleimide derivatives presented cytotoxicity inducing apoptosis in L1210 cell by distinct mechanisms. The maleimides increased oxidative stress by inhibition of antioxidants enzymes and ROS generation. Also, they promoted depletion of ATP and loss of mitochondrial membrane potential.

References

1. Abdel-Aziz, A. A. M. Novel and versatile methodology for synthesis of cyclic imides and evaluation of their cytotoxic, DNA binding,

apoptotic inducing activities and molecular modeling study. *Eur J Med Chem.*, v. 42, p. 614-626, 2007.

2. Aebi, H. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*, v. 105, p.121-6, 1984.

3. Baskić, D.; Popović, S.; Ristić, P.; Arsenijević, N. A. Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: Fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. *Cell Biology International*, v. 30, p. 924-932, 2006.

4. Belson, M.; Kingsley, B.; Holmes, A. Risk factors for acute leukemia in children: a review. *Environ Health Perspect.*, v. 115, p. 138-145, 2007.

5. Bird, R. D.; Draper, A. H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. *Methods in Enzymology*, v. 90, p. 105-10, 1984.

6. Burke, V. P.; Startzell, J. M. The leukemias. *Oral Maxillofacial Surg Clin N Am* v. 20, p. 597–608, 2008. doi:10.1016/j.coms.2008.06.011

7. Carlberg, I.; Mannervik, B. Purification and characterization of flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, v. 250, p. 5475-5480, 1975.

8. Cechinel-Filho, V.; Campos, F.; Corrêa, R.; Yunes, R. A.; Nunes, R. J. Aspectos químicos e potencial terapêutico de imidas cíclicas: uma revisão da literatura. *Quim. Nova*, v. 26, p. 230-241, 2003.

9. Cossarizza, A.; Baccarani Contri, M.; Kalashnikova, G.; Franceschi, C. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 197, n. 1, p. 40-45, 1993.

10. Cui, S. X.; Qu, X. J.; Gao, Z. H.; Zhang, Y. S.; Zhang, X. F.; Zhao, C. R.; Xu, W. F.; Li, Q. B.; Han, J. X. Targeting aminopeptidase N (APN/CD13) with cyclic-imide peptidomimetics derivative CIP-13F

inhibits the growth of human ovarian carcinoma cells. *Cancer Letters*, v. 292, p. 153-162, 2010.

11. Curtin, J. F.; Donovan, M.; Cotter, T. G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *Journal of Immunological Methods*, v. 265, p. 49-72, 2002.

12. Eguchi, Y.; Shimizu, S.; Tsujimoto, Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer research*, v. 57, p. 1835-1840, 1997.

13. Faderl, S.; Jeha, S.; Kantarjian, H. M. The biology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*, v. 98, p. 1337-1354, 2003.

14. Flohé, L.; Gunzler, W. A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, v.105, p.114-121, 1984.

15. Galindo, M. F.; Jordán, J.; González-García, C.; Ceña, V. Reactive oxygen species induce swelling and cytochrome c release but no transmembrane depolarization in isolated rat brain mitochondria. *British Journal of Pharmacology*, v. 139, 797-804, 2003.

16. Green, D. R.; Reed, J. C. Mitochondria and apoptosis. *Science*, v. 281, p. 1309-1312, 1998.

17. Han, R. Research and development of anticancer drugs and experimental techniques, Pekin Medical University, Pekin Union Medical Collage Joint Publishing House, Beijing, 1997, 395.

18. Huang, H. L.; Fang, L. W.; Lu, S. P.; Chou, C. K.; Luh, T. Y.; Lai, M. Z. DNA-damaging reagents induce apoptosis through reactive oxygen species-dependent Fas aggregation. *Oncogene*, v. 22, p. 8168–8177, 2003.

19. Kalgutkar, A. S.; Crews, B. C.; Marnett, L. J. Design, synthesis, and biochemical evaluation of *N*-substituted maleimides as inhibitors of prostaglandin endoperoxide synthases, *J. Med. Chem.* 39 (1996) 1692-1703.

20. Keen, J. B.; Habig, W. H.; Jakoby, W. B. Mechanism for several activities from glutathione S-transferase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 251, p. 6183-6188, 1976.
21. Kiyomiya, K-I.; Matsuo, S.; Kurebe, M. Difference in intracellular sites of action of Adriamycin in neoplastic and normal differentiated cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, v. 47, p. 51-56, 2001.
22. Kong, X.; Ge, H.; Hou, L.; Shi, L.; Liu, Z. Induction of apoptosis in K562/ADM cells by gamma-linolenic acid involves lipid peroxidation and activation of caspase-3. *Chemico-Biological Interactions*, v. 162, p. 140-148, 2006.
23. Lin, F.; Thomas, J. P.; Girotti, a. W. Hyperexpression of catalase in selenium-deprived murine L1210 cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 305, p. 176-185, 1993.
24. Locatelli, C.; Rosso, R.; Santos-Silva, M. C.; Souza, C. A.; Licínio, M. A.; Leal, P.; Bazzo, M. L.; Yunes, R. A.; Creczynski-Pasa, T. B. Ester derivatives of gallic acid with potential toxicity toward L1210 leukemia cells. *Bioorg. Med. Chem.* v.16, p. 3791-3799, 2008.
25. Locatelli, C.; Leal, P. C.; Yunes, R. A.; Nunes, R. J. Creczynski-Pasa, T. B. Gallic acid ester derivatives induce apoptosis and cell adhesion inhibition in melanoma cells: The relationship between free radical generation, glutathione depletion and cell death. *Chem. Biol. Interact.*, v. 181, p. 175-184, 2009.
26. Lowry, O.H.; Rosebrough, N. J.; Farr, L.; Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265-75, 1951.
27. Mao, X.; Yu, C. R.; Li, W. H; Li, W. X. Induction of apoptosis by shikonin through a ROS/JNK-mediated process in Bcr/Abl-positive chronic myelogenous leukemia (CML) cells. *Cell Research*, v. 18, p. 879-888, 2008.
28. Pelicano, H.; Carney, D.; Huang, P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resistance Updates*, v. 7, p. 97-110, 2004.

29. Plasschaert, S. L. A.; Kampha, W. A.; Vellengab, E.; Vriesc, E. G. E.; Bonta, E. S. J. M. Prognosis in childhood and adult acute lymphoblastic leukaemia: a question of maturation? *Cancer Treatment Reviews*, v. 30, p. 37–51, 2004.
30. Prado, S. R.; Cechinel-Filho, V.; Campos-Buzzi, F.; Corrêa, R.; Cadena, S. M.; de Oliveira, M. B. Biological evaluation of some selected cyclic imides: mitochondrial effects and in vitro cytotoxicity. *Z. Naturforsch.*, v. C59, p. 663-672, 2004.
31. Pui, C. H.; Jeha, S. New therapeutic strategies for the treatment of acute lymphoblastic leukaemia. *Nature Reviews*, v. 6, p. 149-165, 2007.
32. Pulte, D.; Gondos, A.; Brenner, H. Improvement in survival in younger patients with acute lymphoblastic leukemia from the 1980s to the early 21st century
33. Salvioli, S.; Ardizzoni, A.; Franceschi, C.; Cossarizza, A. JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess $\Delta\psi$ changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Lett.*, 411 (1997) 77-82.
34. Sauer, H.; Wefer, K.; Vetrugno, V.; Pocchiari, M.; Gissel, C.; Sachinidis, A.; Hescheler, J.; Wartenberg, M. Regulation of intrinsic prion protein by growth factors and TNF-alpha: the role of intracellular reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.*, v. 35, n. 6, p. 586-594, 2003.
35. Sortino, M.; Cechinel-Filho, V.; Corrêa, R.; Zacchino, S. N-Phenyl and N-phenylalkyl-maleimides acting against *Candida* spp.: time-to-kill, stability, interaction with maleamic acids. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 16, p. 560-568, 2008.
36. Stahnke, K.; Eckhoff, S.; Mohr, A.; Meyer, L. H.; Debatin, K-M. Apoptosis induction in peripheral leukemia cells by remission induction treatment in vivo: selective depletion and apoptosis in a CD34⁺ subpopulation of leukemia cells. *Leukemia*, v. 17, p. 2130–2139, 2003. doi:10.1038/sj.leu.2403144
37. Tietze, F. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to

mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry*, v. 27, p. 502-22, 1969.

38. Tisdale, M. J.; Mahmoud, M. B. Activities of free radical metabolizing enzymes in tumours. *Br. J. Cancer*, v. 47, p. 809-812, 1983

39. Trachootham, D.; Alexandre, J. Huang, P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov.*, v. 8, p. 579-591, 2009.

40. van de Loosdrecht, A. A.; Nennie, E.; Ossenkoppele, G. J.; Beelen, R. H.; Langenhuijsen, M. M. Cell mediated cytotoxicity against U 937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study. *J. Immunol. Methods*, v. 141, p. 15-22, 1991.

41. Vitale, A.; Guarini, A.; Chiaretti, S.; Foà, R. The changing scene of adult lymphoblastic leukemia. *Curr Opin Oncol.*, v. 18, p. 652-659, 2006.

42. Wang, J. J.; Liu, T. Y.; Yin, P. H.; Wu, C. W.; Chern, Y. T.; Chin, C. W. Adamantyl maleimide induced changes in adhesion molecules and ROS are involved in apoptosis of human gastric cancer cells. *Anticancer Res.*, v. 20, p. 3067-3073, 2000.

43. Winter, E., Chiaradia, L. D.; Cordova, C. A. S.; Nunes, R. J.; Yunes, R. A.; Creczynski-Pasa, T. B. Naphthylchalcones induce apoptosis activation in a leukemia cell line: The relationship between mitochondrial damage, oxidative stress and cell death.

44. Ye, Q.; Cao, J.; Zhou, X.; Lv, D.; He, Q.; Yang, B.; Hu, Y. Synthesis and evaluation of novel 7-azaindazolyl-indolyl-maleimide derivatives as antitumor agents and protein kinase C inhibitors. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, v. 17, p. 4763-4772, 2009.

45. Yunes, J. A.; Cardoso, A. A.; Yunes, R. A.; Corrêa, R.; Campos-Buzzi, F.; Cechinel-Filho, V. Antiproliferative effects of a series of cyclic imides on primary endothelial cells and a leukemia cell line. *Z. Naturforsch.*, v. C63, p. 675-680, 2008.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A necessidade do desenvolvimento de novos fármacos, que sejam efetivos contra algumas doenças ainda sem tratamento adequado e/ou que possam substituir os existentes a custos menores, e dotados de menos efeitos adversos, tem impulsionado a comunidade científica a novas e incessantes pesquisas. Muitas classes de compostos orgânicos têm demonstrado promissores efeitos biológicos em estudos pré-clínicos e clínicos avançados e pormenorizados, tais como os derivados de imidas cíclicas, cuja diversidade de efeitos terapêuticos varia de acordo com o núcleo químico e propriedades físico-químicas de cada molécula (CECHINEL FILHO *et al.*, 2003).

As imidas cíclicas são divididas em subclasses, sendo as mais estudadas as glutarimidas, maleimidas e succinimidas. As maleimidas avaliadas neste trabalho são amplamente citadas na literatura por suas propriedades biológicas dentre as quais: atividade antibacteriana, antifúngica, analgésica e antiespasmódica (CECHINEL FILHO *et al.*, 1998; 2003; SORTINO *et al.*, 2008).

Os resultados e discussão estão apresentados separadamente para cada artigo.

3.1 N-PHENYL-MALEIMIDE DERIVATIVES AS MIMETIC AGENTS OF THE PRO-INFLAMMATORY PROCESS: MYELOPEROXIDASE ACTIVATION

A inflamação é uma resposta de defesa que ocorre após dano celular causado por agentes biológicos, químicos e ou físicos. Inicia-se com uma resposta aguda, caracterizada por uma série de eventos inter-relacionados, entre os quais o aumento no fluxo sanguíneo e permeabilidade vascular na região afetada, exsudação de fluídos, dor localizada, migração e acúmulo de leucócitos inflamatórios dos vasos sanguíneos para dentro do tecido, e por fim formação de tecido de granulação e reparo tecidual (SUNDERKÖTTER *et al.*, 2003).

Os neutrófilos (leucócitos polimorfonucleares) são as células mais abundantes na circulação, e participam ativamente da defesa imune inata do homem, juntamente com outros fagócitos. Os neutrófilos são as primeiras células a serem mobilizadas para o foco de injúria tecidual, e atuam fagocitando e matando o agente invasor (FREITAS *et al.*, 2008).

No entanto, também são os neutrófilos os maiores responsáveis pela inflamação e dano tecidual em doenças não infecciosas, como artrites, aterosclerose, complicações cardiovasculares, entre outras (KLEBANOFF, 2005; FREITAS *et al.*, 2008).

De maneira geral, a resposta inflamatória é benéfica ao organismo, pois atua limitando a proliferação de patógenos invasores, promove reparo tecidual e re-estabelece a homeostasia do organismo. Entretanto, uma inflamação extensiva, prolongada ou não regulada é altamente prejudicial. Comumente, os danos mediados pelos neutrófilos são consequência dos produtos de degranulação, principalmente da ação catalítica de enzimas presentes nos grânulos específicos e azurofílicos.

Os neutrófilos são ativados no foco inflamatório tanto pelo contato direto com o agente invasor como por citocinas secretadas por células teciduais, o que resulta na secreção do conteúdo tóxico de seus grânulos. Dentre as moléculas tóxicas liberadas estão incluídas as espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, além de várias proteases e da mieloperoxidase (ciclooxigenase-heme peroxidase). As ações deletérias destes agentes tóxicos não discriminam entre os alvos microbianos e as células do hospedeiro, e por isso, a resposta exacerbada do conteúdo destes leucócitos está relacionada a complicações e desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas (MEDZHITOV, 2008).

Sequencialmente, os neutrófilos ativados liberam primeiramente o conteúdo dos grânulos específicos (lactoferrina, colagenase, gelatinase e catelicidina), e terciários (gelatinase); e finalmente, os grânulos azurofílicos que contêm a enzima mieloperoxidase, principal componente, além de proteases e componentes antibacterianos (WITKO-SARSAT *et al.*, 2000).

Os fagócitos em geral, mais significativamente os neutrófilos, são as maiores fontes geradoras de espécies reativas. O ácido hipocloroso (HClO), é o principal agente oxidante formado a partir da reação de oxidação entre o peróxido de hidrogênio e o íon cloreto, catalisado pela mieloperoxidase (WITKO-SARSAT *et al.*, 2000; CURTIN; DONOVAN; COTTER, 2002; KNAAPEN *et al.*, 2006; YAP; WHITEMAN; CHEUNG, 2007).

Além da ação pró-inflamatória e microbicida, a ativação de neutrófilos e consequente liberação, principalmente de mieloperoxidase, induzem o estresse oxidativo no tecido-alvo. Por esta razão, a mieloperoxidase está diretamente relacionada às doenças degenerativas, complicações cardiovasculares, entre outras doenças. Assim, a literatura descreve inúmeros estudos com moléculas capazes de impedir a ação da

mieloperoxidase e/ou de seu produto, como importante alvo para a terapêutica preventiva e curativa dos danos gerados por sua ação catalítica.

Resumidamente, as possíveis estratégias terapêuticas, objetivando a inibição da mieloperoxidase, podem ser obtidas através de diferentes estratégias, tais como: bloqueio do sítio ativo da mieloperoxidase de forma competitiva e ou irreversível; desvio do ciclo catalítico e ou ciclo de cloração da enzima e, substâncias antioxidantes e ou sequestradoras do ácido hipocloroso, a fim de prevenir a iniciação e propagação da oxidação de macromoléculas biológicas (KNAAPEN *et al.*, 2006; MALLE *et al.*, 2007).

Entretanto, são muitos os desafios para a descoberta de tais moléculas, dentre os quais, destaca-se: como inibir a mieloperoxidase persistentemente ativada e não afetar sua ação microbicida e essencial na resposta imune inata?

Neste contexto, insere-se a ação das maleimidadas, *N*-fenilmaleimida (NFM; M2) e 4-metil-*N*-fenilmaleimida (Me-NFM; M5), como possíveis ferramentas farmacológicas para estudos *in vitro* e *in vivo*, na busca por moléculas que possam inibir a ação da mieloperoxidase.

As maleimidadas supracitadas induziram potencialmente a atividade da mieloperoxidase presente em homogenato de pulmão, assim como a enzima isolada, obtida comercialmente e a enzima proveniente da lise de cultura de neutrófilos. A Me-NFM foi mais efetiva e ativou de forma significativa a atividade da mieloperoxidase em todos os testes. Os $K_{0.5}$ obtidos foram de 84; 63 e 54 μM , respectivamente, para cada ensaio. Outros derivados maleimídicos testados, não induziram a atividade catalítica da mieloperoxidase, e nem inibiram sua atividade enzimática.

A propriedade de aumentar a atividade catalítica da mieloperoxidase mediada pelas maleimidadas NFM e Me-NFM, apresentou relativa seletividade, pois em peroxidases de plantas, como a HRP (peroxidase de raiz forte), as maleimidadas promoveram um menor aumento da atividade enzimática. Este aumento foi de no máximo 30% até a concentração de 50 μM . Concentrações mais elevadas diminuíram a atividade catalítica drasticamente, indicando possível desnaturação da enzima. Adicionalmente, as maleimidadas apresentaram pouca atividade “scavenger”, pois sequestraram em média 30% do ácido hipocloroso gerado no ensaio, na maior concentração testada (100 μM).

Em avaliações *in vivo*, a Me-NFM também ativou a mieloperoxidase obtida após lise dos neutrófilos coletados na bolsa de ar induzida no dorso dos animais. Ainda, o tratamento aumentou

significativamente a migração de leucócitos mononucleares e polimorfonucleares, incluindo os neutrófilos, quando comparado aos animais tratados com carragenina, principal agente flogístico utilizado em modelos de inflamação para ensaios pré-clínicos, indicando possível aplicação como ferramenta farmacológica, para avaliação de substâncias com potencial atividade anti-inflamatória.

Analisando somente sob o enfoque de que a mieloperoxidase deve ser inibida como medida preventiva de doenças crônicas, as maleimidas parecem úteis somente para induzir migração e ativação de células pró-inflamatórias para estudos *in vitro* e *in vivo*. No entanto, deve-se salientar que muitos autores indagam o quanto é boa ou ruim, a inibição e/ou indução da mieloperoxidase, pois, a inibição compromete a resposta do sistema imune inata, e, a indução potencializa respostas pró-inflamatórias e possíveis danos teciduais.

Vários relatos destacam que a deficiência total e/ou parcial da mieloperoxidase está relacionada com alta incidência de infecções, e também risco de desenvolvimento de tumores, pois o ácido hipocloroso gerado, também regula o crescimento celular através da ativação de proteínas supressoras de tumor e outros fatores de transcrição (WINTERBOURN; VISSERS; KETTLE, 2000; KLEBANOFF, 2005; LAU; BALDUS, 2006).

Sob este ponto de vista, a ativação da mieloperoxidase poderia ser benéfica, pois aumentaria a eficácia da resposta imune inata frente à micro-organismos e células neoplásicas. Discutindo ainda a importância da ativação de neutrófilos e o papel da mieloperoxidase, não há dúvidas sobre o importante papel destes como agentes de primeira defesa, mas, por mecanismos ainda não compreendidos, e até mesmo controversos, os neutrófilos parecem promover reações imunes contra células tumorais (DRANOFF, 2004; ZIVKOVIC *et al.*, 2007).

Zivkovic e colaboradores (2007), descrevem vários estudos que relatam a citotoxicidade dos neutrófilos contra células tumorais em ensaios *in vitro* e *in vivo*. A ativação da fagocitose no local da inflamação gera intensa produção de espécies reativas, e liberação de enzimas hidrolíticas. Estes mediadores, principalmente as espécies reativas, podem atuar fisiologicamente como reguladores de outras células do sistema imune e também sobre o processo apoptótico.

Algumas citocinas liberadas em resposta à injúria tissular mediada por processos infecciosos, inflamatórios e carcinogênicos, podem atuar estimulando a resposta do hospedeiro para resolução do dano celular, e também atuam inibindo e/ou promovendo, a formação e progressão do tumor, dependendo da citocina liberada. A interleucina 12

(IL-12) secretada por macrófagos, células dendríticas e neutrófilos, atuam inibindo quimicamente a carcinogênese, através do aumento da resposta imune e citotóxica dos linfócitos Th₁, além inibir a angiogênese (DRANOFF, 2004).

Segundo Dranoff (2004), as células tumorais expressam antígenos que podem ser reconhecidos pelo sistema imune inato e adaptativo. Predominam dois mecanismos: o sistema imune inato detecta moléculas relacionadas a genes induzidos por estresse, presentes na superfície da membrana da célula tumoral e que funcionam como ligantes de receptores expressos nas células NKs (Natural Killer) e outros fagócitos; e/ou outras proteínas padrões de reconhecimento. O outro mecanismo refere-se ao reconhecimento das células tumorais pelas células NK, alguns fagócitos e principalmente os linfócitos, através da menor expressão das moléculas do complexo de histocompatibilidade de classe I.

Resultados obtidos em experimentos *in vivo*, avaliando a citotoxicidade dos neutrófilos contra células de melanoma murino (B16F10), apontam que os neutrófilos parecem ser ativados pelas células tumorais de forma semelhante dos patógenos, através da ativação de receptores TLR (receptores da família toll-like). A ativação destes receptores induz o “burst” oxidativo, aumentando significativamente a concentração de espécies reativas, e conseqüente aumento da peroxidação lipídica e produção de fatores supressores de crescimento, tal como o 4-hidroxinonenal (ZIVKOVIC *et al.*, 2007).

Entretanto, vários estudos demonstram que a inflamação, principalmente processos crônicos, pode iniciar e promover a transformação de oncogenes. As células tumorais podem induzir um microambiente que favoreça a progressão do tumor, mediado por citocinas e quemocinas liberadas pelas células pró-inflamatórias ativadas, como os leucócitos (YU; PARDOLL; JOVE, 2009).

Diante deste contexto, a inibição ou indução da mieloperoxidase, ainda gera dúvidas quanto à aplicação terapêutica, exceto para a inflamação crônica, que sabidamente deve ser inibida, ainda que não haja no mercado nenhum fármaco com tal propriedade. Assim, vários estudos ainda devem avaliar o papel do neutrófilo e a liberação e ativação de seus grânulos, a qual pode ser induzida pela Me-NFM, principalmente em relação à ativação da resposta imune específica contra células tumorais, e definir qual o papel da resposta imune inata na carcinogênese.

3.2 ANTITUMORAL ACTIVITY AND TOXICITY OF MALEIMIDE DERIVATIVES IN A PRECLINICAL MELANOMA MOUSE MODEL

A busca de novos fármacos com ação antimelanoma metastático é de grande interesse clínico-científico, visto que os quimioterápicos utilizados na clínica não apresentam grande eficácia contra este tipo de tumor, além de estarem associados a graves efeitos colaterais.

Este trabalho avaliou a atividade antimelanoma de quatro derivados maleimídicos quanto ao potencial antitumoral, antimetástático associado à baixa toxicidade sistêmica em camundongos fêmeas, de aproximadamente 2 meses de idade, em modelo de melanoma *in vivo*, induzido pela administração subcutânea de $2,5 \times 10^5$ células B16F10 na região dorsal. As células B16F10 são células de melanoma murino com alto potencial metastático, portanto, o tumor desenvolve-se rapidamente no tecido subcutâneo, provocando também a formação de metástases em outros órgãos, principalmente o pulmão.

Inicialmente, foi realizada uma triagem da atividade citotóxica em cultura de células B16F10, a fim de selecionar as substâncias a serem testadas *in vivo* e também estabelecer as doses (utilizou-se uma dose 20 vezes maior para os ensaios *in vivo* do que os obtidos *in vitro*, baseando-se nas CI_{50} obtidas, e no trabalho publicado por Prado e colaboradores, 2004).

As quatro substâncias selecionadas foram: N-fenilmaleimida (M2); 4-metil-N-fenilmaleimida (M5); 4-metoxi-N-fenilmaleimida (M7) e N-fenil-etil-maleimida (M9). As maleimidas apresentaram potente atividade citotóxica contra células B16F10, cuja média das CI_{50} em 24 h foi de 15 μ M, e em 48 h foi de 10 μ M. As substâncias M2 e M9 que apresentaram menores valores de CI_{50} nos testes *in vitro*, indicando potente ação citotóxica, *in vivo*, não apresentaram o mesmo perfil. Já as maleimidas M5 e M7 foram mais efetivas na atividade antitumoral e antimetastática no modelo avaliado.

Os efeitos citotóxicos das maleimidas M2 e M5 também foram avaliados por Prado e colaboradores (2004; 2005). Os autores mostraram que estas substâncias reduziram em 50% a viabilidade de células B16F10 após 4 horas de tratamento na concentração de 50 μ M. As duas maleimidas também inibiram a adesão das células B16F10 em função da dose e do tempo de incubação, e diminuíram drasticamente o consumo de oxigênio, mostrando que tais substâncias alteram o

potencial mitocondrial, indicando que a morte provavelmente é induzida via apoptose, a qual foi confirmada em outros ensaios.

Segundo Fulda; Galluzzi e Kroemer (2010), a falha terapêutica dos quimioterápicos antitumorais normalmente deve-se ao bloqueio das vias de morte celular pelas células oncogênicas. Por esta razão, fármacos que possam ativar as vias de morte celular induzindo apoptose ou autofagia, apresentam-se como os mais promissores. A mitocôndria e seus mecanismos bioquímicos regulam os processos de morte, tanto por necrose quanto por apoptose.

As mitocôndrias regulam a via intrínseca da apoptose, pois controlam os mecanismos efetores da ativação apoptótica através da regulação da translocação de proteínas pró-apoptóticas do espaço intermembranar da mitocôndria para o citosol da célula. Assim, devido às mitocôndrias exercerem ação crucial sobre a morte celular, e como funções mitocondriais estão frequentemente alteradas nas células neoplásicas, estas são importantes alvos de substâncias antitumorais (FULDA; GALLUZZI; KROEMER, 2010).

Em função do importante papel das mitocôndrias na regulação da morte celular, avaliamos o potencial mitocondrial através de ensaio fluorimétrico. Neste ensaio mede-se a razão entre a fluorescência vermelha e verde após incubação por 20 minutos das células B16F10 com a sonda JC-1 depois de tratadas por 1 hora com as maleimididas na concentração de 10 μM . A fim de comparar com os efeitos produzidos pelas maleimididas, FCCP (carbonilcianeto- ρ -trifluormetoxifenilhidrazina) foi utilizado como controle positivo, pois esta molécula atua como desacoplador do potencial mitocondrial.

Todas as maleimididas analisadas diminuíram o potencial mitocondrial, sendo que M2, M5 e M7 alteraram de forma mais intensa que o desacoplador FCCP. Esta alteração no potencial mitocondrial pode estar relacionada ao estresse oxidativo induzido pelas maleimididas, e/ou outros mecanismos ainda não esclarecidos. Como nos estudos *in vivo*, observou-se aumento do estresse oxidativo, este deve ser um dos prováveis mecanismos, o qual comumente culmina com a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, e promove a perda do potencial de membrana. Estas alterações podem resultar na ruptura da membrana mitocondrial externa, e assim causar a liberação de proteínas pró-apoptóticas para o citosol, com consequente morte celular (FULDA; GALLUZZI; KROEMER, 2010).

Prado e colaboradores (2004), relataram forte inibição do consumo de oxigênio em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, quando tratados com M2 e M5 após adição de ADP.

Assim, os resultados obtidos e confrontados com a literatura, apenas permitem prever que as maleimidias alteram o potencial mitocondrial, pois, a diminuição do consumo de oxigênio citada por Prado *et al.* (2004), e a diminuição do potencial mitocondrial visto neste trabalho, podem ocorrer por diferentes mecanismos, dentre os quais: inibição dos complexos da cadeia respiratória; restrição do aporte de elétrons na cadeia respiratória devido à inibição de substratos; inibição da síntese de ATP; retirada de elétrons e ou alteração na fluidez da membrana mitocondrial (FULDA; GALLUZZI; KROEMER, 2010).

Para a avaliação *in vivo*, os animais foram separados em grupos, sendo os grupos: G1 controle negativo; G2 controle positivo (animais inoculados com células B16F10 e não tratados); G3, G5, G7 e G9, grupos controles dos tratamentos (animais sem tumor e tratados com M2, M5, M7 e M9, respectivamente) e G4, G6, G8 e G10 animais com tumor e tratados com M2, M5, M7 e M9, respectivamente. Os grupos controle, exceto o G2, foram constituídos por cinco animais cada, e os demais grupos 10 animais cada.

A linhagem melanoma B16F10 murino, é considerada uma linhagem celular de alta capacidade metastática, e por isso, os modelos experimentais *in vivo* com estas células, servem para avaliar o crescimento tumoral, e também a atividade antimetastática dos quimioterápicos (KAWAMATA *et al.*, 2006).

Em relação à atividade antitumoral, observou-se que os animais tratados com M2, M5 e M7 inibiram o crescimento do tumor subcutâneo. O tratamento com M2 (G4) não reduziu o número de animais com tumor, mas reduziu o tamanho em 57%. Já o tratamento com M5 (G6) reduziu em 67% o tamanho do tumor e apenas 32% dos animais apresentaram tumor subcutâneo. Apenas 42% dos animais tratados com M7 (G8) apresentaram tumor subcutâneo, porém, o tamanho foi reduzido em apenas 32%. O tratamento com M9 (G10) não apresentou efeito antimelanoma.

Prado e colaboradores (2004), relataram significativa redução (70%) do crescimento tumoral *in vivo*, em modelo de melanoma murino em camundongos C57/BL6 tratados com M2 ($30 \mu\text{mol.kg}^{-1}$), em dose única e dividido em três doses, conforme protocolo estabelecido pelos autores, sendo tal efeito observado, tanto em tumores recém implantados (24 h), como em tumores anteriormente estabelecidos (10 dias).

Os resultados mostrados neste trabalho, principalmente com as maleimidias M5 e M7 são importantes, uma vez que o melanoma é um tumor altamente agressivo e com grande capacidade metastática, e estas maleimidias foram efetivas em inibir a progressão do tumor, incluindo

metástases. Flores e colaboradores (2008), destacam que o tumor melanoma em estágio avançado apresenta alto índice metastático, e conseqüentemente, mau prognóstico, isto é, a taxa de sobrevivência média após o aparecimento de metástases é em torno de nove meses.

Assim, embora o modelo utilizado neste trabalho não seja o de escolha para a indução de metástases, observou-se que os animais controle (G2), bem como os animais tratados com M2 desenvolveram metástases mesentérica, e 60% dos animais do G2 apresentavam metástases no pulmão. Os animais tratados com M5 e M7 não apresentaram sinais macroscópicos de metástase, tanto no pulmão como no mesentério, além de inibição total da angiogênese. Microscopicamente, apenas dois animais tratados com M5 apresentaram focos de metástase pulmonar, e 3 animais tratados com M7 apresentaram metástase no mesentério.

Nos pacientes com melanoma, o intestino delgado, o pulmão e o cérebro são os principais sítios de desenvolvimento de metástases. Esta habilidade metastática das neoplasias malignas propicia a infiltração em órgãos distantes ao do tumor primário, sendo o principal evento clínico relacionado à letalidade do câncer, tal como no melanoma (CONESA *et al.*, 2009).

Portanto, os resultados obtidos neste trabalho são promissores, uma vez que a principal causa de morte por melanoma deve-se à sua alta capacidade metastática para órgãos vitais, bem como à não responsividade do tumor aos quimioterápicos utilizados na clínica (EWEND; CAREY; BREM, 1996; KASPER *et al.*, 2007).

Macroscopicamente, observou-se que alguns animais apresentavam discreta alteração no tamanho do baço, e na análise histopatológica foi detectada a presença de megacariócitos, principalmente nos animais tratados com M7 e M9. Sabe-se que o tumor induz esplenomegalia, mas como os animais sem tumor e tratados também apresentaram aumento no tamanho do baço, este evento pode estar associado ao tratamento, ou ainda, tal evento pode estar relacionado com a função hematopoiética dos animais, já que a maturação dos megacariócitos ocorre no baço, diferentemente do homem, cuja maturação ocorre na medula óssea (VERÇOSA JUNIOR *et al.*, 2004).

As diferentes respostas terapêuticas obtidas com as maleimidias, inclusive os efeitos antimelanoma descritos neste trabalho, devem-se às diferenças nas propriedades físico-químicas destas moléculas. Prado *et al.* (2004), quando avaliaram o consumo de oxigênio em mitocôndrias isoladas de rato, verificaram que derivados maleimídicos que

apresentavam substituintes no anel imídico (ex. *N*-fenil-dicloromaleimida) e anel imídico não ciclizado, não inibiam o consumo de oxigênio, e inclusive, as substâncias com anel imídico aberto, apresentaram atividade contrária, aumentando o consumo de oxigênio.

Os autores concluíram que substituintes no anel aromático não interferem na atividade biológica analisada, diferentemente de quando ligados ao anel imídico, e que a inibição do consumo de oxigênio depende da integridade do anel imídico, já que a presença da carboxila quando o anel encontra-se aberto, pode em meio reacional, dissociar-se e doar o próton ao sistema de transporte de elétrons da cadeia respiratória, e por isso, induzir o consumo de oxigênio (PRADO *et al.*, 2004).

Outros estudos relacionando atividade biológica e estrutura química, estão descritos na revisão de Cechinel Filho *et al.* (2003), que descreve a atividade antifúngica das maleimidadas dependente da estrutura química. Os autores relatam que não houve significativas alterações na atividade antifúngica quando presentes substituintes no anel imídico e no anel aromático, sugerindo apenas pequena interferência de efeitos estéricos, mas a atividade aumenta quando introduzidos grupos metilenos entre o anel imídico e o anel aromático, sugerindo influência da hidrofobicidade nesta ação biológica.

A ação antifúngica provavelmente deve-se à dupla ligação do anel imídico, à planaridade dos anéis e à presença de grupos alquílicos entre os anéis, sendo que quanto maior a distância, mais potente a maleimida (ANDRICOPULO *et al.*, 1998; CECHINEL FILHO *et al.*, 2003; PONTES; LIMA; CECHINEL FILHO, 2007; SORTINO *et al.*, 2008).

Em contraste com os dados indicados na literatura, nossos resultados obtidos em testes *in vitro*, mostraram que a distância entre o anel imídico e o anel aromático interfere significativamente na atividade antitumoral, pois a maleimida M9, contém dois grupos metilenos entre os anéis, e nos testes *in vivo*, não apresentou ação antitumoral significativa, ainda que *in vitro*, apresentou potente citotoxicidade.

A substância 3,4-dicloro-*N*-fenil-propilmaleimida (M10), não mostrada neste trabalho, sequer apresentou atividade citotóxica, sugerindo que a baixa atividade pode estar relacionada à distância entre os anéis e a presença de substituintes no anel imídico. Esta observação também encontra-se citada em outros trabalhos, que avaliaram a atividade antibacteriana das maleimidadas, em que somente as moléculas cujo anel aromático encontra-se conjugado ao anel imídico ou separado

apenas por um metileno foram ativas contras as cepas testadas (CECHINEL FILHO *et al.*, 2003).

Os respectivos ácidos maleâmicos (M1 e M3 - dados não mostrados no trabalho) também não apresentaram ação citotóxica, confirmando os dados apresentados na literatura, sobre a importância da integridade do anel imídico para ação biológica (CECHINEL FILHO *et al.*, 2003; SORTINO *et al.*, 2008).

Em relação aos grupos substituintes na posição 4 do anel aromático, observou-se que as maleimidias não substituídas (M2) e substituídas na posição 4 com grupamentos elétron-doadores (M5 e M7), apresentaram significativa citotoxicidade, enquanto que a substituição com grupamentos elétron-retiradores (M4- 4-nitro-*N*-fenilmaleimida – dado não mostrado), diminuiu drasticamente a atividade, pois a CI_{50} em 24 horas foi de 45 μ M em comparação com a média das CI_{50} das demais maleimidias que foi de 15 μ M. No entanto, estes dados deverão ser confirmados usando-se outros grupos elétron-retiradores e em outras posições do anel aromático.

A presença de grupos elétron-doadores no anel aromático aumentou a atividade analgésica e antiespasmódica em diversos modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*, enquanto o inverso diminuiu a atividade, indicando que parâmetros eletrônicos podem estar envolvidos na atividade das maleimidias (CECHINEL FILHO *et al.*, 2003), semelhantemente ao que foi observado neste trabalho para a atividade antitumoral.

A fim de avaliar a possível toxicidade das maleimidias, foram analisados parâmetros biométricos, bioquímicos e hematológicos dos animais tratados. Os parâmetros hematológicos são comumente utilizados como indicativo de toxicidade, pois muitos dos quimioterápicos disponíveis no mercado causam mielossupressão, desencadeando com frequência quadros de anemia, trombocitopenia e leucopenia.

O tratamento com as maleimidias não causou alterações significativas em nenhum dos parâmetros hematológicos avaliados, pelo contrário, alguns tratamentos conseguiram reverter a leucopenia e a diminuição da concentração de hemoglobina induzidas pelo tumor, indicando que as maleimidias apresentam baixa atividade mielossupressora.

A literatura traz inúmeros relatos da toxicidade dos quimioterápicos, sendo os efeitos mais relevantes: mielossupressão, dano renal e hepático, além de náuseas e perda de peso, o que na maioria das vezes limita a aplicação clínica de alguns fármacos com ação

antitumoral (SOUZA *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2008; BAI *et al.*, 2009).

Em se tratando de substâncias com ação antitumoral, esperava-se que os parâmetros bioquímicos apresentassem alterações devido à citotoxicidade destas. No entanto, apenas as enzimas hepáticas dos animais tratados com M9 apresentaram valores significativamente alterados. Segundo a literatura, no caso de lesão hepática, há liberação das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). Esta última associa-se primariamente às mitocôndrias, mas também se encontra presente no citoplasma e sua liberação está relacionada a lesões hepáticas severas, enquanto a ALT é mais facilmente liberada, portanto, menos representativa quanto ao efeito tóxico (RESENDE *et al.*, 2003).

As proteínas totais apresentaram discreta diminuição quando comparadas ao controle (G1). As proteínas plasmáticas estão presentes naturalmente no sangue e a síntese destas é realizada pelas células parenquimais do fígado que pode ser alterada (diminuída) por quadros inflamatórios, infecção bacteriana, radiações, toxinas, isquemia, choque térmico, entre outros. As concentrações também podem estar alteradas (diminuídas) na presença de síndrome nefrótica. Assim, a dosagem de proteínas totais é um indicativo da função hepática e renal (SILVA *et al.*, 2005).

A peroxidação lipídica é também um evento fisiopatológico induzido por muitos quimioterápicos, e por esta razão, este parâmetro também foi avaliado. Conforme resultados obtidos a partir do homogenato de fígado, observou-se que o próprio tumor induz lipoperoxidação, e apenas os tratamentos com M7 e M9 induziram significativamente o estresse oxidativo, quando comparado com os animais controles, pois aumentaram significativamente os valores de TBARS e diminuíram concentrações de GSH.

O estresse intracelular induzido por fármacos pode ser benéfico, pois a apoptose, morte almejada pelos quimioterápicos, pode resultar da disfunção mitocondrial, em especial induzida pelo estresse oxidativo, e assim ocorrer a ativação de proteínas pró-apoptóticas (PAROLIN; REASON, 2001). No entanto, a lipoperoxidação também pode estar associada a outros fatores como os mecanismos de envelhecimento, de carcinogênese e à exacerbação da toxicidade de fármacos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A glutatona reduzida (GSH), um tripeptídeo formado por glutamato, cisteína e glicina, é geralmente o mais abundante entre os tióis endógenos. A GSH funciona como um antioxidante generalista, e

como substrato para a remoção de H_2O_2 pela glutathiona peroxidase prevenindo a peroxidação dos lipídios; protege os grupos sulfidrilas das enzimas essenciais ao metabolismo da célula, sendo oxidada no lugar destas, e atua regenerando o ácido ascórbico, protegendo as células dos danos induzidos pelas espécies reativas de oxigênio (JORDÃO JUNIOR *et al.*, 1998).

Estudos apontam que a depleção de GSH, pode aumentar a sensibilidade do tumor aos quimioterápicos e a radiação ionizante, favorecendo a resposta antitumoral (FERNANDES; COTTER, 1994; CURTIN; DONOVAN; COTTER, 2002; LOCATELLI *et al.*, 2008). A depleção de GSH associada ao aumento da peroxidação lipídica induzida pelo tratamento com M7 pode estar relacionada ao mecanismo de ação desta maleimida.

Outro parâmetro avaliado em relação à toxicidade das maleimidias foi a variação do peso corpóreo, que é considerada significativa quando há redução de 10% do peso. Os animais sem tumor tratados com M2 (G3) apresentaram uma variação positiva de peso, isto é, ganharam mais peso que os animais controle (G1). Os animais tratados com M7 (G7 e G8), apresentaram uma variação positiva de peso, mas significativamente menor que os animais controle (G1 e G2), mostrando que de alguma forma, o tratamento com M7, fez com que os animais ganhassem menos peso, mas não é considerado tóxico, pois os animais não perderam peso após tratamento.

Por fim, avaliando-se os resultados obtidos neste estudo, pode-se inferir que as maleimidias M5 e M7 apresentaram baixa toxicidade sistêmica, visto que a maior toxicidade foi evidenciada no baço com a presença de megacariócitos em alguns animais tratados, mas apresentaram significativo efeito antitumoral neste modelo de melanoma.

Sendo assim, tem-se como perspectiva, avaliar a atividade antitumoral destas maleimidias associadas a quimioterápicos disponíveis no mercado, buscando diferentes alvos, e, através de ação sinérgica, obter mais efetividade na resposta antitumoral e menos efeitos indesejáveis. A associação de diferentes quimioterápicos é uma importante estratégia terapêutica para o tratamento do melanoma metastático.

3.3. INDUCTION OF APOPTOSIS BY CYCLIC MALEIMIDE DERIVATIVES IN A LEUKEMIA CELL LINE: INVOLVEMENT OF OXIDATIVE STRESS AND MITOCHONDRIAL DAMAGE

Novos quimioterápicos antileucêmicos são desejáveis, visto que a terapêutica disponível para adultos com leucemia, em especial a leucemia linfóide aguda (LLA), apresenta baixa taxa de responsividade, devido à presença de genes de resistência, e também as diferenças metabólicas entre adultos e crianças, que contribuem para as baixas taxas de remissão e cura em adultos (BURKE; STARTZELL, 2008).

Diante desta justificativa, o presente trabalho avaliou a atividade citotóxica de derivados maleimídicos frente à cultura de células de leucemia murina (L1210) e mecanismos de morte relacionados ao estresse oxidativo.

Na triagem da atividade citotóxica em cultura de células L1210 em diferentes tempos de incubação (24-72 h), observou-se que os derivados maleimídicos não ciclizados (M1 e M3), e alguns com substituição no anel imídico (M10), não apresentaram atividade citotóxica nas concentrações testadas que variaram entre 1 a 100 μM . Assim, foram selecionadas para os demais testes, as seguintes maleimidadas e respectivas concentrações inibitórias no tempo de 24 h de incubação: M2 (17 μM), M4 (26 μM), M5 (15,2 μM), M6 (19,5 μM), M7 (14,9 μM), e M9 (12,4 μM).

De forma semelhante ao que foi observado para o efeito citotóxico sobre células B16F10 (melanoma murino), a ação antileucêmica dos derivados maleimídicos está diretamente relacionada às estruturas químicas destas substâncias. O anel imídico deve estar próximo do anel aromático, e não deve ter substituintes e também deve estar ciclizado.

Yunes e colaboradores (2008), descreveram que a atividade antileucêmica observada em células K562 tratadas com derivados maleimídicos, dependia da configuração planar do anel imídico insaturado, da integridade deste, isto é, da forma ciclizada. Ainda, o anel imídico deveria estar ligado diretamente ao anel aromático, ou separado deste por uma ou duas unidades metilênicas, e ainda, a presença de substituintes no anel imídico lhe confere inatividade. Estas observações estão de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, visto que M1 e M3, que não tem o anel ciclizado, e M10 que tem substituintes no anel imídico, não apresentaram ação citotóxica.

A viabilidade celular diminuiu de acordo com a concentração e tempo de incubação, indicando que os derivados maleimídicos possuem significativa ação citotóxica, cujas CI_{50} diminuíram de acordo com o maior tempo de incubação.

Posteriormente, foi avaliado o tipo de morte celular induzida pelas maleimididas (10 μ M), através da morfologia das células. Foi observada a presença de núcleos apoptóticos, e, na análise do gel de agarose, observou-se a fragmentação do DNA, o que caracteriza indução de morte celular por mecanismos apoptóticos.

A apoptose é o principal mecanismo de morte desejado com o uso de quimioterápicos, pois não induz ativação de processo inflamatório no local do tumor e suas consequências deletérias. A apoptose é um tipo de morte celular caracterizada por alterações na morfologia celular como condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos, e também pela perda do potencial de membrana mitocondrial (CHIPUK; GREEN, 2005).

Observou-se em outro ensaio de viabilidade celular, no qual as células foram incubadas somente com as maleimididas (15 μ M), e também incubadas com catalase durante 24 h, um aumento significativo da viabilidade celular, indicando que a citotoxicidade induzida pelas maleimididas está relacionada à geração de espécies reativas de oxigênio, em especial, o peróxido de hidrogênio, pois a catalase é responsável pela dismutação deste em oxigênio e água.

Os derivados maleimídicos promoveram inibição significativa da catalase e da glutatona redutase, enzimas essenciais às células para o controle do estresse oxidativo. Em função destes resultados, provavelmente justifica-se o aumento da atividade da glutatona peroxidase, a qual complementa a atividade da catalase em tecidos nos quais não está presente. Mas, a ação da GPx é dependente de glutatona reduzida, a qual é obtida a partir do ciclo redox da GR, a qual também encontra-se inibida pelas maleimididas, e por isso, justifica-se o aumento da concentração de glutatona oxidada.

O aumento do estresse oxidativo também foi verificado pelo aumento da lipoperoxidação induzida por todas as maleimididas testadas, mas de forma significativa apenas nas células incubadas com M2, M6, M7 e M9. As maleimididas também induziram a geração de espécies reativas, indicando que o estresse oxidativo deve ser o principal mecanismo de ação das maleimididas, pois, atuam diminuindo as defesas antioxidantes das células L1210, e conseqüentemente, aumentam a concentração de espécies reativas de oxigênio.

Estudos apontam que as células tumorais estão persistentemente proliferando-se sob intenso estresse oxidativo, devido a mutações e alterações na cadeia respiratória, as quais estão associadas ao aumento do metabolismo energético mitocondrial e na geração de EROs. A fim de manter a homeostasia celular, e evitar os danos mediados pela presença de altas concentrações de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, as células tumorais apresentam maiores concentrações de enzimas e defesas antioxidantes, tal como as células de leucemia linfocítica humana crônica (DIAS; BAILLY, 2005).

A manutenção da homeostasia do estresse oxidativo é essencial para o crescimento e sobrevivência celular, especialmente das células tumorais, que comumente estão adaptadas ao estresse oxidativo, e por isso, o aumento na geração de espécies reativas mediado por xenobióticos, ou a inibição das defesas enzimáticas, é significativamente mais relevante para as células tumorais do que as células normais, pois a concentração de EROs é muito maior nas células neoplásicas, e por isso estas são mais vulneráveis aos danos induzidos pelo estresse oxidativo (CURTIN; DONOVAN; COTTER, 2002; TRACHOOTHAM; ALEXANDRE; HUANG, 2009).

A alteração no equilíbrio do potencial redox pode ser mediada pela inibição de enzimas antioxidantes, em especial a SOD e a catalase no caso de células leucêmicas, visto que estas células dependem muito da ação destas enzimas para manter o estresse oxidativo sob controle (DIAS; BAILLY, 2005).

Lin; Thomas e Girotti (1993), demonstraram que células leucêmicas que apresentavam deficiência na atividade de glutatona peroxidase, a qual também reduz peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, eram mais sensíveis aos efeitos citotóxicos de quimioterápicos, da radiação e do fator de necrose tumoral.

Assim, observa-se que as enzimas antioxidantes exercem papel fundamental no equilíbrio redox das células leucêmicas, e a inibição da catalase e da GR, responsável pelo ciclo redox da glutatona, promoveram um aumento da concentração de peróxido de hidrogênio intracelular, pois, a glutatona peroxidase atua somente na presença de glutatona reduzida, culminando em intenso estresse oxidativo e dano celular.

Algumas células tumorais, especialmente quando a doença encontra-se em estágio avançado, estão adaptadas ao intenso estresse oxidativo por apresentarem aumento nas concentrações das defesas antioxidantes, o que implica na resistência aos quimioterápicos. Tal evento foi descrito para células leucêmicas HL-60, que resistiam ao

efeito citotóxico do peróxido de hidrogênio porque apresentavam altas concentrações da enzima catalase (TRACHOOTHAM; ALEXANDRE; HUANG, 2009).

Portanto, a inibição da catalase mediada pelos derivados maleimídicos é um importante resultado quando objetiva-se terapia antileucêmica, visto que estas células têm como principais mecanismos de resistência, o efluxo de fármacos através de proteínas transmembranais ATP-dependentes da família ABC, e o aumento da concentração de enzimas antioxidantes (TRACHOOTHAM; ALEXANDRE; HUANG, 2009).

Provavelmente, o estresse oxidativo observado nas células incubadas com as maleimidadas, induziu a perda do potencial de membrana mitocondrial, e consequente depleção de ATP. Estes últimos eventos estão intimamente relacionados à apoptose, uma vez que a perda do potencial de membrana mitocondrial induz a formação do poro de transição da membrana, e liberação de proteínas pró-apoptóticas. Ainda, outro evento característico da apoptose, é o aumento das concentrações de ATP, seguido da depleção deste, observado em todos os tratamentos, exceto para M7, que promoveu a depleção na primeira hora de tratamento.

A mitocôndria exerce papel central no metabolismo energético da célula e na morte celular. A perda do potencial de membrana mitocondrial, isto é, a despolarização, propicia o surgimento do poro de permeabilidade de transição de membrana, com consequente liberação de proteínas da membrana interna para o citoplasma celular, comumente proteínas pró-apoptóticas como citocromo C, Smac/DIABLO, endonuclease G e AIF (fator de indução da apoptose independente de ativação de caspase), que culminam na morte celular (HERR; DEBATIN, 2001; OKADA; MAK, 2004; DIAS; BAILLY, 2005).

Dias e Bailly (2005), descrevem que a rotenona inibe o complexo I da cadeia respiratória de forma não competitiva, e induz a apoptose em células leucêmicas primárias por causa do estresse oxidativo gerado. Efeito semelhante foi observado quando células leucêmicas pró-mielocíticas HL-60 foram incubadas com derivados macrolídeos como citovaricina.

Assim, substâncias que atuem inibindo ou alterando a cadeia respiratória surgem como potenciais agentes antitumorais, pois podem ativar as vias apoptóticas e não apoptóticas de morte celular, devido ao aumento da geração de espécies reativas, causando desequilíbrio no potencial redox da célula (DIAS; BAILLY, 2005).

Prado e colaboradores (2004), observaram em testes *in vitro* a redução do consumo de oxigênio, em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, após incubação com derivados maleimídicos, indicando que estas substâncias alteram a cadeia respiratória mitocondrial, e provavelmente este evento está implicado no mecanismo de ação das maleimidias, pois, neste trabalho, observou-se significativa perda do potencial mitocondrial das células L1210 incubadas com os derivados maleimídicos.

O aumento na concentração de ATP seguido de sua depleção é um evento típico de morte celular via apoptose. Alguns trabalhos também têm demonstrado que há um aumento na produção de ATP no início da apoptose, e significativa redução na concentração deste após algumas horas de incubação com as substâncias ativas que induzem apoptose (GRENN; REED, 1998). Este fenômeno foi relatado em células de melanoma murino B16F10 tratadas com galatos (LOCATELLI *et al.*, 2009), e células de leucemia murino L1210 incubadas com chalconas e derivados (WINTER *et al.*, 2010).

Diante dos resultados obtidos, pode-se inferir que os derivados maleimídicos apresentam significativo efeito citotóxico sobre a linhagem de células linfoblásticas leucêmicas murinas L1210, e o estresse oxidativo deve ser o provável mecanismo de ação destas substâncias, visto que estas induziram o aumento de espécies reativas, provavelmente mediado pela diminuição das defesas antioxidantes, e também, promoveram a perda do potencial de membrana mitocondrial e depleção de ATP, culminando na morte destas células por apoptose.

4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

As maleimididas apresentaram diferentes atividades biológicas, dentre as quais verificamos atividade citotóxica em cultura de células B16F10 (melanoma) e L1210 (leucemia), e atividade antitumoral em modelo de melanoma subcutâneo em camundongos, e potencial capacidade de aumentar a atividade enzimática da mieloperoxidase.

Dentre as maleimididas avaliadas, apenas a Me-NFM (M2) aumentou significativamente a atividade da mieloperoxidase de homogenato de pulmão de ratos não tratados, da enzima purificada obtida comercialmente e da enzima de neutrófilos após lise celular. A M2 também aumentou a quimiotaxia de células pró-inflamatórias na cavidade “air pouch” induzida no dorso de camundongos, indicando potencial uso como ferramenta farmacológica para avaliar ação anti-inflamatória de novas moléculas.

As maleimididas M5 e M7 apresentaram significativo efeito antimelanoma no modelo analisado, cuja ação antitumoral está relacionada com a estrutura química das moléculas e, portanto, dependente das propriedades físico-químicas. As maleimididas apresentaram baixa toxicidade, exceto M9, pois não alteraram significativamente os parâmetros biométricos, bioquímicos e hematológicos.

Os derivados maleimídicos M2, M4, M5, M6, M7 e M9 apresentaram efeito citotóxico em células leucêmicas murino L1210, e induziram a morte por apoptose. O provável mecanismo relacionado à morte celular é a indução de estresse oxidativo, tanto pela geração de espécies reativas como inibição de enzimas antioxidantes, como a catalase. Os derivados maleimídicos induziram a perda do potencial de membrana mitocondrial e a depleção de ATP, cujos eventos são características da apoptose.

Diante dos resultados de atividade antitumoral *in vivo*, objetiva-se dar continuidade às análises *in vitro* em células de melanoma, a fim de esclarecer os mecanismos moleculares de ação destas substâncias, além de avaliar a atividade antimetastática em modelo de metástase em camundongos.

Em relação à atividade antileucêmica, será avaliada a citotoxicidade destas substâncias em células de leucemia humana (CEM) e outros mecanismos de morte, como as proteínas anti e pró-apoptóticas.

REFERÊNCIAS

ABOELSOUUD, N. H. Herbal medicine in ancient Egypt. **J. Med. Plants Res.**, v. 4, n. 2, p. 082-086, 2010.

ABDULAHAD, W. H.; STEGEMAN, C. A.; KALLENBERG, C. G. The role of CD4(+) T cells in ANCA-associated systemic vasculitis. **Nephrology**, v. 14, p. 26-32, 2009.

ALAA, A.; ABDEL-AZIZ, M. Novel and versatile methodology for synthesis of cyclic imides and evaluation of their cytotoxic, DNA binding, apoptotic inducing activities and molecular modeling study. **Eur. J Med. Chem.**, v. 42, p. 614-626, 2007.

ALBINI, A.; SPORN, M. B. The tumour microenvironment as a target for chemprevention. **Nat. Rev. Cancer**, v. 7, p. 139-147, 2007.

ALLEN, R. G.; TRESINI, M. Oxidative stress and gene regulation. **Free Rad. Biol.**, v. 28, n. 3, p. 463-499, 2000.

ALGECIRAS-SCHIMNICH, A.; BARNHART, B. C.; PETER, M. E. Apoptosis-independent functions of killer caspases. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 14, p. 721-726, 2002.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quim. Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

ALMEIDA, H. O.; VERSIANI, E. R.; DIAS, A. R.; NOVAES, M. R. C. G.; TRINDADE, E. M. V. Adesão a tratamento entre idosos. **Com. Ciências Saúde**, v. 18, n. 3, p. 57-67, 2007.

AMARANTE-MENDES, G. P. Apoptose: programa molecular de morte celular. **Einstein**, v.1, n.1, p. 15-18, 2003.

ANDRICOPULO, A. D.; YUNES, R. A.; NUNES, R. J.; SAVI, A. O. S.; CORRÊA, R.; BELLA CRUZ, A.; CECHINEL FILHO, V. Síntese e atividade antibacteriana de imidas cíclicas: 3,4-dicloromaleimidás e 3-

cloro-4-substituída-maleimidada. **Quim. Nova**, v. 21, n. 5, p. 573-577, 1998.

ARATANI, Y. Role of myeloperoxidase in the host defense against fungal infection. **Jpn. J. Med. Mycol.**, v. 7, p. 195-199, 2006.

ARNHOLD, J. Free radicals – friends or foes? Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. **Biochemistry**, v. 69, p. 4-9, 2004.

ASHTON-PROLLA, P.; BAKOS, L.; JUNQUEIRA JUNIOR, G.; AZEVEDO, S. J.; HOGG, D. Clinical and molecular characterization of patients at risk for hereditary melanoma in southern Brasil. **J. Invest. Dermatol.**, v. 128, n. 2, p. 421-425, 2008.

ATTARDI, L. D. The role of p53-mediated apoptosis as a crucial anti-tumor response to genomic instability: lessons from mouse models. **Mutat. Res.**, v. 569, p. 145-157, 2005.

AVRIL, F.; AAMDAL, S.; GROB, J. J.; HAUSCHILD, A.; MOHR, P.; BONERANDI, J. J.; et al. . Fotemustine compared with dacarbazine in patients with disseminated malignant melanoma: a phase III study. **J. Clin. Oncol.**, v. 22, n. 6, p. 1118-1125, 2004.

BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. **Am. J. Med.**, v. 109, p. 33-44, 2000.

BAI, R. Z.; WU, Y.; LIU, Q.; XIE, K.; WEI, Y. Q.; WANG, Y. S.; LIU, K.; LUO, Y.; SU, J. M.; HU, B.; LIU, J. Y.; LI, Q.; NIU, T.; ZHAO, Z. W.; YANG, L. Suppression of lung cancer in murine model: treated by combination of recombinant human endostatin adenovirus with low-dose cisplatin. **J. Exp. Clin. Cancer. Res.**, v. 28, n. 31, p. 1-9, 2009.

BALLATORI, N.; HAMMOND, C. L.; CUNNINGHAM, J. B.; KRANCE, S. M.; MARCHAN, R. Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 204, n. 3, p. 238-255, 2005.

BARBOSA, L. F.; DE MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Danos oxidativos e neurodegeneração: o que aprendemos com animais transgênicos e nocautes? **Quim. Nova**, v. 29, n. 6, p. 1352-1360, 2006.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse Oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BELSON, M.; KINGSLEY, B.; HOLMES, A. Risk factors for acute leukemia in children: a review. **Environ. Health Perspect.**, v. 115, p. 138-145, 2007.

BENSON, J. R.; LIAU, S. S. Cancer genetics: a primer for surgeons. **Surg. Clin. N. Am.**, v. 88, p. 681-704, 2008.

BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M.; DI MASCIO, P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Quim. Nova**, v. 29, n. 6, p. 1340-1344, 2006.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BORGHAEI, H.; SMITH, M. R.; CAMPBELL, K. S. Immunotherapy of cancer. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 625, p. 41-54, 2009.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; NASCIMENTO, R. D. C. J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Quim. Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer**. Rio de Janeiro: INCA, 2009, 98 p. Acessado em dezembro de 2010. Disponível em:
<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/estimativa20091201.pdf>

BROWN, J. M.; ATTARDI, L. D. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. **Nat. Rev.**, v. 5, p. 231-237, 2005.

BURKE, V. P.; STARTZELL, J. M. The leukemias. **Oral Maxillofacial Surg. Clin. N. Am.**, v. 20, p. 597-608, 2008.

BUZZI, F. C.; CORRÊA, R.; CECHINEL FILHO, V. Síntese de moléculas bioativas: o exemplo das imidas cíclicas. Cap. 2, p. 59-105. **In:** BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. (org). **Ciências farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí:UNIVALI, 2003, 239p.

BYRNE, B. H. M.; ALARCON, T.; OWEN, M. R.; WEBB, S. D.; MAINI, P. K. Modelling aspects of cancer dynamics: a review. **Phil. Trans. R. Soc. A.**, v. 364, p. 1563-1578, 2006.

CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A.; NETO, A. S.; VALLE, R. M.; ERA, G. A. Antispasmodic effects of an alkaloid extracted from *Phyllanthus sellowianus*: a comparative study with papaverine. **Braz. J. Biol. Res.**, v. 17, n. 3-4, p. 313-321, 1984.

CARVALHO, C. A.; GIUGLIANI, R.; ASHTON-PROLLA, P.; CUNHA, M. E.; BAKOS, L. Melanoma hereditário: prevalência de fatores de risco em um grupo de pacientes no Sul do Brasil. **An. Bras. Dermatol.**, v. 79, n.1, p. 53-60, 2004.

CASALINO, E.; SBLANO, C.; LANDRISCINA, C. A possible mechanism for initiation of lipid peroxidation by ascorbate in rat liver microsomes. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 28, p. 137-149, 1996.

CASTRO, R. Câncer na mídia: uma questão de saúde pública. **Rev. Bras. Cancerologia**, v. 55, n. 1, p. 41-48, 2009.

CECHINEL FILHO, V.; CÔRREA, R.; VAZ, Z.; CALIXTO, J. B.; NUNES, R. J.; PINHEIRO, T. R.; ANDRICOPULO, A. D.; YUNES, R. A. Further studies on analgesic activity of cyclic imides. **IL Farmaco**, v. 53, p. 55-57, 1998.

CECHINEL FILHO, V.; CAMPOS, F.; CORRÊA, R.; YUNES, R. A.; NUNES, R. J. Aspectos químicos e potencial terapêutico de imidas

cíclicas: Uma revisão da literatura. **Quim. Nova**, v. 26, n. 2, p. 230-24, 2003.

CERQUEIRA, F. M.; DE MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, 2007.

CHAKRABARTY, A.; GEISSE, J. K. Medical therapies for non-melanoma skin cancer. **Clin. Dermatol.**, v. 22, p.183-188, 2004.

CHIPUK, J. E.; GREEN, D. R. Do induce of apoptosis trigger caspase-independent cell death? **Mol. Cell Biol.**, v. 6, p. 268-275, 2005.

CHORILLI, M.; LEONARDI, G. R.; SALGADO, H. R. N. Radicais livres e antioxidantes: conceitos fundamentais para aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas. **Rev. Bras. Farm.**, v. 88, n. 3, p. 113-118, 2007.

COOLBRANDT, A.; VAN den HEEDE, K.; VANHOVE, E.; BOM, A.; MILISEN, K.; WILDIERS, H. Immediate versus delayed self-reporting of symptoms and side effects during chemotherapy: Does timing matter? **Eur. J. Oncol. Nurs.**, *in press*, 2010.

CONESA, C. M.; SANCHEZ, N. A.; ORTEGA, V.; REVERTE, J. G.; CARPE, F. P.; ARANDA, M. C. *In vitro* and *in vivo* effect IFN α on B16F10 melanoma in two models: Subcutaneous (C57BL6J mice) and lung metastasis (*Swiss mice*). **Biomed. Pharmacother.**, v. 63, p. 305-312, 2009.

CRAZZOLARA, R.; BENDALL, L. Emerging treatments in acute lymphoblastic leukemia. **Curr. Cancer Drug Targets**, v. 9, p. 19-31, 2009.

CURTIN, J. F.; DONOVAN, M.; COTTER, T. G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. **J. Immunol. Methods**, v. 265, p. 49-72, 2002.

DALE, D. C.; BOXER, L.; LILES, W. C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. **Blood**, v. 112, p. 935-945, 2008.

- DAVIS Jr., W.; RONAI, Z.; TEW, K. D. Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 296, p. 1-6, 2001.
- DANIAL, N. N.; KORSMEYER, S. J. Cell death: critical control points. **Cell**, v. 116, p. 205-19, 2004.
- DIAS, R. A.; CORREA, A. G. Aplicações da química combinatória no desenvolvimento de fármacos. **Quim. Nova**, v. 24, n. 2, p. 236-242, 2001.
- DIAS, N.; BAILLY, C. Drugs targeting mitochondrial to control tumor cell growth. **Biochem. Pharm.**, v. 70, p. 1-12, 2005.
- DORAI, T.; AGGARWAL, B. B. Role of chemopreventive agents in cancer therapy. **Cancer Lett.**, v. 215, n. 2, p. 129-140, 2004.
- DRANOFF, G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. **Nat. Rev.**, v. 4, p. 11-22, 2004.
- DREHER, D.; JUNOD, A. F. Role of oxygen free radicals in cancer development. **Eur. J. Cancer**, v. 32, p. 30-38, 1996.
- EHLING, D. Oriental medicine: an introduction. **Altern. Ther. Health Med.**, v. 7, n. 4, p. 71-82, 2001.
- ELMAN, I.; PINTO-SILVA, M. E. M. Crianças portadoras de leucemia linfóide aguda: análise dos limiares de detecção dos gostos básicos. **Rev. Bras. Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 297-303, 2007.
- EWEND, M. G.; CAREY, L. A.; BREM, H. Treatment of melanoma metastases in the brain. **Semin. Surg. Oncol.**, v. 12, n. 6, p. 429-435, 1996.
- FADERL, S.; JEHA, S.; KANTARJIAN, H. M. The biology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**, v. 98, p. 1337-1354, 2003.
- FARFANI, J. A.; DOMENE, S. M. A.; PADOVANI, R. M. DRI: Síntese comentada das novas propostas e recomendações nutricionais para antioxidantes. **Rev. Nutr. Campinas**, v. 14, n. 1, p. 71-78, 2001.

FARAONE, D.; AGUZZI, M. S.; TOIETTA, G.; FACCHIANO, A. M.; FACCHIANO, F.; MAGENTA, A.; MARTELLI, F.; TRUFFA, S.; CESAREO, E.; RIBATTI, D.; CAPOGROSSI, C. M.; FACCHIANO, A. Platelet-derived growth factor-receptor a strongly inhibits melanoma growth in vitro and in vivo. **Neoplasia**, v. 11, p. 732-742, 2009.

FASS, L. Imaging and cancer: A review. **Mol. Oncol.**, v. 2, p. 115-152, 2008.

FERNANDES, R. S.; COTTER, T. G. Apoptosis or necrosis: intracellular levels of glutathione influence mode of cell death. **Biochem. Pharmacol.**, v. 48, n. 4, p. 675-681, 1994.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FLORES, F. F.; PARDI, P. C.; SANTOS, R. P.; RANDO, D. G.; SUÁREZ, J. A. P. Q.; MARIA, D. A. Antiproliferative and antimetastatic activity of DM-1, sodium 4-[5-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-oxo-penta-1,4-dienyl]-2-methoxy-phenolate, in B16F10 melanoma. **App. Cancer Res.**, v. 28, n. 2, p. 72-70, 2008.

FREITAS, M.; PORTO, G.; LIMA, J. L.; FERNANDES, E. Isolation and activation of human neutrophils in vitro. The importance of the anticoagulant used during blood collection. **Clin. Biochem.**, v. 41, n. 7-8, p. 570-575, 2008.

FULDA, S.; GALLUZZI, L.; KROEMER, G. Targeting mitochondria for cancer therapy. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 9, p. 447-464, 2010.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, n. 2, p. 178-182, 2005.

GARBE, C.; EIGENTLER, T. K. Diagnosis and treatment of cutaneous melanoma: state of the art 2006. **Melanoma Res.**, v. 17, n. 2, p. 117-127, 2007.

GHOBRAL, I. M.; WITZIG, T. E.; ADJEU, A. A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. **CA Cancer J. Clin.** v. 55, n. 3, p. 178-194, 2005.

GREEN, D. R.; REED, J. C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, v. 281, p. 1309-1312, 1998.

GUANG-JIN, Y.; XIAO-RONG, Z.; ZUO-JIONG, G.; PIN, Z.; XIAO-MEI, S.; SHI-HUA, Z. Expression and activity of inducible nitric oxide synthase correlate with ethanol-induced liver injury. **World J. Gastroenterol.**, v. 21, n. 12, p. 2375-2381, 2006.

GUTTERIDGE, J. M.; HALLIWELL, B. The deoxyribose assay: an assay both for 'free' hydroxyl radical and for site-specific hydroxyl radical production. **Biochem. J.**, v. 253, n. 3, p. 932-933, 1988.

HALLIWELL, B. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. **Mutation Res.**, v. 443, p. 37-52, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4 ed. USA: Oxford United Press, 2007.

HANSSON, M.; OLSSON, I.; NAUSEEF, W. M. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 445, p. 214-224, 2006.

HARVEY, A. L. Natural products in drug Discovery. **Drug Disc. Today**, v. 13, n. 19/20, p. 894-901, 2008.

HERR, I.; DEBATIN, K. M. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. **Blood**, v. 98, p. 2603-2614, 2001.

HILEMAN, E. O.; LIU, J.; ALBITAR, M.; KEATING, M. J.; HUANG, P. Intrinsic oxidative stress in cancer cells: a biochemical basis for therapeutic selectivity. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 53, p. 209-219, 2004.

ITHARAT, A.; OORAIKUL, B. Research on Thai medicinal plants for cancer treatment, cap. 13, p. 287-317. **In: ACHARYA, S. N.;**

THOMAS, J. E (eds). **Advances in medicinal plant research**. Kerala: Research Signpost, 2007.

IWALEWA, E. O.; MCGAW, L. J.; NAIDOO, V.; ELOFF, J. N. Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. **African J. Biotech.**, v. 6, n. 25, p. 2868-2885, 2007.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; HAO, Y.; XU, J. Cancer Statistics, 2009. **CA Cancer J. Clin.**, v. 59, p. 225-249, 2009.

JONES, D. P.; CARLSON, J. L.; MODY, V. C.; LYNN, M. J.; STERNBERG, P. Redox state of glutathione in human plasma. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 28, n. 4, p. 625-635, 2000.

JORDÃO JUNIOR, A. A.; CHIARELLO, P. G.; BERNARDES, M. S. M.; VANNUCCHI, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. **Medicina**, v. 31, p. 434-449, 1998.

KASPER, B.; D'HONDT, V.; VEREECKEN, P.; AWADA, A. Novel treatment strategies for malignant melanoma: A new beginning? **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 62, p. 16-22, 2007.

KAWAMATA, A.; ITO, D.; ODANI, T.; ISOBE, T.; IWASE, M.; HATORI, M.; NAGUMO, M. Thalidomide suppresses melanoma growth by activating natural killer cells in mice. **Oncol. Rep.**, v. 16, n. 6, p.1231-1236, 2006.

KEHRER, J. P. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology**, v. 149, p. 43-50, 2000.

KIECHLE, F. L.; ZHANG, X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. **Clin. Chim. Acta**, v. 326, p. 27-45, 2002.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. **J. Leukoc. Biol.**, v. 77, p. 598-625, 2005.

KNAPEN, A. M.; GÜNGÖR, N.; SCHINS, R. P. F.; BORN, P. J. A.; VAN SCHOOTEN, F. J. Neutrophils and respiratory tract DNA damage and mutagenesis: a review. **Mutagenesis**, v. 21, n. 4, p. 225-236, 2006.

- KOLAROVA, H.; NEVRELOVA, P.; BAJGAR, R.; KEJLOVA, K.; STRNAD, M. *In vitro* photodynamic therapy on melanoma cell lines with phthalocyanine. **Toxicol. in Vitro**, v. 21, n. 2, p. 249-253, 2007.
- KOPPENOL, W. H. Oxyradical reactions: from bond-dissociation energies to reduction potentials. **FEBS Let.**, v. 264, p. 165-167, 1990.
- KUNDU, J. K.; SURH, Y. J. Inflammation: gearing the journey to cancer. **Mutat. Res.**, v. 659, p. 15-30, 2008.
- LAU, D.; MOLLNAU, H.; EISERICH, J. P.; FREEMAN, B. A.; DAIBER, A.; GEHLING, U. M.; BRÜMER, J.; RUDOLPH, V.; MÜNZEL, T.; HEITZER, T.; MEINERTZ, T.; BALDUS, S. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/Cd18 integrins. **PNAS.**, v. 103, p. 431-436, 2005.
- LAU, D.; BALDUS, S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. **Pharmacol. Ther.**, v. 111, p. 16-26, 2006.
- LEE, M. L.; TOMSU, K.; VON ESCHEN, K. B. Duration of survival for disseminated malignant melanoma: results of a meta-analysis. **Melanoma Res.**, v. 10, n. 81, p. 154-160, 2000.
- LEITNER, R. C. M. Epidemiologia del melanoma cutáneo. **Rev. Argent. Dermatol.**, v. 87, p. 86-97, 2006.
- LENS, M. B.; DAWES, M. Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma. **Br. J. Dermatol.**, v. 150, n. 2, p. 179-185, 2004.
- LEONG, S.; RUAN, R. S.; ZHANG, Z. A critical assessment of the neurodestructive and neuroprotective effects of nitric oxide. **Annals New York Acad. Sciences**, v. 962, p. 161-181, 2002.
- LI, J. W. H.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**, v. 325, p. 161-165, 2009.
- LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação Lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Rev. Bras. Ciências Farm.**, v. 37, n. 3, 2001.

LIN, F.; THOMAS, J. P.; GIROTTI, A. W. Hyperexpression of catalase in selenium-deprived murine L1210 cells. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 305, p. 176-185, 1993.

LOCATELLI, C.; ROSSO, R.; SANTOS-SILVA, M. C.; SOUZA, C. A.; LICÍNIO, M. A.; LEAL, P.; BAZZO, M. L.; YUNES, R. A.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Ester derivatives of gallic acid with potential toxicity toward L1210 leukemia cells. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 16, p. 3791-3799, 2008.

LOCATELLI, C.; LEAL, P. C.; YUNES, R. A.; NUNES, R. J. CRECZYNSKI-PASA, T. B. Gallic acid ester derivatives induce apoptosis and cell adhesion inhibition in melanoma cells: The relationship between free radical generation, glutathione depletion and cell death. **Chem. Biol. Interact.**, v. 181, p. 175-184, 2009.

LÓPEZ-LÁZARO, M. A new view of carcinogenesis and an alternative approach to cancer therapy. **Mol. Med.**, v. 16, n. 3-4, p. 144-153, 2010.

LUI, P.; CASHIN, R.; MACHADO, M.; HEMELS, M.; COREY-LISLE, P.; EINARSON, T. R. Treatments for metastatic melanoma: Synthesis of evidence from randomized trials. **Cancer Treat. Rev.**, v. 33, n. 8, p. 665-680, 2007.

LUM, J. J.; DEBERARDINIS, R. J.; THOMPSON, C. B. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 6, n. 6, p. 439-448, 2005.

MALLE, E.; FURTMÜLLER, P. G.; SATTLER, W.; OBINGER, C. Myeloperoxidase: a target for new drug development? **Br. J. Pharmacol.**, v. 152, p. 838-854, 2007.

MALLIS, R. J.; BUSS, J. E.; THOMAS, J. A. Oxidative modification of H-ras: *S*-thiolation and *S*-nitrosylation of reactive cysteines. **Biochem. J.**, v. 355, p. 145-153, 2001.

MARSHALL, H. E.; MERCHANT, K.; STAMLER, J. S. Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. **FASEB J.**, v. 14, p. 1889-1900, 2000.

MASELLA, R.; Di BENEDETTO, R.; VARI, R.; FILESI, C.; GIOVANNINI, C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes, **J. Nutr. Biochem.**, v. 16, n. 10, p. 577-586, 2005.

MARTÍN, A. S.; QUIÑIÑIR, L.; VILLASECA, M. A.; BUSTOS, L. Características clínico-patológicas del melanoma maligno em pacientes del Hospital Hernán Henríquez Aravena de Temuco. **Rev. Anacem.**, v. 2, p. 36-39, 2008.

MATTHIJSEN, R. A.; HUUGEN, D.; HOEBERS, N. T.; VRIES, B.; PEUTZ-KOOTSTRA, C.J.; ARATANI, Y.; DAHA, M. R.; TERVAERT, J. W. C.; BUURMAN, W. A.; HEERINGA, P. Myeloperoxidase is critically involved in the induction of organ damage after renal ischemia reperfusion. **Am. J. Pathol.**, v. 171, p. 1743-52, 2007.

McCONKEY, D. J. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. **Toxicol. Lett.**, v. 99, p. 157-168, 1998.

MEIER, S.; BAUMERT, B. G.; MAIER, T.; WELLIS, G.; BURG, G.; SEIFERT, B.; DUMMER, R. Survival and prognostic factors in patients with brain metastases from malignant melanoma. **Onkologie**, v. 27, n. 2, p. 145-149, 2004.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428-435, 2008.

MIDDLETON, M. R.; GROB, J. J.; AARONSON, N.; FIERLBECK, G.; SEITER, S.; GORE, M.; AAMDAL, S.; COATES, A.; DRENO, B.; HENZ, M.; SCHADENDORF, D.; KAPP, A.; WISS, J.; FRAASS, U.; STATKEVICH, P.; MULLER, M.; THATCHER, N. Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. **J. Clin. Oncol.**, v.18, n. 11, p. 158-172, 2000.

MISHRA, K. P.; GANJU, L.; SAIRAM, M.; BANERJEE, P. K.; SAWHNEY, R. C. A review of high throughput technology for the screening of natural products. **Biomed. Pharmacother.**, v. 62, p. 94-98, 2008.

MOURÃO, P. Melanoma maligno: estudo comparativo entre o nível de conhecimentos e comportamentos preventivos nos alunos do 9º ano da área do Centro de Saúde de São João. **Rev. Port. Clin. Geral**, v. 18, p. 203-16, 2002.

NOCTOR, G.; GOMEZ, L.; VANACKER, H.; FOYER, C. H. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. **J. Exp. Bot.**, v. 53, n. 372, p. 1283-304, 2002.

OKADA, H.; MAK, T. W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nat. Rev. Cancer**, v. 4, n. 8, p. 592-603, 2004.

OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R. J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: Uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Quim. Nova**, v. 25, n. 6, p. 976-984, 2002.

OLIVEIRA FILHO, R. S.; SILVA, A. M. Está indicada a biópsia de linfonodo sentinela em melanoma espesso (> 4 mm)? **Prat. Hospit.**, v. 54, p. 21-22, 2007.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

PANASENKI, O. M.; VAKHRUSHEVA, T.; TRETAKOV, V.; SPALTEHOLZ, H.; ARNHOLD, J. Influence of chloride on modification of unsaturated phosphatidylcholines by the myeloperoxidase/hydrogen peroxide/bromide system. **Chem. Phys. Lipids.**, v. 149, p. 40-51, 2007.

PAROLIN, M. B.; REASON, I. J. M. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. **Arq. Gastroenterol.**, v. 38, n. 2, p. 138-144, 2001.

PELICANO, H.; FENG, L.; ZHOU, Y.; CAREW, J. S.; HILEMAN, E. O.; PLUNKETT, W.; KEATING, M. J.; HUANG, P. Inhibition of mitochondrial respiration: a novel strategy to enhance drug-induced apoptosis in human leukemia cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 39, p. 37832-37839, 2003.

PELICANO, H.; CARNEY, D.; HUANGA, P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. **Drug Res. Updates**, v. 7, p. 97-110, 2004.

PEREIRA, D. G. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. **Quim. Nova**, v. 30, n. 1, p. 171-177, 2007.

PHILCHENKOV, A. Caspases: potential targets for regulating cell death. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 8, n. 4, p. 432-444, 2004.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

PLASSCHAERT, S. L. A.; KAMPSA, W. A.; VELLENGAB, E.; VRIES, E. G. E.; BONTA, E. S. J. M. Prognosis in childhood and adult acute lymphoblastic leukaemia: a question of maturation? **Cancer Treat. Rev.**, v. 30, p. 37-51, 2004.

PLYTYCZ, B.; SELJELID, R. From inflammation to sickness: historical perspective. **Arch. Immunol. Ther. Exp.**, v. 51, n. 2, p. 105-109, 2003.

PONTES, Z. B. V. S.; LIMA, E. O.; CECHINEL FILHO, V. Profile of susceptibility of *Trichosporon asahii* and *Trichosporon inkin* strains against cyclic imides. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v. 43, n. 2, p. 273-279, 2007.

PRADO, S. R.; CECHINEL-FILHO, V.; CAMPOS-BUZZI, F.; CORREA, R.; CADENA, S. M.; OLIVEIRA, M. B. Biological evaluation of some selected cyclic imides: mitochondrial effects and in vitro cytotoxicity. **Z. Naturforsch**, v. 59, p. 663-672, 2004.

PRADO, S. R. **Efeitos de imidas cíclicas sobre o metabolismo mitocondrial e atividade antimelanoma**. Curitiba, 2005. Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná, 2005.

PULTE, D.; GONDOS, A.; BRENNER, H. Improvement in survival in younger patients with acute lymphoblastic leukemia from 1980s to the early 21st century. **Blood**, v. 113, n. 7, p. 1408-1411, 2009.

PUI, C. H.; JEHA, S. New therapeutic strategies for the treatment of acute lymphoblastic leukaemia. **Nature Rev.**, v. 6, p. 149-165, 2007.

QUEIROLO, P.; ACQUATI, M. Targeted therapies in melanoma. **Cancer Treat. Rev.**, v. 32, p. 524-531, 2006.

RAYMAN, M. P. The importance of selenium to human health. **Lancet**, v. 356, p.233-241, 2000.

RESENDE, R. J.; BELETTI, M. E.; MACHADO, E. R.; FONSECA, N. M.; MUNDIM, A. V.; MELO, L. C.; LIMA, C. A. P. Efeitos do mel e dos aminoácidos com levulose e os com proteolisados de fígado na hepatotoxicidade aguda induzida por tetracloreto de carbono em camundongos. **ARS Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 104-109, 2003.

RIEDL, S. J; SHI, Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. **Nature**, v. 5, p. 897-906, 2004.

REYNOLDS, W. F.; STEGEMAN, C. A.; TERVAERT, J. W. -463 G/A myeloperoxidase promoter polymorphism is associated with clinical manifestations and the course of disease in MPO-ANCA-associated vasculitis. **Clin. Immunol.**, v. 103, p. 154-160, 2002.

REYNOLDS, W. F. ; SERMET-GAUDELUS, I. ; GAUSSON, V. ; FEUILLET, M-N.; BONNEFONT, J-P. ; LENOIR, G. ; DESCAMPS-LATSCHA, B. ; WITKO-SARSAT, V. Myeloperoxidase promoter polymorphism -463G is associated with more severe clinical expression of cystic fibrosis pulmonary disease. **Mediators Inflamm.**, v. 2, p. 1-8, 2006.

RIKER, A. I.; GLASS, F.; PEREZ, I.; CRUSE, C. W.; MESSINA, J.; SONDAK, V. K. Cutaneous melanoma: methods of biopsy and definitive surgical excision. **Dermatol. Ther.**, v. 18, n.5, p. 387-393, 2005.

RODRIGUEZ-VITA, J.; LAWRENCE, T. The resolution of inflammation and cancer. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 21, p. 61-65, 2010.

SAIDA, T. Recent advances in melanoma research. **J. Dermatol. Sci.**, v. 26, p. 1-13, 2001.

SALAVEJ, P.; SPALTEHOLZ, H.; ARNHOLD, J. Modification of amino acid residues in human serum albumin by myeloperoxidase. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 40, p. 516-525, 2006.

SANCHEZ, H. A. V.; SANDOVAL, J. J.; DURAN, M. A. Synthesis and structural determination of N-(3-carboxyphenyl)maleimide. **Sci. Technica**, v. 37, n. 3, p. 507-512, 2007.

SASTRE, J.; PALLARDO, F. V.; VINA, J. Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. **IUBMB Life**, v. 49, p. 427-435, 2000.

SCHAFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 30, p. 1191-1212, 2001.

SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W. Analysis of inflammation. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 8, p. 93-151, 2006.

SERRONE, L.; ZEULI, M.; SEGA, F. M.; COGNETTI, F. Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: the year experience overview. **J. Exp. Clin. Cancer Res.**, v. 19, n. 1, p. 21-34, 2000.

SHEN, P.; WANEK, L. A.; MORTON, D. L. Is adjuvant radiotherapy necessary after positive lymph node dissection in head and neck melanomas? **Annu. Surg. Oncol.**, v. 7, n. 8, p. 554-559, 2000.

SILVA, D. G. K. C.; TEODORO, G. M.; SENA, L. V.; SOUSA, Z. M.; REZENDE, A. A. Perfil eletroforético de proteínas plasmáticas: estudo em crianças atendidas no hospital de pediatria – Hosped / UFRN da cidade de Natal-RN. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, v. 37, n. 4, p. 239-242, 2005.

SORTINO, M.; CECHINEL-FILHO, V.; CORRÊA, R.; ZACCHINO, S. N-phenyl and N-phenylalkyl-maleimides acting against *Candida* spp.: time-to-kill, stability, interaction with maleamic acids. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 16, p. 560-568, 2008.

SOUZA, C. A.; VIGORITO, A. C.; ARANHA, F. J. P.; OLIVEIRA, G. B.; EID, K. A. B.; RUIZ, M. A. Terapêutica citoprotetora em pacientes

tratados com quimio e/ou radioterapia antineoplásica. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 22, n. 2, p. 123-128, 2000.

SOUZA, S. R. P.; FISCHER, F. M.; SOUZA, J. M. P. Bronzeamento e risco de melanoma cutâneo: revisão da literatura. **Rev. Saúde Pub.**, v. 38, n. 4, p. 588-598, 2004.

SOUZA, W. A.; NEGRÃO, A. J. M.; GARCIA FILHO, C.; FERREIRA, V. H.; LINO, R. S.; FREITAS, R. S.; BIAZOTTO, G.; PEREIRA, D. M. Toxicidade de antineoplásicos revisão bibliográfica. **Rev. Cient. Eletrônica Med. Vet.**, v. 11, n. 6, 2008. Disponível em: <http://www.revista.inf.br>

STABLES, M. J.; GILROY, D. W. Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. **Prog. Lipid Res.**, *in press*, 2010. [doi:10.1016/j.plipres.2010.07.005](https://doi.org/10.1016/j.plipres.2010.07.005)

STEWART, S. G.; POLOMSKA, M. E.; LIM, R. W. A concise synthesis of maleic anhydride and maleimide natural products found in *Antrodia camphorate*. **Tetrahedron Lett.**, v. 48, p. 2241-2244, 2007.

SUNDERKÖTTER, C.; MOSSER, D.; RIDLEY, A.; SORG, C.; ROTH, J. Meeting report molecular mechanisms of inflammation: how leukocytes come, see and seize. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 82, p. 379-383, 2003.

SZABO, C.; SOUTHAN, G. J.; THIEMERMANN, C.; VANE, J. R. The mechanism of the inhibitory effect of polyamines on the induction of nitric oxide synthase. **Br. J. Pharmacol.**, v. 11, p. 757-766, 1994.

TAINTER, M. L.; MARCELLI, G. M. A. The rise of synthetic drugs in the american pharmaceutical industry. **Bull. N. Y. Acad. Med.**, v. 35, n. 6, p. 387-405, 1959.

TARHINI, A. A., AGARWALA, S. S. Novel agents in development for treatment of melanoma. **Expert Opin. Invest. Drugs**, v. 14, n. 7, p. 885-892, 2005.

TEIXEIRA, A.; MORFIM, M. P.; CORDOVA, C. A. S. de; CHARÃO, C. C. T.; LIMA, V. R. de; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Melatonin protects against pro-oxidant enzymes and reduces lipid peroxidation in

distinct membranes induced by the hydroxyl and ascorbys radicals and by peroxynitrite. **J. Pineal Res.**, v. 35, p. 1-7, 2003.

TOMASICH, F. D. S.; DEMARCHI, V. C. A.; LUZ, M. A.; DIAS, L. A. N.; KATO, M. Metástases intestinais de melanoma. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 30, n. 2, p. 92-97, 2003.

TORMO, D.; CHECINSKA, A.; ALONSO-CURBELO, D.; PÉREZ-GUIJARRO, E.; CAÑÓN, E.; et l. Targeted activation of innate immunity for therapeutic induction of autophagy and apoptosis in melanoma cells. **Cancer Cell**, v. 16, p. 103-114, 2009.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Braz. J. Pharm. Sciences**, v. 42, n. 2, p. 289-306, 2006.

TRACHOOTHAM, D.; ALEXANDRE, J. HUANG, P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 8, p. 579-591, 2009.

TREISMAN, J.; GARLIE, N. Systemic therapy for cutaneous melanoma. **Clin. Plastic. Surg.**, v. 37, p. 127-146, 2010.

USBERCO, J.; SALVADOR, E. Radicais livres do oxigênio. In: USBERCO, J.; SALVADOR, E. **Química Orgânica: Radicais**. 2. ed. São Paulo: Saraiva, 1996.

VALENCIA, H. A.; HERNÁNDEZ, H. F. C.; YÉPEZ, P. N. M. Síntesis y caracterización del sistema N-(O-nitrofenil)maleimida). **Sci. Technica**, n. 34, p. 541-544, 2007.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem. Biol. Interact.**, v. 160, p. 1-40, 2006.

VANE, J.; BOTTING, R. Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. **FASEB J.**, v. 1, p. 89-96, 1987.

VANNUCCHI, H., MOREIRA, E. A.; CUNHA, D. F.; JUNQUEIRA-FRANCO, M. V. M.; BERNARDES, M. M.; JORDÃO JÚNIOR, A. A.

Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. **Medicina**, v. 31, n. 3, p. 31-44, 1998.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINE, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VERÇOSA JÚNIOR, D.; MELO, M. M.; DANTAS-BARROS, A. M.; GOMES, A. M.; SILVA JUNIOR, P. G.; LAGO, E. P. Quadro hematológico e peso do baço de camundongos com tumor de Ehrlich na forma sólida tratados com *Agaricus blazei*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 14, p. 32-34, 2004

VICENTINO, A. R. R.; MENEZES, F. S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, n. 3, p. 384-387, 2007.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quim. Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VITALE, A.; GUARINI, A.; CHIARETTI, S.; FOÀ, R. The changing scene of adult lymphoblastic leukemia. **Curr. Opin. Oncol.**, v. 18, p. 652-659, 2006.

WAGNER, J. D.; GORDON, M. S.; CHUANG, T. Y.; COLEMAN, J. J. Current therapy of cutaneous melanoma. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 105, p. 1774-1799, 2000.

WINTER, E., CHIARADIA, L. D.; CORDOVA, C. A. S.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Naphthylchalcones induce apoptosis activation in a leukemia cell line: The relationship between mitochondrial damage, oxidative stress and cell death. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 18, n. 22, p. 8026-8034, 2010.

WINTERBOURN, C. C. Comparative reactivities of various biological compounds with mieloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride, and

similarity of the oxidant to hypochlorite. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 840, p. 204-210, 1985.

WINTERBOURN, C. C. Biological reactivity and biomarkers of the neutrophil oxidant, hypochlorous acid. **Toxicology**, v. 181, p. 223-227, 2002.

WINTERBOURN, C. C.; VISSERS, M. C. M.; KETTLE, A. J. Myeloperoxidase. **Cur. Opin. Hematol.**, v. 7, 53-58, 2000.

WITKO-SARSAT, V.; RIEU, P.; DESCAMPS-LATSCHA, B.; LESAVRE, P.; HALBWACHS-MECARELLI, L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. **Lab. Invest.**, v. 80, n. 5, p. 617-653, 2000.

YAP, W. Y.; WHITEMAN, M.; CHEUNG, N. S. Chlorinative stress: An under appreciated mediator of neurodegeneration? **Cell Signal.**, v. 19, p. 219-228, 2007.

YU, H.; PARDOLL, D.; JOVE, R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. **Nat. Rev. Cancer**, v. 9, p. 798-809, 2009.

YUNES, J. A.; CARDOSO, A. A.; YUNES, R. A.; CORRÊA, R.; CAMPOS-BUZZI, F.; CECHINEL-FILHO, V. Antiproliferative effects of a series of cyclic imides on primary endothelial cells and a leukemia cell line. **Z. Naturforsch.**, v. 63c, p. 675-680, 2008.

ZAVODNIK, I. B.; LAPSHINA, E. A.; ZAVODNIK, L. B.; SOSZYNSKI, M.; BARTOSZ, G.; BRYZSEWSKA, M. Hypochlorous acid-induced oxidative damage of human red blood cells: effects of tert-butyl hydroperoxide and nitrite on the HOCl reaction with erythrocytes. **Bioelectrochemistry**, v. 58, p. 127-135, 2002.

ZIVKOVIC, M.; POLJAK-BLAZI, M.; ZARKOVIC, K.; MIHALJEVIC, D.; SCHAUR, R. J.; ZARKOVIC, N. Oxidative burst of neutrophils against melanoma B16F10. **Cancer Lett.**, v. 246, p. 100-108, 2007.

ZWEIDLER-McKAY, P. A.; HILDEN, J. M. The ABCs of infant leukemia. **Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care**, v. 38, p. 78-94, 2008.

ANEXOS

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Contestado



UNIVERSIDADE DO CONTESTADO-Unc
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Coordenação de Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO – 183/2009

O Comitê de Ética em pesquisa da Universidade do Contestado, reunido no dia 06 de outubro de 2009, no uso de suas atribuições legais, emite parecer consubstanciado **APROVADO** ao projeto intitulado "Avaliação da atividade antimelanoma e toxicidade sistêmica de derivados maleimídicos em camundongos", da pesquisadora Vânia Floriani Noldin. O presente projeto objetiva avaliar o efeito antitumoral e antimetastático de derivados maleimídicos em modelo de tumor sólido em camundongos. Células de melanoma murino (linhagem B16F10) serão inoculadas no dorso dos animais, e após 14 dias os animais serão tratados e avaliados o perfil antitumoral. Após o término dos tratamentos, serão avaliados parâmetros de toxicidade como: peso, dados hematológicos e bioquímicos, e análise histológica dos órgãos.

Com base na avaliação do projeto considera-se o mesmo **APROVADO e ENCAMINHADO para REALIZAÇÃO**, uma vez que respeita os princípios éticos da experimentação animal.

Certo de sua colaboração subscrevemo-nos reiterando nossos votos de estima, consideração e colocando-nos a sua inteira disposição para os esclarecimentos e orientações que se fizerem necessárias.

Canoinhas 06 de outubro de 2009.

Professora Denise Cardoso
Coordenadora do Comitê de ética em Pesquisa
Canoinhas/Porto União