



Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmácia

**Avaliação da citotoxicidade de derivados de sais de isotiourônio e
tiazinodionas para estudo de leucemia *in vitro***

Laura Sartori Assunção

Florianópolis

2013

Laura Sartori Assunção

Avaliação da citotoxicidade de derivados de sais de isotiourônio e tiazinodionas para estudo de leucemia *in vitro*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmácia.

Orientadora: Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Assunção, Laura Sartori

Avaliação da citotoxicidade de derivados de sais de isotiourônio e tiazinodionas para estudo de leucemia in vitro / Laura Sartori Assunção ; orientador, Tânia Beatriz Creczynski Pasa - Florianópolis, SC, 2013.
108 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Assistência Farmacêutica.

Inclui referências

1. Assistência Farmacêutica. 2. Leucemia. 3. Sais de isotiourônio. 4. Tiazinodionas. 5. Atividade antitumoral.
I. Creczynski Pasa, Tânia Beatriz. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Assistência Farmacêutica. III. Título.

Laura Sartori Assunção

*Dedico este trabalho à minha família, minha mãe Maria Salette, meu pai Ari e meu irmão Léo pelo amor incondicional, por serem o meu alicerce, minha vida.
À minha orientadora Tânia, exemplo de conhecimento e dedicação.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, pela dádiva da vida.

Aos meus pais Ari e Maria Salette, os grandes incentivadores da minha vida acadêmica, e ao meu irmão Léo, pelo carinho e apoio, obrigado por vocês existirem, acreditarem em mim e fazerem parte de mais esta conquista;

A minha orientadora e amiga Tânia Beatriz Creczynski Pasa, por ter me recebido e acolhido em seu laboratório. Obrigada pelo voto de confiança, pelas conversas, pelos conselhos e pela orientação que resultou neste trabalho;

Aos meus colegas de laboratório, pela oportunidade de ter aprendido com vocês, pelos momentos de descontração, pelas conversas, e por se tornarem mais que apenas colegas, amigos que sempre lembrarei com muito carinho. A vocês: Dany, Evelyn, Clarissa, Carine, Ariana, Júlia, Daiane, Milene, Fabíola, Fred, Jelver, Caio, Jocelane, Tatiana, Najla, Débora, Gabi, Ícaro, Jeff, Vera, Ivonete, muito obrigada;

As professoras Andréia Valim e Jane Renner, pela construção da minha formação profissional e por me fazerem descobrir o gosto pela pesquisa, pela amizade e incentivo na busca do aumento dos meus conhecimentos, obrigada;

A Adny, meu “anjinho” que me apresentou à professora Tânia, minha amiga, confidente e parceira de laboratório, obrigada pela ajuda nas disciplinas, nos experimentos, e pela companhia no dia-a-dia do laboratório, muitas vezes à noite e finais de semana, obrigada;

Aos técnicos Denis, Bibiana e Vanessa do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia I (LAMEB I);

Ao Prof. Marcus Mandolesi Sá e seu aluno Misael Ferreira pela colaboração e síntese dos sais de isotiourônio e tiazinodionas utilizados neste trabalho.

Aos meus amigos Fernando, Felipe, Moisés, Caio, Bruna, Juliana, Carina, Carline e Nevine pela amizade sincera;;

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade em avaliar e contribuir com este trabalho;

Ao programa de Pós Graduação em Farmácia da UFSC, que possibilitou a implementação deste trabalho;

Ao CNPQ, CAPES e FAPESC, pelo suporte financeiro;

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste sonho.

"O futuro não é um lugar onde estamos indo, mas um lugar que estamos criando. O caminho para ele não é encontrado, mas construído e o ato de fazê-lo muda tanto o realizador quando o destino."

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

O câncer é caracterizado pelo crescimento desordenado de células anormais em tecidos e órgãos, podendo vir a espalhar-se por outras regiões do organismo. As células neoplásicas adquiriram a propriedade de proliferação além dos limites normais e de resistência à apoptose. O entendimento dos mecanismos moleculares de morte das células tumorais se faz necessário para o avanço em direção ao desenvolvimento de compostos antineoplásicos com maior citotoxicidade e maior seletividade para as células tumorais. A utilização de modelos celulares de leucemia na busca de novas terapias antitumorais torna-se interessante, uma vez que as linhagens celulares possibilitam a obtenção de resultados mais rápidos na prospecção de novos agentes antitumorais. Estudos anteriores demonstram que os sais de isotiourônio (SIs) apresentam atividade antibacteriana, antifúngica e antiinflamatória, porém pouco ainda se sabe sobre uma possível atividade antitumoral. As tiazinodionas (TDs) são análogos das tiazolidinedionas, conhecidas pela atividade antihiperlicêmica já bem caracterizada e mais recentemente tem sido descrita a atividade antitumoral em diversos tipos de câncer como cólon, mama, pulmão. Diante deste cenário, o objetivo desse trabalho foi pesquisar novos potenciais agentes antileucêmicos a partir de sais de isotiourônio e tiazinodionas e investigar o mecanismo de morte celular induzida por estes compostos. Observou-se que os sais de isotiourônio MF 04, MF05, MF06, MF07 e MF08 apresentaram concentração citotóxica para 50% das células (CC_{50}) na faixa de 3 a 12 μM com índice de seletividade ≥ 2 para as células de leucemia. Além disso, esses compostos parecem induzir à morte celular através da indução do estresse metabólico com produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e perda do potencial de membrana mitocondrial. O composto MF08 que apresentou a menor CC_{50} e maior índice de seletividade em células de leucemia, além de causar alterações morfológicas que sugerem morte celular por mitose catastrófica. Por esse motivo, novos compostos derivados desse SI foram sintetizados, mas os mesmos apresentaram atividade inferior à molécula de origem. As tiazinodionas 1a e 1g apresentaram CC_{50} de 35 e 28 μM respectivamente e índice de seletividade em torno de 3. O mecanismo de morte envolvido na ação das tiazinodionas está relacionado a produção de EROs, perda de potencial de membrana mitocondrial e alteração nos níveis de cálcio intracelular sugerindo um estresse de retículo endoplasmático e ativação das caspases-12 e -3

culminando em apoptose. Considerando os compostos testados, ambas as classes mostram-se promissoras para estudos pré-clínicos.

Palavras chave: câncer, leucemia, sais de isotiourônio, tiazinodionas, morte celular, apoptose, mitose catastrófica.

ABSTRACT

Cancer is characterized by abnormal growth of normal cells in tissues and organs that can spread to other regions. Neoplastic cells acquired the property of proliferation beyond normal limits and apoptosis resistance. It is important to better understand the molecular mechanisms of tumoral cell death in order to promote the development of new antineoplastic compounds with higher toxicity and selectivity. Leukemia cell models in new antitumoral research are interesting due to their easy handling and feasibility. Previous studies showed that isothiuronium salts presented antibacterial, antifungal and anti-inflammatory activities, but the antitumoral activity is still unclear. The thiazinediones are thiazolidinediones analogs which have its antihyperglycemic activity well characterized and recent studies presented their antitumoral activity in several types of cancer as colon, breast and lung. In this scenario, the aim of this work was to investigate new potential antileukemic agents by isothiuronium salts and thiazolidinediones derivatives and explore the cell death mechanism induced by them. It was observed that isothiuronium salts MF 04, MF05, MF06, MF07 and MF08 presented a range of 3 to 12 μM of the cytotoxic concentration to reach 50% of cell death (CC_{50}) and a selectivity index of ≥ 2 to leukemia cells. Furthermore, these compounds seem to induce cell death by metabolic stress with reactive oxygen species production (ROS) and loss of mitochondrial membrane potential. Compound MF08 presented the lowest CC_{50} and higher selectivity index in leukemia cells and morphologic alterations suggest that it may induce mitotic catastrophe cell death pathway. Therefore novel compounds derived from MF08 were synthesized but it was observed inferior activity compared to original molecule. Thiazinediones 1a and 1g presented CC_{50} of 35 and 28 μM respectively and selectivity index nearby 3. The mechanism of action of thiazinediones is related to ROS production, loss of mitochondrial membrane potential and calcium imbalance suggesting an endoplasmic reticulum stress and caspases -12 and 3 activation culminating in apoptosis cell death. Considering the tested compounds, both groups seem to be promising for further pre-clinical trials.

Keywords: cancer, leukemia, isothiuronium salts, thiazinediones, cell death, apoptosis, mitotic catastrophe

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1**– Diagrama de formação dos elementos figurados do sangue.33
- Figura 2**- Diagrama do ciclo celular e sítio de atividade dos complexos ciclina/Cdk na regulação do ciclo. Fases G1, S e G2 participam da interfase e fase M representa a mitose celular..... 35
- Figura 3**- Características morfológicas da morte celular. Necrose: aumento do volume das organelas celulares, perda de integridade da membrana celular e extravasamento do material citosólico. Apoptose: condensação e fragmentação da cromatina, formação de corpos apoptóticos pela compartimentalização do citoplasma e organelas, culminando na fagocitose do material celular. Autofagia: formação e acumulação de autofagossomos e autolisossomos e digestão celular por enzimas lisossomais. Paraptose: extensa vacuolização citoplasmática, com inchaço e aglomeração das mitocôndrias. Ausência de fragmentação nuclear ou formação de corpos apoptóticos..... 40
- Figura 4** – Estrutura básica das tiazolidine-2,2-dionas e 1,3-tiazin-2,4-dionas 46
- Figura 5**- Ciclo celular de L1210 após 24 horas de tratamento com CC₅₀ de MF04, 06, 07 (A) e MF05 e 08 (B). G0/G1, G2/M e S indicam fases do ciclo celular, enquanto sub/G1 refere-se à porcentagem de células fragmentadas. Cada fase do ciclo celular foi calculada usando o programa WinMIDI 2.9 e os dados estatísticos foram obtidos através do programa GraphPad Prisma 5. ***p<0,001, **p<0,01, n=3..... 61
- Figura 6** - Microscopia de fluorescência com laranja de acridina/brometo de etídeo. Setas vermelhas = apoptose Setas azuis = vacuolização, , setas amarelas brancas = necrose, setas azuis = apoptose tardia, setas vermelhasbrancas = condensação de material genético. Células L1210 controle (sem tratamento) e tratadas L1210 com a CC50 dos compostos em 24 h (A). Células CCRF-CEM controle (sem tratamento) e tratadas com CC50 de MF08 em 18 h (B). Aumento de 400x.....71
- Figura 7** - Gráfico de pontos das células tratadas com CC50 dos compostos em 24 h e marcadas com Anexina-V-FITC e iodeto de propídeo. Células localizadas no quadrante superior esquerdo = necrose, quadrante superior direito = apoptose tardia, quadrante inferior direito = apoptose, quadrante inferior esquerdo = viáveis. Tabela representativa da dispersão celular (%) de L1210 tratadas com sais de isotiourônio e avaliadas por citometria de fluxo. Os valores dos quadrantes foram

calculados utilizando o programa WinMIDI 2.9 e representam a porcentagem de células em cada um deles..... 65

Figura 8 - Efeito do CC50 dos SIs no potencial de membrana mitocondrial de células L1210 após 4h de tratamento. FCCP foi usado como controle positivo e células sem tratamento grupo controle (células sem tratamento) foram consideradas com 100% de potencial de membrana. **p<0,01, *p<0,05, n=3.....74

Figura 9 - Avaliação da geração de EROS induzidas pelo CC50 dos SIs após 4 horas de tratamento. H₂O₂ foi usada como controle positivo e os resultados foram expressos em unidades de fluorescência ***p<0,001, n=3..... 66

Figura 1 - Avaliação da geração de EROS induzidas pelo CC₅₀ dos SIs após 4 horas de tratamento. H₂O₂ foi usada como controle positivo e os resultados foram expressos em unidades de fluorescência ***p<0,001, n=3.....67

Figura 10 - Histograma representativo da distribuição celular após tratamento de 24 horas com CC50 dos derivados de MF08 (MF81-88). A tabela anexa a figura apresenta os valores da distribuição celular (%) dos histogramas para cada fase do ciclo celular. G0/G1, G2/M e S indicam fases do ciclo celular, enquanto sub/G1 refere-se à porcentagem de células fragmentadas. Os valores de cada fase do ciclo foram calculados utilizando o programa WinMIDI 2.9..... 70

Figura 11 - Microscopia de fluorescência com dupla coloração laranja de acridina/brometo de etídeo em células L1210 sem tratamento (controle) e tratadas com CC50 dos compostos MF81-88. Setas amarelas indicam fragmentação de DNA e setas brancas indicam necrose (aumento de 400x)..... 72

Figura 12 - Ciclo celular de linhagem de leucemia (L1210) (A) e melanoma (B16F10) (B) após 24 horas de tratamento com 1a (35 µM) e 1g (28 µM). G0/G1, G2/M e S indicam fases do ciclo celular, enquanto sub/G1 refere-se à porcentagem de células fragmentadas. Cada fase do ciclo celular foi calculada usando o programa WinMIDI 2.9 e os dados estatísticos foram obtidos através do programa GraphPad Prisma 5. *p<0,05, n=3..... 76

Figura 13 - Microscopia de fluorescência com dupla coloração laranja de acridina/brometo de etídeo em células L1210 sem tratamento (controle) e tratadas com CC50 dos compostos 1a e 1g. Setas amarelas indicam fragmentação de DNA e setas brancas indicam necrose (aumento de 400x)..... 77

Figura 14- Gráfico de pontos das células tratadas com CC50 dos compostos 1a e 1g em 24 h e marcadas com Anexina-V-FITC e iodeto

de propídeo. Células localizadas em Q1 = necrose, Q2 = apoptose tardia, Q3 = apoptose, Q4 = viáveis. Os valores dos quadrantes foram calculados utilizando o programa WinMIDI 2.9 e representam a porcentagem de células em cada um deles. 78

Figura 15 - Efeito do CC50 e CC70 das tiazinodionas 1a e 1g no potencial de membrana mitocondrial de células L1210 após 4h de tratamento. FCCP foi usado como controle positivo e células sem tratamento (grupo controle) foram consideradas com 100% de potencial de membrana. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, $n = 3$ 79

Figura 16 - Avaliação da geração de espécies reativas de oxigênio induzidas pelo CC50 das tiazinodionas 1a e 1g após 4h de tratamento. H₂O₂ foi usada como controle positivo e os resultados foram expressos em unidades de fluorescência. *** $p < 0,001$, $n = 3$ 80

Figura 17 - Efeito do CC50 das tiazinodionas 1a e 1g nos níveis de cálcio intracelular em células L1210 utilizando a sonda fluorescente Fluo-3-AM após 4 h de tratamento. O ionóforo de cálcio A23187 foi usado como controle positivo. Resultados foram expressos pela razão entre a fluorescência da sonda/conteúdo proteico e comparado com o grupo controle (células sem tratamento). ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, $n = 3$ 81

Figura 18 - Quantificação de caspase-3, -8, -9 e -12 em L1210. Células foram tratadas com CC50 dos compostos 1a e 1g. A atividade das caspases está apresentada em unidades de fluorescência em comparação com grupo controle (células sem tratamento) após 4 horas (A) e 12 horas (B) de tratamento. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, $n = 3$. .. 82

Figura 19 - Esquema proposto para ilustrar as alterações celulares causadas pelas tiazinodionas 1a e 1g em células de leucemia. A CC50 dos compostos causa aumento da geração de EROs e perda do potencial de membrana mitocondrial que leva à alterações nos níveis de cálcio intracelular e estresse de retículo endoplasmático. 84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Determinação de CC50 de sais de isotiourônio em célula de leucemia linfocítica aguda (L1210) e fibroblastos (Vero) e índice de seletividade dos compostos.	59
Tabela 2 - Citotoxicidade de sais de isotiourônio frente à um painel de células tumorais e uma linhagem não tumoral. CC50 de sais de isotiourônio em fibroblasto (Vero), célula de leucemia linfocítica aguda murina (L1210), leucemia mielóide crônica humana (K562) e leucemia promielocítica aguda humana (HL-60), e índice de seletividade dos compostos.....	60
Tabela 3 - Determinação de CC50 de sais de isotiourônio em célula de leucemia linfocítica aguda murina (L1210) e fibroblasto (Vero) e índice de seletividade dos compostos após 24 horas de tratamento.....	68
Tabela 4 – Determinação de CC50 das tiazinodionas em fibroblastos (Vero), célula de leucemia linfocítica aguda murina (L1210), célula de leucemia linfocítica aguda humana (CCRF-CEM), melanoma murino (B16F10) e célula de câncer de mama humana (MDA-MB-231), após 24 horas de tratamento.	74
Tabela 5 – Índice de seletividade dos compostos após 24 horas de tratamento nas linhagens celulares.	75

LISTA DE ABREVIATURAS

B16F10	Linhagem celular de melanoma murino
CC ₅₀	Concentração que inibe 50% do crescimento celular
CCRF-CEM	Linhagem celular de leucemia linfoblástica aguda humana
CO ₂	Dióxido de carbono
DCFH-DA	2',7'-Diclorodihidrofluoresceína diacetato
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
HL-60	Linhagem celular de leucemia promielocítica aguda humana
IS	Índice de Seletividade
JC1	(iodeto de 5, 5', 6, 6' – tetracloro - 1, 1, 3, 3' - tetraetilbenzimidazolilcarbocianina)
K562	Linhagem celular de leucemia mielóide crônica humana
L1210	Linhagem celular de leucemia linfoblástica aguda murina
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LLC	Leucemia Linfóide Crônica
LMA	Leucemia Mielóide Aguda

LMC	Leucemia Mielóide Crônica
MDA-MB-231	Linhagem celular de câncer de mama
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PMM	Potencial de Membrana Mitocondrial
RE	Retículo Endoplasmático
SIs	Sais de Isotiourônio
TDs	Tiazinodionas
Vero	Linhagem celular de fibroblasto

SUMÁRIO

RESUMO	50
LISTA DE FIGURAS	54
LISTA DE ABREVIATURAS	60
1 INTRODUÇÃO	28
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	32
2.1 Leucemias.....	32
2.2 Ciclo Celular.....	34
2.3 Regulação do ciclo celular.....	35
2.4 Complexo ciclina/Cdk	36
2.5 Pontos de checagem.....	36
2.6 Bases dos mecanismos moleculares do câncer	37
2.6.1 Oncogenes	38
2.7 Morte celular	39
2.7.1 Necrose.....	39
2.7.2 Morte celular autofágica.....	41
2.7.3 Mitose catastrófica	41
2.7.4 Apoptose	42
2.7.5 Vias de morte alternativas	45
2.8 Sais de isotiourônio e tiazinodionas	45
3 OBJETIVOS	48
3.1 Objetivo Geral	48
3.2 Objetivos Específicos	48
4 METODOLOGIA	50
4.1 Reagentes.....	50
4.2 Síntese de compostos.....	50
4.3 Cultura de Células	51
4.4 Tratamento Celular	51
4.5 Ensaio de Viabilidade Celular – MTT.....	51

4.6	Determinação da curva dependente de concentração.....	52
4.7	Coloração com laranja de acridina e brometo de etídio	52
4.8	Análise do ciclo celular.....	53
4.9	Coloração com anexina-V-FITC e iodeto de propídeo	54
4.10	Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) 55	
4.11	Avaliação da atividade da caspases -3, -8, -9 e -12	55
4.12	Avaliação do potencial de membrana mitocondrial	56
4.13	Cálcio Intracelular.....	57
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1	Sais de Isotiorônio e derivados	58
5.1.1	Citotoxicidade	58
5.1.2	Morte celular	61
5.1.3	Potencial de membrana mitocondrial	65
5.1.4	Geração de espécies reativas de oxigênio.....	66
5.2	Derivados do MF08	68
5.2.1	Citotoxicidade	68
5.2.2	Morte celular	71
5.3	Tiazinodionas.....	73
5.3.1	Citotoxicidade	73
5.3.2	Morte Celular	76
5.3.3	Potencial de Membrana Mitocondrial	78
5.3.4	Geração de Espécies reativas de oxigênio	79
5.3.5	Cálcio intracelular	80
5.3.6	Ativação de caspases	82
6	CONCLUSÕES.....	86
7	PERSPECTIVAS	88
	REFERENCIAS	90
	APÊNDICE	108

1 INTRODUÇÃO

O câncer é caracterizado pelo crescimento desordenado de células anormais em tecidos e órgãos, podendo vir a espalhar-se por outras regiões do organismo pelo sangue ou sistema linfático (WHO, 2013).

O desenvolvimento do câncer envolve diversos fatores de risco intrínsecos e extrínsecos. Fatores intrínsecos como idade, sexo, constituição genética, funcionamento do sistema imunológico, metabolismo, níveis hormonais e estado nutricional do paciente, podem influenciar no aparecimento da patologia. Como fatores extrínsecos podemos mencionar hábitos alimentares, bebida, tabagismo, exposição a fatores ambientais e comportamento (MALARKEY, MARANPOT, 2005).

A carcinogênese é o processo de formação do câncer, no qual estão envolvidos múltiplos estágios que levam à transformação de uma célula normal em uma célula maligna. No estágio de *iniciação* as células normais sofrem o efeito de um agente carcinogênico que provoca uma alteração e/ou deleção em algum de seus genes. No estágio de *promoção*, as células geneticamente alteradas sofrem a ação de agentes oncopromotores que irão transformar as células normais em malignas. Finalmente, no estágio de *progressão* ocorre a multiplicação descontrolada das células malignas, surgindo então as primeiras manifestações clínicas da doença. O intervalo entre a iniciação e a detecção do tumor pode ser de 10 anos ou mais (PITOT, 1993, ALMEIDA et al., 2005).

O diagnóstico confirmatório da doença é feito pela biópsia do tecido, podendo em alguns casos ser utilizada a punção com agulha no local do tumor para a obtenção de amostra tecidual para avaliação histológica, grau de invasão e pesquisa de expressão de marcadores de superfície celular ou proteínas que tipificam um câncer específico (LONGO, 2010).

Diferentemente das células normais, as células neoplásicas estão sob constante situação de estresse, como o estresse oncogênico, a instabilidade genômica e a hipóxia. Em resposta à esses eventos, células normais entram em processo de apoptose, porém as células neoplásicas frequentemente adquirem a capacidade de evitar esta resposta celular inativando as vias apoptóticas (FERNALD; KUOKAWA, 2013).

O termo morte celular programada refere-se aos mecanismos de morte que ocorrem durante o desenvolvimento do indivíduo (KROEMER; LEVINE, 2008). Os mecanismos de morte que atuam no

controle da replicação celular, mantendo a integridade das características genéticas e fisiológicas da célula, são os mesmos que, em certas situações, podem levar à formação de células neoplásicas e/ou ao desenvolvimento de resistência aos tratamentos quimioterápicos. Estes mecanismos podem ser utilizados como ferramentas para nortear o estudo de novos quimioterápicos (DALBY et al., 2010).

Atualmente os tratamentos consolidados para a terapia do câncer envolvem o uso de quimioterápicos, radioterapia, hormônioterapia (cânceres hormônio-dependentes), imunoterapia e terapia gênica. Em alguns casos, opta-se pela terapia combinada utilizando, por exemplo, a quimioterapia e radioterapia, concomitantemente ou sequencialmente à remoção do tumor (LONGO, 2010).

Para serem efetivos, a maioria dos quimioterápicos convencionais devem ser usados em altas doses, causando uma alta toxicidade aos pacientes e, em alguns casos, podem se tornar responsáveis pelo desenvolvimento de novas neoplasias por causarem danos ao DNA das células normais (BERTRAM, 2001). Neste trabalho não se pretende discutir sobre todos os antitumorais utilizados na clínica, mas nos permitimos indicar alguns exemplos para justificar nossos objetivos. Neste sentido, exemplifica-se com a classe de agentes alquilantes, que atuam intercalando-se à bases nitrogenadas do DNA e mudando a conformação estrutural do mesmo, impedindo a completa replicação ou divisão celular. Por causarem danos ao material genético, essa classe de quimioterápicos pode causar neoplasias secundárias, mais especificamente induzir à leucemia, quando utilizado em baixas doses por um longo período (LONGO, 2010).

Além da toxicidade sistêmica e o desenvolvimento de neoplasias secundárias, certos cânceres podem desenvolver resistência aos tratamentos, bem como a heterogeneidade das neoplasias faz com que os tratamentos sejam via de regra ineficazes, dificultando a cura e aumentando as recidivas. Neste sentido, faz-se necessário a busca por novas terapias contra o câncer e o entendimento dos mecanismos de morte celular envolvidos nesses processos.

A utilização de modelos celulares de leucemia na busca de novas terapias antitumorais torna-se interessante, uma vez que as linhagens celulares possibilitam a obtenção de resultados mais rápidos na prospecção de novos agentes antitumorais. Neste sentido, destaca-se a rápida proliferação celular e as atuais metodologias para avaliação dos mecanismos moleculares de ação das potenciais moléculas com ação antitumoral (MATKANNO et al., 2003).

Em vista deste cenário, neste trabalho estudamos os mecanismos de citotoxicidade de sais de isotiourônio e tiazinodionas em modelos celulares de leucemia. Os compostos foram sintetizados e caracterizados pelo grupo do Prof. Marcus Mandolesi Sá do Departamento de Química desta universidade.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Leucemias

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo, chegando a 7,6 milhões no ano de 2008. Estima-se que em 2030 esse número será de 13,1 milhões (WHO, 2013). Em 2005, o câncer matou cerca de 190.000 pessoas no Brasil, sendo que as leucemias estão entre as dez principais causas de morte tanto em homens quanto em mulheres (WHO, 2009).

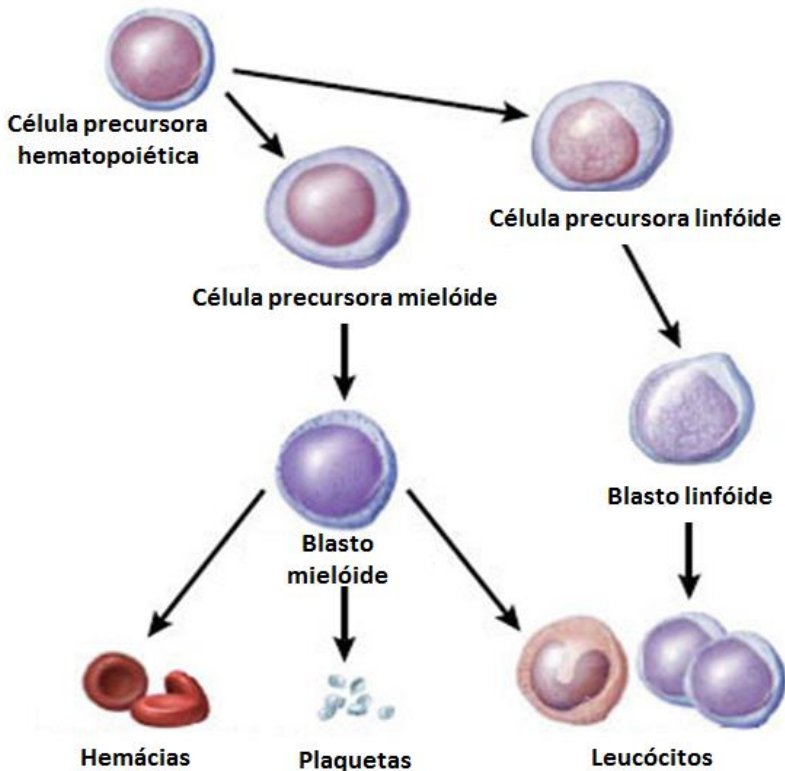
Existem mais de 100 tipos de câncer e a maioria deles é nomeada de acordo com o órgão ou tipo de célula em que a doença se inicia (WHO, 2013). As leucemias são caracterizadas pela proliferação clonal neoplásica de precursores das células sanguíneas (Figura 1), resultante de alterações genéticas que perturbam os processos celulares essenciais como a renovação, reparo, proliferação e diferenciação (SAHA; LILLEYMAN, 1998; MURATI et al., 2012).

As leucemias são classificadas de acordo com o tecido de origem, sendo denominada linfóide quando acomete células da linhagem linfóide, ou mielóide, quando acometem células da linhagem mielóide. Podem ainda ser classificadas de acordo com a progressão da doença em agudas, caracterizadas por blastos imaturos em diferentes estágios ou crônicas, com células bem diferenciadas (SZCZEPAŃSKI, VAN DER VELDEN; VAN DONGEN, 2003, BURKE; STARTZELL, 2008, GUYTON; HALL, 2011).

A leucemia linfóide aguda (LLA) ocorre principalmente em crianças e está associada à exposição uterina a fenômenos externos ao organismo como radiação ionizante, pesticidas, solventes entre outros. Ocorre em maior frequência em pacientes com síndrome de Down e neurofibromatose (BURKE; STARTZELL, 2008; PUI; ROBINSON; LOOK, 2008; ONCIU, 2009).

A leucemia linfóide crônica (LLC) é a forma mais comum de leucemia em adultos, ocorrendo em pacientes acima de 50 anos. Embora a etiologia desta leucemia permaneça desconhecida, a predisposição familiar parece ser um fator relevante. Esta doença crônica acomete majoritariamente as células B (GHIA, FERRERI, CALIGARIS-CAPPIO, 2007, BURKE; STARTZELL, 2008; DIGHIRO; HAMBLIN, 2008).

Figura 2– Diagrama de formação dos elementos figurados do sangue.



Fonte: adaptado de <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/leuks.html>

A leucemia mielóide aguda (LMA) está relacionada à doenças como síndrome de Down e anemia Fanconi, envolve fatores como hereditariedade, exposição ambiental, radiação e uso de medicamentos como quimioterápicos usados em tratamentos de outros tipos de câncer (BURKE; STARTZELL, 2008; RUBNITZ; GIBSON; SMITH, 2010).

A leucemia mielóide crônica (LMC) acomete principalmente pacientes com mais de 50 anos e é caracterizada pela presença do cromossomo Philadelphia, que ocorre pela transposição do gene BCR (*Breakpoint Region Cluster*) do cromossomo 22 com o gene ABL (*Ableson Leukemia Virus*) do cromossomo 9, causando mutações ou

deleções de genes supressores de tumor. (SAWYERS, 1999; BURKE; STARTZELL, 2008).

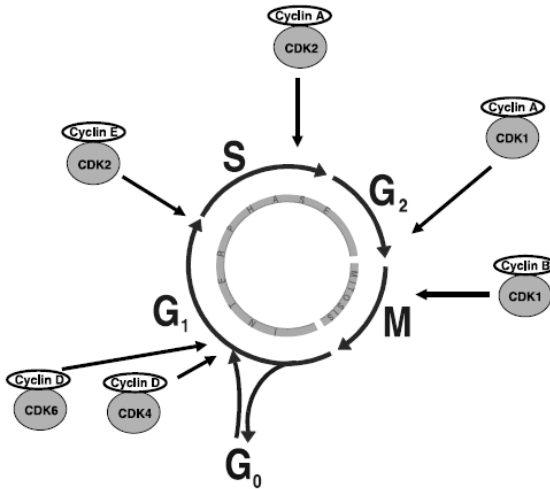
Sucintamente, o câncer é causado por uma soma de eventos incluindo alterações celulares e genéticas, além da complexidade relacionada aos variados estados de diferenciação celular, fazendo com que as populações apresentem diferentes sensibilidades à quimioterapia, radioterapia e outros tratamentos, tornando o tratamento da doença mais difícil. Para exemplificar menciona-se o que ocorre na leucemia mielóide crônica, destacando-se a translocação dos genes BCRL-ABL, em que é possível a obtenção da remissão completa da doença na maioria dos pacientes utilizando o medicamento imatinibe. No entanto, quando há a recidiva da doença, as células leucêmicas normalmente apresentam mutações na porção ABL, levando à uma resistência ao tratamento convencional (CROCE, 2008).

Cânceres em estágio avançado como a LLA e LMA apresentam grandes chances de cura com a utilização do tratamento quimioterápico adequado, já a LMC e casos de recidiva tanto de leucemias linfóides quanto mielóides podem ser tratadas com altas doses de quimioterápico associado ao transplante de medula óssea. Por outro lado, em alguns casos a LMC e LLC não respondem ao tratamento, nesse caso o quimioterápico é usado apenas como aplicação paliativa para melhora da qualidade de vida do paciente (LONGO, 2010).

2.2 Ciclo Celular

As células em divisão podem ser classificadas em dois grandes grupos: aquelas que estão em processo de mitose e aquelas que estão na interfase (Figura 2). O estágio de mitose inclui a prófase (condensação da cromatina para formação dos cromossomos e organização dos mesmos nos polos da célula), metáfase (formação do fuso mitótico, compostos por microtúbulos que emanam de polos opostos para se ligar aos cromossomos), anáfase (cromossomos filhos migram para os polos da célula, orientados pelas fibras dos fusos) e telófase (desaparecimento do fuso mitótico e reorganização dos cromossomos filhos em nucléolos) (NIGG, 2001; VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

Figura 3- Diagrama do ciclo celular e sítio de atividade dos complexos ciclina/Cdk na regulação do ciclo. Fases G₁, S e G₂ participam da interfase e fase M representa a mitose celular.



Fonte: VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003.

A interfase (Figura 2) é composta pelas fases G₁ (precede a replicação do material genético), S (síntese de DNA) e G₂ (período em que a célula se prepara para entrar em mitose). Ainda, quando necessário as células podem entrar em um estágio de latência (fase G₀) que precede a fase G₁ (Figura 2) (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

2.3 Regulação do ciclo celular

O controle do ciclo celular é realizado por meio de uma cascata de fosforilação de proteínas, que transmite sinalizações de uma fase à outra do ciclo e por pontos de checagem, destinados a manter a integridade desse processo, causando um atraso na progressão caso o mesmo não esteja íntegro (COLLINS; JACKS; PAVLETICH, 1997).

2.4 Complexo ciclina/Cdk

Na sinalização do ciclo celular a ativação de quinases ocorre por meio das ciclinas dependente de quinases (CDK), formando um complexo com ciclinas específicas, ativado apenas em determinado período do ciclo celular (Figura 2). Um exemplo é o complexo ciclina B1/Cdk1, que é mantido inativo pela fosforilação da Cdk1 pelas quinases Wee e Myt. Na fase G2 do ciclo celular, esse complexo é ativado pela fosfatase Cdc25 que a desfosforila resultando na sinalização da condensação cromossomal e formação do envelope nuclear na fase de mitose celular (COLLINS; JACKS; PAVLETICH, 1997; LINDQVIST A., et al., 2007). Em caso de dano ao DNA no gene, Chk1/2 fosforilam e inativam a fosfatase Cdc25C, evitando a desfosforilação do complexo ciclina B1/Cdk1 e este fica inativado por um período maior durante a fase G2 do ciclo celular, impedindo a continuidade do processo mitótico até que o DNA possa ser reparado (MASSAGUÉ, 2004; ENOMOTO et al., 2009; WU et al., 2012).

2.5 Pontos de checagem

A checagem do ciclo celular é realizada em pontos do ciclo que regulam as transições de fase celulares. Dessa forma, a fase seguinte do ciclo é bloqueada e só reinicia após todos os processos da fase anterior terem sido concluídos, garantindo que eventos críticos como a replicação do DNA e a segregação cromossomal estejam completas e fiéis à célula de origem. Caso haja uma falha na replicação celular, esses mecanismos podem tanto levar a uma parada no ciclo celular como induzir a célula à apoptose. Se esses pontos de checagem forem perdidos em funções de danos ao DNA, a progressão do ciclo celular pode causar uma instabilidade genômica irreparável com a propagação da mutação para as células filhas (ELLEDGE, 1996; NITTA et al., 2004; CLARKE; ALLAN, 2009).

Os pontos de checagem ocorrem em dois momentos do ciclo celular: o primeiro antecede a fase G1 impedindo que o DNA que tenha sofrido algum tipo de dano seja replicado e, segundo ponto, consiste naquele que precede a fase M, garantindo que o DNA replicado e a segregação cromossômica ocorram de maneira correta. Quando há uma falha na replicação celular, esses pontos de checagem sinalizam para

que haja uma parada do ciclo celular até que essa falha seja reparada/eliminada (CLARKE; ALLAN, 2009).

Uma proteína importante que participa de pontos de checagem no ciclo celular é a p53. Esta proteína possui, entre outras funções, monitorar a integridade do genoma replicado, e possui a capacidade de atrasar a replicação até que o reparo seja feito, ou induzir a uma série de eventos que levarão à morte celular programada quando o dano for muito extenso (BERTRAM, 2001). A p53 está envolvida nos dois pontos de checagem da replicação celular (em G1 e G2/M) e atua ativando a transcrição de genes como o GADD45 (*Growth Arrest after DNA Damage*), envolvido no bloqueio do ciclo celular na transição das fases G2/M após dano ao DNA. Além do GADD45, a proteína Bax participa da regulação da apoptose e a p21 WAF1/CIP1, cujo produto inibe complexos ciclina/quinase dependente de ciclina, essenciais para a progressão do ciclo celular (WANG et al., 1999; BADIE et al., 2000).

Defeitos nos pontos de checagem do ciclo celular, bem como alterações nas ciclinas dependente de quinases, estão associados a mutações celulares e progressão tumoral, levando a célula à proliferação contínua ou a reinicialização no ciclo celular (EVAN; VOUSDEN, 2001; MALUMBRES; BARBACID, 2009).

2.6 Bases dos mecanismos moleculares do câncer

O processo no qual as células normais são progressivamente transformadas em malignas envolve dano ao genoma celular. Esse dano pode ocorrer por processos endógenos como erros na replicação ao DNA, instabilidade química intrínseca de certas bases de DNA, ou pelo ataque de radicais livres gerados durante o metabolismo celular. Ainda, danos exógenos como radiação ionizante, radiação UV e carcinógenos químicos podem atuar na formação de neoplasias (BERTRAM, 2001).

As células tumorais diferem das células normais em diversos aspectos como controle do crescimento, morfologia, interação célula-célula, propriedades da membrana, estrutura do citoesqueleto, secreção de proteínas e expressão gênica (LODISH et al., 2000; VERMES; HAANEN; REUTELINGSPERGER, 2000)

As células neoplásicas adquirem a habilidade de manter os sinais de proliferação, produzindo mais ligantes para os fatores de crescimento e enviando sinais às células normais para que essas auxiliem no fornecimento de fatores de crescimento ao ambiente tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Os mecanismos genéticos envolvidos nas neoplasias incluem a expressão de produtos gênicos com atividade inadequada que, em condições normais, estimulam o crescimento (proto oncogenes), perda da atividade de produtos gênicos, que em condições normais inibem o crescimento (genes de supressão tumoral), expressão excessiva de produtos gênicos que impedem o processo normal de morte celular ou perda da atividade dos produtos gênicos que em condições normais promovem o reparo do dano ao DNA (STEVENS; LOWE, 2002; MITCHELL *et al.*, 2006).

2.6.1 Oncogenes

Se por um lado as células tumorais são conhecidas pela manutenção dos sinais de proliferação, por outro elas também agem inativando supressores do crescimento celular. Quando a proteína de supressão tumoral p53 recebe sinais de estresse ou anormalidades como extenso dano ao DNA ou níveis de glicose e oxigenação abaixo do normal, a p53 pode causar uma parada na progressão do ciclo celular até que estas condições possam ser normalizadas (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Em muitos tipos de câncer, como nas leucemias, a p53 apresenta-se mutada, o que permite a replicação de DNA danificado e a proliferação tumoral (LODISH *et al.*, 2000, ZHAO *et al.*, 2010; ZENZ *et al.*, 2010; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Em condições fisiológicas, a proteína cMyc atua na progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular. A ativação da cMyc é realizada por proteínas que induzem a mitose (mitógenos), desaparecendo logo que as células iniciam a fase de síntese de DNA. No entanto, esta condição não existe em células tumorais, pois apresentam altos níveis de expressão do oncogene cMyc. Para a progressão da tumorigênese é necessário que a proteína cMyc esteja constantemente ativada no estado de transformação celular além da inativação do processo apoptótico. Isso permite concluir que as proteínas Myc atuam tanto na replicação de células não tumorais, quanto na ativação e manutenção da malignidade celular (FACCHINI; PENN, 1998; BAUDINO *et al.*, 2002). A expressão de cMyc mostra-se alterada em diversos tipos de tumores, incluindo câncer de mama, cólon, cervical, câncer de pulmão de células pequenas, osteosarcomas, glioblastomas e leucemia mieloide (FACCHINI; PENN, 1998).

2.7 Morte celular

O Comitê de Nomenclatura de Morte Celular (*Nomenclature Committee on Cell Death – NCCD*) classificou morte celular segundo características morfológicas como: apoptose (reorganização do citoesqueleto, condensação da cromatina, formação e reconhecimento de corpos apoptóticos para posterior fagocitose), autofagia (vacuolização em massa e ausência de condensação da cromatina), cornificação (processo específico da epiderme caracterizado pela presença de corneócitos, ou seja, queratinócitos mortos) e necrose (ruptura da membrana plasmática com extravasamento do material celular e ativação do processo inflamatório) (KROEMER et al., 2009).

O progresso bioquímico e genético na exploração dos mecanismos de morte celular permitiu que no ano de 2012 o NCCD sugerisse uma nova classificação para os diferentes tipos de morte segundo características moleculares, aplicáveis tanto para estudos *in vivo* e *in vitro*. Segundo a última definição, a morte celular pode ser classificada em necrose regulada, morte celular autofágica, mitose catastrófica e apoptose extrínseca, apoptose intrínseca dependente ou independente de caspase (GALLUZI et al., 2012)

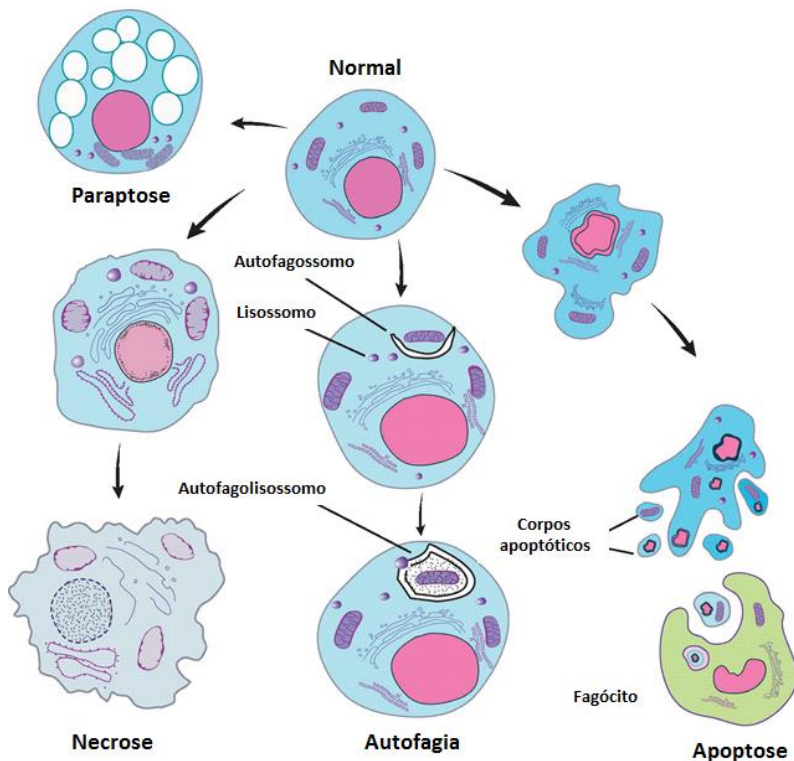
2.7.1 Necrose

A necrose (Figura 3) pode também ocorrer como uma morte celular programada (necroptose), apresentando aumento das organelas, dilatação da membrana nuclear, condensação irregular da cromatina e aumento do volume celular, culminando na ruptura da membrana plasmática e extravasamento do conteúdo celular (KROEMER; LEVINE, 2008; VITALE et al., 2011)

A necrose ocorre quando a célula não atinge os níveis energéticos mínimos, comprometendo assim processos como a troca intracelular dos íons sódio/potássio, levando a um desequilíbrio osmótico que leva à ruptura da célula (ALTAMN; RATHMELL, 2012)

Em resposta ao estresse metabólico, as células desenvolvem mecanismos adaptativos como a autofagia, com o intuito de captar mais nutrientes para a sobrevivência celular. Portanto, a inibição da autofagia na presença de estresse metabólico poderia ser utilizada como uma alternativa terapêutica no câncer, levando a célula à catástrofe metabólica e por fim, necrose (ALTAMN; RATHMELL, 2012).

Figura 4- Características morfológicas da morte celular. Necrose: aumento do volume das organelas celulares, perda de integridade da membrana celular e extravasamento do material citosólico. Apoptose: condensação e fragmentação da cromatina, formação de corpos apoptóticos pela compartimentalização do citoplasma e organelas, culminando na fagocitose do material celular. Autofagia: formação e acumulação de autofagossomos e autolisossomos e digestão celular por enzimas lisossomais. Paraptose: extensa vacuolização citoplasmática, com inchaço e aglomeração das mitocôndrias. Ausência de fragmentação nuclear ou formação de corpos apoptóticos.



Fonte: SAIKUMAR; VENKATACHALAM, 2009.

Por outro lado, apesar do colapso metabólico seguido de necrose parecer uma estratégia terapêutica atrativa, a necrose promove um processo inflamatório que, por sua vez, está diretamente ligada à tumorigênese. Com isso, estratégias que visam a ativação da apoptose continuam sendo mais interessantes (ALTAMN; RATHMELL, 2012).

2.7.2 Morte celular autofágica

A autofagia (Figura 3) é um mecanismo catabólico que leva à degradação lisossomal de estruturas citoplasmáticas pela formação de autofagossomos, vesículas de dupla membrana que engolfam os constituintes citoplasmáticos e entregam o material para a degradação lisossomal, dando à célula uma aparência vacuolada. É possível ainda que as membranas da mitocôndria, do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi contribuam para a formação dos autofagossomos (KEPP et al, 2011; ROSENFELDT; RYAN, 2011).

A formação de autolisossomos ocorre pela fusão de autofagossomos e lisossomos, formado por uma membrana simples que contém organelas em degeneração que entram em degradação pelo processo de macroautofagia (KROEMER; LEVINE, 2008; KEPP et al, 2011; ROSENFELDT; RYAN, 2011).

Eventos autofágicos podem ocorrer em resposta a diversas situações como privação de nutrientes ou fatores de crescimento, acumulação de proteínas mal enoveladas e ativação de oncogenes, apresentando funções citoprotetoras como um mecanismo de resposta ao estresse. (DALBY et al., 2010; KEPP et al, 2011; ROSENFELDT; RYAN, 2011; DENTON; NICOLSON; KUMAR, 2012).

A autofagia pode também ser considerada um mecanismo de atuação na supressão tumoral, uma vez que um defeito ou redução na capacidade autofágica fornece estímulos oncogênicos, causando a transformação neoplásica de células normais (DALBY et al., 2010; ROSENFELDT; RYAN, 2011). Assim, a indução da autofagia pela inibição de proteínas anti-autofágicas pode ser utilizada como alternativa terapêutica na morte celular de alguns tipos de câncer, como o câncer de mama e pancreático, especialmente quando essas células não apresentam moduladores apoptóticos como a BAX, BAK ou caspases (FAZI, 2008; DALBY et al., 2010; GALLUZZI et al., 2012).

2.7.3 Mitose catastrófica

A mitose catastrófica ocorre como um mecanismo para evitar a instabilidade genômica causada por falhas no processo de mitose, seja por problemas de replicação e/ou dano ao DNA ou por problemas na segregação cromossomal, surgindo após uma prolongada parada do ciclo celular na transição das fases G2/M (CASTEDO et al., 2004;

PORTUGAL; MANSILLA; BATALLER, 2010; VITALE, 2011). A inibição ou expressão de genes como ATM, ATR, Chk1, Chk2, polo-like kinase (Plk)1, Plk2, Plk3, Pin1, Mlh1 e 14-3-3-s no ponto de checagem da fase G2 do ciclo celular podem induzir a mitose catastrófica (CASTEDO et al., 2004).

A mitose catastrófica é caracterizada por condensação cromossomal prematura, formação de células grandes com múltiplos micronúcleos e ativação da caspase-2 como resposta ao DNA danificado (CASTEDO et al., 2004; RELLO-VARONA, 2010; GALLUZZI et al., 2012). Alguns autores sugerem que a mitose catastrófica pode ser considerada um mecanismo de oncossupressão em que ocorre uma aberração no processo mitótico, podendo a célula ser reparada ou entrar em processo de morte por apoptose, necrose ou senescência (MANSILLA; PRIEBE; PORTUGAL, 2006; RELLO-VARONA, 2010; VITALE, 2011). Entretanto, somente a apoptose é promovida pela ativação da proteína de supressão tumoral p53, sendo um ponto importante na diferenciação entre os dois processos de morte celular (MANSILLA; PRIEBE; PORTUGAL, 2006).

Agentes citotóxicos que impedem a polimerização ou despolimerização de microtúbulos ou que causam dano ao DNA levando a célula à morte, sem a ativação da proteína p53, durante ou próximo ao processo de metáfase, podem ser caracterizados como indutores de mitose catastrófica (BRÖKER; KRUYT; GIACCONE, 2005). Como a mitose catastrófica ocorre em células em processo proliferativo, naquelas que possuem o DNA danificado e que apresentam mutações nos pontos de checagem do ciclo celular como, por exemplo, mutações no gene supressor de tumor p53, vários autores vêm sugerindo que esse mecanismo de morte pode ser um alvo promissor em terapias contra o câncer (WONSEY; FOLLETTIE, 2005; MANSILLA; PRIEBE; PORTUGAL, 2006; NITTA et al., 2004; POON; CHOW, 2010; LANZ et al, 2013).

2.7.4 Apoptose

A apoptose (Figura 3) é considerada um processo de morte celular programada envolvida em processos fisiológicos como a morfogênese no desenvolvimento embriológico, a renovação tecidual, a involução de órgãos e a manutenção da homeostase de órgãos ou tecidos, pela eliminação de componentes que perderam as respectivas funções. A apoptose também se faz presente em processos patológicos

como inflamação, neoplasias, atrofia patológicas e injúrias teciduais (BONINI; MOURA; FRANCO, 2000).

No processo de apoptose uma série de eventos estão envolvidos, incluindo a síntese proteica, expressão de antígenos de superfície, perda da adesão celular, manutenção da atividade metabólica e produção de energia com preservação da integridade da membrana plasmática e de organelas citoplasmáticas. A célula apoptótica reorganiza o citoesqueleto, condensando a cromatina, apresenta fragmentação nuclear, diminui de tamanho e produz corpos apoptóticos que são rapidamente ingeridos por fagócitos que os reconhecem pelos antígenos de superfície produzidos durante o processo. Os corpos apoptóticos impedem o extravasamento de material citoplasmático para o meio extracelular, não havendo resposta inflamatória (BONINI; MOURA; FRANCO, 2000; KROEMER; LEVINE, 2009).

Por ser uma via de morte que participa do processo fisiológico da célula, a apoptose é ainda atualmente o mecanismo de morte mais investigado nos estudos de desenvolvimento de novos compostos com atividade antitumoral. As células neoplásicas apresentam alterações na expressão ou função de algumas moléculas apoptóticas, fazendo com que as mesmas sejam alvos interessantes na busca de uma estratégia terapêutica com menos efeitos adversos (LOWE; LIN, 2000; KASIBHATLA; TSENG, 2003; FERNALD; KUROKAWA, 2013).

2.7.4.1 Regulação da apoptose

O sistema de cascata das caspases exerce um papel fundamental na indução, tradução e amplificação dos sinais apoptóticos, sendo as proteases mais conhecidas que atuam nesse processo. Podem ser classificadas como iniciadoras (caspases-2, -8, -9 e -10) e efetoras (caspases-3, -6 e -7) e atuam tanto na via extrínseca (citoplasmática) como na via intrínseca (mitocondrial) (RIEDL; SHI, 2004; FAN et al., 2005; FERNALD; KUROKAWA, 2013).

Na via extrínseca da apoptose, a ativação das caspases iniciadoras como caspase -8 e -10 ocorrem pela formação do complexo indutor da sinalização de apoptose em resposta à conjugação de ligantes extracelulares como Fas e fator de necrose tumoral (TNF) aos receptores de superfície celular. Esses fatores quando estimulados, associam-se, por meio de proteínas adaptadoras como a FADD (Fas-Associated Protein with Death Domain), às caspases iniciadoras, ativando-as e

acionando as caspases executoras para culminar na morte celular (HOTCHKISS et al., 2009; DENTON; NICOLSON, KUMAR, 2011; FERNALD; KUOKAWA, 2013).

Na via intrínseca, estímulos como EROs, dano ao DNA, resposta à malformação de proteínas e a privação de fatores de crescimento celular levam ao acúmulo de fatores pró-apoptóticos como Bak e Bax que induzem à permeabilização da membrana mitocondrial e liberação de proteínas pró-apoptóticas como citocromo *c* e SMAC/DIABLO do meio mitocondrial para o espaço citoplasmático. No citoplasma, o citocromo *c* se liga a proteína pró-apoptótica APAF1 (fator ativador de proteases – 1) para formar o complexo ativador da caspase-9 chamado apoptossoma. A proteína SMAC aumenta a ativação de caspases via citocromo *c* pelo bloqueio de inibidores citosólicos como as IAPs (proteínas inibidoras de apoptose), que atuam na inibição das caspases-3 e -7 (HOTCHKISS et al., 2009; DENTON; NICOLSON, KUMAR, 2011; FERNALD; KUOKAWA, 2013).

A caspase-12 localiza-se no retículo endoplasmático e pode mediar a apoptose em situações de estresse de retículo. O estresse de retículo endoplasmático pode ser causado pelo acúmulo de proteínas mal enoveladas e perturbação na homeostase do cálcio (FAN et al., 2005; MALHOTRA; KAUFMAN, 2007).

A ativação da caspase-12 pode ocorrer pela atuação de outras caspases, como a translocação da caspase-7 do citoplasma para o retículo endoplasmático, interagindo com seu pro-domínio e ativando-o. Em seguida, a caspase-12 ativa a caspase-9 que por sua vez ativa as caspases efetoras -3, -6 e -7 (FAN et al., 2005)

Uma outra via de ativação da caspase-12 é o aumento da concentração de cálcio no meio citoplasmático (de micromolar para milimolar), o que ativa a protease dependente de cálcio, calpaína, e esta cliva e ativa a procaspase-12 para dar início a cascata de apoptose (MALHOTRA; KAUFMAN, 2007; PINTON et al., 2008).

Em níveis fisiológicos, o Ca^{2+} liberado pelo retículo endoplasmático durante a ativação celular é captado pela mitocôndria para aumentar o fluxo metabólico por meio da membrana e promover fosforilação oxidativa a fim de aumentar a produção de ATP (KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007). No processo apoptótico, o cálcio participa atuando como um mensageiro que coordena as interações entre a mitocôndria e o retículo endoplasmático (MATTSON; CHAN, 2003).

2.7.5 Vias de morte alternativas

Algumas vias de morte ainda não tem os respectivos mecanismos de ação bem definidos, como a paraptose, anoiquia, piroptose, entose e partanatos. Entre essas vias de morte, menciona-se a paraptose (Figura 3) que foi originalmente introduzida para descrever uma morte celular programada distinta da apoptose (SAIKUMAR; VENKATACHALAM, 2009; KROEMER et al., 2009; BERGSBAKEN; FINK; COOKSON, 2009). Semelhanças entre a paraptose, a morte celular citoplasmática e morte celular neuronal em modelos de neurodegeneração sugerem que a paraptose possa ser um processo fisiológico relevante (SPERANDIO et al., 2004).

A paraptose ocorre em células pela ativação de receptores de fatores de crescimento semelhante à insulina tipo 1 e receptores TAJ/TROY da família dos receptores TNF. Está associada à intensa vacuolização citoplasmática e aumento do volume mitocondrial e retículo endoplasmático, mas sem a presença de nenhum outro marcador de apoptose. Esse tipo de morte não envolve a expressão de caspases ou proteínas como a Bcl-2, mas parece ser mediada por membros das MAP quinases (Mitogen Activated Protein Kinases) e pode ser diferenciada da apoptose por ser inibida pela proteína AIP1/ALIX (SPERANDIO et al., 2004; BRÖKER; KRUYT; GIACCONE, 2005; SAIKUMAR; VENKATACHALAM, 2009; KROEMER et al.; 2009).

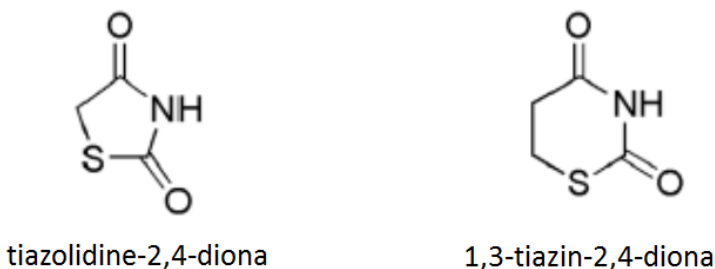
2.8 Sais de isotiourônio e tiazinodionas

Os sais de isotiourônio e seus derivados apresentaram, em estudos anteriores, atividade antibacteriana, antifúngica e antiinflamatória, bem como potencial atividade como anestésico local (REGAN; GALYSH; MORRIS, 1967; TRANI, et al., 1989; BADAWI; AZZAM; MORSY, 2006; IWAI, et al., 2007; SRIHARI, P., et al., 2009). Em estudo realizado por Koronkiewicz e colaboradores (2011), foi observada a atividade antitumoral com derivados de isotiourônio em células de leucemia promielocítica humana e leucemia crônica eritromieloblastóide. Em concentrações de no máximo 10 µM, esses compostos foram capazes de interferir no potencial da membrana mitocondrial, bloquear a fase G1 com subsequente diminuição de

células na fase G2/M e aumento do número de fragmentos de PARP (*Poly (ADP-ribose) polymerase*), que indicam uma ativação das caspases -3 e -7, desencadeando a cascata de morte por apoptose.

As tiazolidinedionas são conhecidas por sua ação antihiperlipidêmica e já vêm sendo usadas para o tratamento de diabetes do tipo 2 (ZASK et al., 1990; KRENTZ; FRIEDMANN, 2006; CHAUDHRY et al., 2007). Além disso, estudos mais recentes demonstram que esse grupo apresenta atividade antitumoral para câncer de próstata, melanoma, mama, cólon, pulmão, estômago e pâncreas, via receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR- γ) em sua maioria (NAGATA et al, 2008; NÚÑES; LIU; MEADOWS, 2006; ALLRED; KILGORE, 2005; TAKAHASHI et al., 1999; GALLI et al, 2004). As tiazinodionas (TDs) são heterociclos homólogos das tiazolidinedionas, apresentando a adição de um carbono no anel principal da molécula, mas diferente da tiazolidinedionas pouco se conhece sobre a atividade biológica das TDs, exceto por estudo publicado por Dobkin e colaboradores (1957), que demonstra a atividade analgésica de 5-etil-6-fenil-1,3-tiazin-2,4-dionas.

Figura 5 – Estrutura básica das tiazolidine-2,2-dionas e 1,3-tiazin-2,4-dionas



Fonte: Adaptado de FERREIRA, M. et al.,2013.

Esse estudo tem o intuito de pesquisar a atividade citotóxica de sais de isotiourônio e tiazinodionas em modelos de leucemia *in vitro* a fim de se verificar a possibilidade dos mesmos serem utilizados como futuros protótipos no desenvolvimento de fármacos antitumorais.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os mecanismos de citotoxicidade dos sais de isotiourônio e tiazinodionas em células de leucemia *in vitro*.

3.2 Objetivos Específicos

a) Determinar o efeito citotóxico dos sais de isotiourônio e tiazinodionas em células tumorais e não tumorais;

b) Realizar análise concentração-resposta da citotoxicidade e índice de seletividade de sais de isotiourônio e tiazinodionas em diferentes linhagens celulares;

c) Definir uma linhagem celular para dar continuidade às investigações de atividade citotóxica dos sais de isotiourônio e tiazinodionas;

d) Avaliar os mecanismos de citotoxicidade de sais de isotiourônio e tiazinodionas nas diferentes linhagens celulares a partir das possíveis alterações morfológicas observadas microscopicamente, nas alterações no ciclo celular e na ocorrência de apoptose;

e) Definir o composto mais promissor para síntese de novas moléculas derivadas e comparar atividade citotóxica com composto de origem.

4 METODOLOGIA

4.1 Reagentes

O meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), e o soro fetal bovino (SFB) foram adquiridos da Cultilab (São Paulo, Brasil); a penicilina e a estreptomicina foram adquiridas da Gibco® (Grand Island, NY, EUA); o dimetil sulfoxido (DMSO) e o álcool etílico foram adquiridos da Nuclear; o ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), o cloreto de potássio (KCl), o cloreto de sódio (NaCl), o bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e o carbonato de sódio (Na₂CO₃), foram adquiridos da Reagen (Rio de Janeiro, Brasil); a sacarose; o iodeto de propídeo e a anexina-V-FITC foram adquiridos da Merck® (Alemanha); o hidróxido de sódio (NaOH) foi adquirido da Vetek (Rio de Janeiro, Brasil); o 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolocarbocianina (JC-1) foi adquirido da Invitrogen® (Alemanha); o brometo de dimetiazol difeniltetrazólio (MTT), o ácido N-[2-Hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico] (HEPES), a albumina bovina, a pepstatina, a leupeptina, a aprotitina, o fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), a acetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA), o Triton-X100, o sulfonato de 3-[(3-cloroamidopropil)-dimetilamônio]-1-propano (CHAPS), carbonil cianeto p-trifluorometoxifenil-hidrazona (FCCP) e os substratos para caspase-3 (Ac-DEVD-AMC), caspase-8 (Ac-IETD-AMC), caspase-9 (Ac-LEDH-AFC) e caspase-12 (Ac-ATAD-AFC); o Pluronic F-127; o Fluo-3-AM e o ionóforo de cálcio A23187 foram adquiridos da Sigma® (St. Louis, MO, EUA).

4.2 Síntese de compostos

Os sais de isotiourônio (SIs) bem como as tiazinodionas (TZDs) foram sintetizados e fornecidos pelo doutorando Misael Ferreira e pelo Prof.º Dr. Marcus Mandolesi Sá do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC (FERREIRA, 2011).

4.3 Cultura de Células

Foram utilizadas linhagens de células de leucemia linfoblástica aguda de origem murina (L1210) e humana (CCRF-CEM), células de leucemia promielocítica aguda humana (HL-60), leucemia mielóide crônica humana (K562), melanoma murino (B16F10), câncer de mama humano (MDA-MB-231) e fibroblasto (VERO), todas obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ/UFRJ). As células foram mantidas em garrafas plásticas de cultura contendo meio RPMI 1640 ou DEMEM com 1,5 g/L de bicarbonato de sódio, 10 mM de HEPES, 100 U/ml de penicilina G, 100 µg/mL de estreptomicina e suplementado com 10% de soro fetal bovino; pH 7,4 em estufa umidificada a 37°C em 5% de CO₂. Para a realização dos experimentos, o número de células viáveis foi avaliado pelo método de Azul de Trypan (FRESHNEY, 1987). O número de células plaqueadas e o tempo de incubação foram adequados a cada experimento.

4.4 Tratamento Celular

Os sais de isotiourônio MF01 a MF09 foram dissolvidos em água destilada e armazenados a 4°C em alíquotas. Os compostos MF10 a MF15 e as tiazinodionas foram dissolvidas em DMSO e armazenadas a 4°C em alíquotas. Essas soluções estoques foram diluídas em meio de cultura para atingir as concentrações desejadas nos experimentos. As células foram incubadas com SIs e TDs em placas de 6, 12, 24 ou 96 poços, dependendo do procedimento experimental e por diferentes tempos. Foram utilizados controles de células sem tratamento e com tratamento de DMSO, diluído em meio de cultura, na mesma proporção utilizada para dissolver os compostos. A concentração máxima de DMSO adicionada as células foi de 0,4%.

4.5 Ensaio de Viabilidade Celular – MTT

O método do MTT baseia-se na utilização de um corante, o Brometo de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio ou Thiazolyl blue (MTT), para determinar a viabilidade celular por meio da atividade mitocondrial. O MTT é um sal de tetrazólio solúvel em água, o qual é convertido em um formazam púrpura insolúvel após a clivagem do anel

de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais. O formazan púrpura foi determinado em 540 nm sendo proporcional à viabilidade celular (MOSMANN, 1983). As células (1×10^5 / poço) foram tratadas com 1, 5, 15, 25, 50, 75 e 100 μM dos compostos em meio de cultura em placa de 96 poços por 24 h. Após período de incubação as células foram centrifugadas em placa a 800 x g por 10 min e o meio foi substituído por uma solução de MTT (0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) por cerca de 2 h a 37°C. Em seguida as células foram centrifugadas em placa a 800 x g por 10 min e a solução de MTT foi substituída por DMSO para solubilização dos cristais de formazan e leitura da absorbância em 540nm em leitor de microplacas. A densidade óptica obtida no grupo controle (células sem tratamento) foi considerada como equivalente a 100% de células viáveis e a viabilidade celular nos demais tratamentos foi calculada pela regra de três simples. Portanto, quanto maior a densidade óptica obtida no ensaio, maior o número de células viáveis.

4.6 Determinação da curva dependente de concentração

Para determinar a curva dependente de concentração as células foram incubadas por 24h com os compostos em concentrações crescentes, seguido do ensaio do MTT. A concentração que promove a morte celular em 50% das células (CC_{50}) foi calculada usando o programa GraphPad Prisma 5. O índice de seletividade destes compostos foi calculado utilizando a equação:

$$\text{IS} = \frac{\text{CC}_{50} \text{ células não tumorais}}{\text{CC}_{50} \text{ células tumorais}}$$

4.7 Coloração com laranja de acridina e brometo de etídio

Alterações morfológicas nucleares nas células são características de apoptose, e podem ser avaliadas utilizando microscopia de fluorescência, pela marcação das células com laranja de acridina (3,6-dimetilaminoacridina) e brometo de etídio (brometo de 3,8-diamino-5-ethyl-6-phenilfenantridínio) (LEITE, et al. 1999). A apoptose é caracterizada pela avaliação morfológica da célula, com enrugamento da

membrana citoplasmática e visualização da fragmentação e condensação do núcleo. Células viáveis coram-se de verde e têm as características morfológicas preservadas. Células em apoptose apresentam corpos apoptóticos corados de verde. Células em apoptose tardia coram-se de vermelho sendo possível a visualização de corpos apoptóticos. Células necróticas coram-se de laranja e mantém a estrutura nuclear normal. As células (1×10^6 / poço) foram tratadas com a CC_{50} dos compostos em meio de cultura em placa de 12 poços por 24 h. Posteriormente, as células foram centrifugadas a $800 \times g$ por 10 min e o meio foi substituído por tampão PBS e uma solução contendo laranja de acridina ($1,2 \mu\text{g/mL}$) e brometo de etídeo ($4 \mu\text{g/mL}$) foi adicionada. Em seguida as células foram novamente centrifugadas e o PBS removido para observação em microscópio de fluorescência (Nikon, Eclipse TS100). Como grupo controle foram utilizadas células sem tratamento plaqueadas nas mesmas condições de densidade e tempo. As alterações morfológicas foram avaliadas microscopicamente.

4.8 Análise do ciclo celular

Quando uma célula sofre um dano, ocorre uma parada no ciclo celular interrompendo o processo de divisão para que sejam acionadas as proteínas específicas de dano ao DNA e então dar continuidade ao ciclo. Quando este dano for grande demais para ser reparado, a eliminação da célula danificada é inevitável. Dessa forma, a análise do ciclo celular permitiu avaliar o conteúdo de DNA de cada célula, podendo ser utilizado para estimar a distribuição celular em cada fase do ciclo, bem como a regulação do mesmo (TAVARES; TAVARES, 2009; WANG et al. 2009; WU; SUN; XUE, 2010). Para a análise do ciclo celular foi utilizado iodeto de propídeo, um intercalante de DNA que pode ser quantificado por citometria de fluxo seguindo o método descrito por Yang et al. (2007). As células (1×10^6 / poço) L1210 foram tratadas com a CC_{50} dos compostos em meio de cultura em placa de 12 poços por 24 h. As células HL60 foram plaqueadas com densidade de 5×10^5 por poço em placa de 12 poços e tratadas com meio de cultura contendo a CC_{50} dos compostos por 48 h. Após este período de incubação, as células foram centrifugadas a $800 \times g$ por 10 min e lavadas com PBS. Esse processo foi repetido duas vezes para remoção total do meio de cultura. Em seguida as células foram fixadas com Etanol 70% gelado seguido de incubação a -4°C por 30 min.

Posteriormente, foi adicionada uma alíquota de PBS + BSA a 2 % e centrifugação a 800 x g por 10 min para inibir possíveis ligações inespecíficas com o iodeto de propídeo. O sobrenadante foi removido, as células foram ressuspensas em RNase 100 µg/mL + 0,1% de Triton-X em PBS e em seguida marcadas com iodeto de propídeo (1 mg/mL). A análise do DNA foi realizada por de citometria de fluxo (FACS CANTO II, BD Biosciences). A população de células em cada fase do ciclo celular foi determinada usando um programa adequado (WinMDI 2.9) e a análise estatística dos dados foi feita com a utilização do programa GraphPad Prisma 5.

4.9 Coloração com anexina-V-FITC e iodeto de propídeo

Apoptose, necrose ou dano da membrana celular podem ser analisados

por citometria de fluxo após coloração das células com anexina-V-FITC (isotiocianato de fluoresceína) e iodeto de propídeo. Na fase inicial da apoptose, ocorre a translocação da fosfatidilserina do lado interno da membrana plasmática para a camada externa, tornando-se exposta na superfície extracelular (BEVERS, et al. 1999). A anexina V é uma proteína que se liga fortemente aos fosfolipídeos de membrana, e tem alta afinidade pela fosfatidilserina. Quando acoplada ao fluroróforo FITC essa proteína pode ser usada como uma sonda (Anexina-V-FITC) sensível à exposição de fosfatidilserina sobre a membrana celular, sendo um marcador de morte por apoptose. Porém a externalização das fosfatidilserinas não é exclusivo de apoptose, ocorrendo também durante a necrose celular. A diferença entre estes dois tipos de morte é que, durante os estágios iniciais da apoptose, a membrana celular permanece intacta. Por conta disso, utiliza-se também um corante, o iodeto de propídeo, que só entrará na célula quando houver perda da integridade de membrana, sendo assim um indicativo de apoptose tardia ou morte celular por necrose (LIAO, et al. 2010). Essa ligação da Anexina-V-FITC e do Iodeto de Propídeo à célula pode ser analisada por citometria de fluxo. Para o experimento com L1210 as células (1×10^6 células/poço) foram incubadas em meio contendo a CC_{50} dos compostos por 24h. Para avaliar as células em apoptose e/ou necrose foi utilizado o kit ApopNexin™ FITC® (Millipore) e as células foram plaqueadas com densidade de 5×10^5 /poço em placa de 12 poços e tratadas em meio de cultura contendo a CC_{50} dos compostos por 48 h. Após, as células foram

centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos e lavadas duas vezes com PBS gelado. O PBS foi removido, as células foram ressuspensas em de tampão de ligação 1x (Millipore) e marcadas por 15 min a 4° C com Anexina-V-FITC e em seguida o iodeto de propídeo foi adicionado para subseqüente avaliação em citômetro de fluxo (FACS CANTO II, BD Biosciences). A população de células viáveis, em apoptose, em necrose e/ou apoptose tardia foi analisada utilizando o programa WinMDI 2.9 e a análise estatística dos dados foi feita com a utilização do programa GraphPad Prisma 5.

4.10 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Este método, proposto por Kuo e colaboradores (2008) consiste em avaliar a presença de EROs no interior da célula, pela adição do fluoróforo diacetato de 2',7'-dichlorfluoresceína (DCFH-DA, Sigma-Aldrich) que é transformado na forma reduzida (DCFH) pelas esterasas e em seguida oxidado (DCF), emitindo fluorescência, quando em presença de EROs, podendo ser analisado em fluorímetro. As células (5×10^5 / poço) foram plaqueadas em placa de 24 poços e tratadas com meio contendo a CC_{50} dos compostos pelo período de 4 h, em seguida adicionou-se 20 μ M da sonda DCFH-DA nos poços. Após 30 min de incubação o conteúdo dos poços foi transferido para tubos tipo eppendorf onde as células passaram por um processo de lavagem com PBS que foi repetido três vezes para completa remoção do excesso de sonda. Em seguida o decantado de células foi ressuspenso em PBS e uma alíquota da solução da solução foi adicionada à uma placa de 96 poços para leitura em fluorímetro com λ de excitação de 480 nm e de emissão de 520 nm (Perkin-Elmer LS55, Boston, MA, USA). O ensaio foi realizado em triplicata para cada tratamento e o valor da fluorescência foi normalizado pela quantidade de proteína em cada poço. Como grupo controle foram usadas células sem tratamento e os dados foram analisados com o programa GraphPad Prisma 5.

4.11 Avaliação da atividade da caspases -3, -8, -9 e -12

As caspases são enzimas executoras da morte por apoptose e compreendem duas classes diferentes: as iniciadoras (caspase -2, -8, -9, -10 e -12) e as efetoras (caspase -3, -6, e -7) que clivam substratos

específicos e são responsáveis pelas características típicas deste tipo de morte. A atividade das caspases -3, -8, -9 e -12 foram monitoradas pela produção de substrato fluorescente, segundo protocolo do fabricante (SIGMA-ALDRICH). As células (3×10^5 /poço) foram plaqueadas em placas de 6 poços e tratadas com meio contendo a CC_{50} dos compostos por 4 e/ou 12 ho, dependendo da necessidade do ensaio. Passado o período de incubação, as células foram lavadas com PBS e lisadas com tampão contendo 50 mM HEPES pH 7.4, 5 mM (3- propano sulfonato [(3-Colamidopropil)-dimetil ammônio]) (CHAPS), 5 mM ditiotreitól (DTT), 1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), $1 \mu\text{g/mL}$ pepstatina A, $1 \mu\text{g/mL}$ leupeptina, e $5 \mu\text{g/mL}$ aprotinina, homogeneizadas em vortex e incubadas por 20 min a 4°C . Após a lise celular as amostras foram centrifugadas a $800 \times g$ por 15 min a 4°C e o homogenato foi obtido do sobrenadante. Uma alíquota do extrato celular foi adicionado ao meio de reação contendo 25 mM HEPES pH 7.4, 1% CHAPS, 1 mM EDTA, 10% sacarose, 3 mM DTT e suplementado com o substrato correspondente para cada caspase (caspase-3: $20 \mu\text{M}$ Ac-DEVD-AMC; caspase-8: $100 \mu\text{M}$ Ac-IEDT-AMC; caspase-9: $100 \mu\text{M}$ Ac-LEDH-AFC; caspase-12: $50 \mu\text{M}$ Ac-ATAD-AFC). A clivagem do substrato fluorogênico foi detectada espectralmente (Perkin-Elmer LS55, Boston, MA, USA) após incubação de 2 h a 37°C usando λ de excitação de 380 nm e de emissão de 460 nm. Os resultados foram expressos em unidades de fluorescência arbitrárias, considerando a atividade do grupo controle como uma unidade. A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prisma 5.

4.12 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

Para avaliar a possível interferência dos compostos no potencial de membrana mitocondrial foi utilizado um marcador fluorescente denominado 5,5',6,6'-iodeto de tetraetilbenzimidazolcarbocianina (JC-1, Invitrogen, USA). Esta substância catiônica, penetra na membrana negativa da mitocôndria quando o potencial está estabelecido e se apresenta na forma de agregados que emitem fluorescência vermelha. Quando há perda do potencial de membrana mitocondrial ocorre a liberação desta sonda para o citoplasma. A sonda apresenta-se na forma de monômeros que emitem fluorescência verde. As células (1×10^6 /

poço) foram plaqueadas em placa de 12 poços e incubadas por 4 h com meio de cultura contendo a CC_{50} dos compostos. Após incubação o corante JC-1 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi adicionado por 20 min a 37 °C e 5% CO_2 . As células foram lavadas duas vezes com PBS e novamente ressuspensas em PBS para leitura espectrofluorimétrica (Perkin-Elmer LS55) em λ de excitação de 488 nm e de emissão de 590 nm para fluorescência vermelha/ 527 nm para fluorescência verde. A despolarização da membrana foi indicada pela diminuição na intensidade da razão entre a fluorescência vermelha e a verde, normalizados pelo valor da proteína. Células sem tratamento foram utilizadas como grupo controle (100% potencial de membrana mitocondrial) e um desacoplador da cadeia transportadora de elétrons, o fluorocarbonil-cianeto fenilhidrazona (FCCP), foi utilizado como controle positivo na concentração de 1 μM . A análise estatística foi realizada com a utilização do programa GraphPad Prisma 5.

4.13 Cálcio Intracelular

Para medir alterações na disponibilidade de cálcio intracelular foi utilizado a sonda Fluo-3-AM. As células (1 x 10⁵/ poço) foram plaqueadas em placa de 24 poços e incubadas por 4 h com 1 mL de meio de cultura contendo CC_{50} das TZD's **1a** e **1g** e centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos. O meio de cultura foi removido e uma solução de Hank's Balanced Salt Solution (HBBS) com 0,02% Pluronic F127 e Fluo-3 AM (3 μM) foi adicionada às células para incubação por 20 min à 37°C. Após incubação uma alíquota de HBSS com 1% FBS foi adicionado para incubação por 40 min à 37°C. As células foram então centrifugadas novamente a 800 x g por 10 min para remoção do sobrenadante, lavada 3 vezes com tampão HEPES contendo 0,1% de BSA a 37°C, e ressuspensas em PBS para leitura espectrofluorimétrica (Perkin-Elmer LS55) em λ de excitação 488 nm e de emissão de 526 nm. O conteúdo proteico foi medido em λ de excitação de 280 nm e de emissão de 340 nm. O ionóforo de cálcio A23187 foi utilizado como controle positivo e os resultados foram apresentados como a razão entre Fluo-3-AM/conteúdo proteico e comparados com o grupo controle (células sem tratamento). A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prisma 5.

4.14 Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM); cada experimento foi repetido s três vezes e em triplicata. Para a análise estatística, foram utilizados os programas GraphPad Prism 5 e Origin 6.1. Para a avaliação estatística foram utilizadas as análises de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós teste de Dunnett.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Sais de isotiourônio, n-fenil isotiourônio e n-amino isotiourônio

5.1.1 Citotoxicidade

Inicialmente realizou-se uma triagem com 15 compostos de sais de isotiourônio (MF01 a MF09), sais de n-fenil isotiourônio (MF10 a MF12) e sais de n-amino isotiourônio (MF13 a MF15) para avaliação quanto a possível atividade citotóxica em fibroblastos (Vero) e leucemia linfocítica aguda (L1210). Para essa triagem, foram realizados ensaios com sete concentrações (1, 5, 15, 25, 50, 75 e 100 μ M) em um tempo de incubação de 24 horas. Os sais de isotiourônio MF04, MF05, MF06, MF07, MF08, MF10 e MF11 apresentaram uma baixa CC_{50} ($\leq 13 \mu$ M) para a linhagem tumoral investigada, bem como um bom índice de seletividade ($IS \geq 2,0$) (Tabela 1). Devido à semelhança estrutural e método de síntese dos compostos MF04, MF05, MF06, MF07, MF08, definiu-se por trabalhar com esses cinco compostos nos demais ensaios para elucidação dos mecanismos de morte celular que os mesmos induzem.

Posteriormente, os cinco SIs previamente escolhidos foram testados em um painel de células leucêmicas e, utilizando-se as mesmas concentrações e método previamente descritos no ensaio de triagem, obteve-se o CC_{50} para as linhagens de leucemia promielocítica aguda humana (HL-60), leucemia mielóide crônica humana (K562), bem como o índice de seletividade (IS) nas novas linhagens testadas para avaliação e comparação com a linhagem L1210 (Tabela 2).

Tabela 1- Determinação de CC_{50} de sais de isotiourônio em célula de leucemia linfocítica aguda (L1210) e fibroblastos (Vero) e índice de seletividade dos compostos.

Composto	R_1	R_2	MTT*		Índice de Seletividade (IS)**
			CC_{50} (μM)		(VERO/ L1210)
			VERO	L1210	
MF01	C_6H_5	H	6 ± 1	10 ± 1	1
MF02	$2-C_{10}H_7$	H	9 ± 1	7 ± 1	1
MF03	$2-ClC_6H_4$	H	22 ± 2	16 ± 1	1
MF04	$4-NO_2C_6H_4$	H	12 ± 2	6 ± 1	2
MF05	$4-OCH_3C_6H_4$	H	29 ± 3	12 ± 1	2
MF06	$3,4-(OCH_2O)C_6H_3$	H	24 ± 2	9 ± 1	3
MF07	CH_3	H	20 ± 1	5 ± 1	4
MF08	CH_3CH_2	H	15 ± 1	3 ± 1	5
MF09	sal de S-Benzilisotiuronio [▲]	H	>100	>100	-
MF10	C_6H_5	C_6H_5	25 ± 1	13 ± 1	2
MF11	$4-NO_2C_6H_4$	C_6H_5	74 ± 4	10 ± 1	7
MF12	$4-OCH_3C_6H_4$	C_6H_5	29 ± 1	17 ± 1	2
MF13	C_6H_5	NH_2	>100	>100	-
MF14	$4-NO_2C_6H_4$	NH_2	62 ± 3	24 ± 3	3
MF15	$4-OCH_3C_6H_4$	NH_2	99 ± 4	49 ± 9	2

* Dados expressos em média \pm EP (n = 3).

** Razão entre CC_{50} de célula não tumoral/célula tumoral

[▲] Não apresenta a estrutura básica dos demais

Tabela 2- Citotoxicidade de sais de isotiourônio frente à um painel de células tumorais e uma linhagem não tumoral. CC₅₀ de sais de isotiourônio em fibroblasto (Vero), célula de leucemia linfocítica aguda murina (L1210), leucemia mielóide crônica humana (K562) e leucemia promielocítica aguda humana (HL-60), e índice de seletividade dos compostos.

Composto	CC ₅₀ (uM)*				Índice de Seletividade (IS)**		
	Vero	L1210	K562	HL60	Vero/L1210	Vero/K562	Vero/HL60
MF04	12 ± 2	6 ± 1	5 ± 1	5 ± 1	2	2	2
MF05	29 ± 3	12 ± 1	10 ± 1	8 ± 1	2	3	4
MF06	24 ± 2	9 ± 1	15 ± 2	10 ± 1	3	2	2
MF07	20 ± 1	5 ± 1	5 ± 1	7 ± 1	4	4	3
MF08	15 ± 1	3 ± 1	4 ± 1	3 ± 1	5	4	5

* Dados expressos em média ± EP (n = 3).

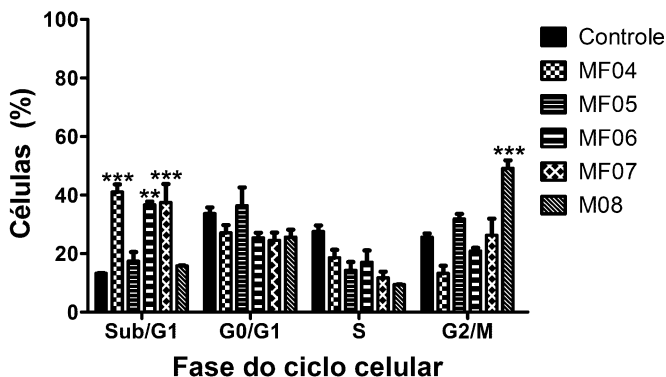
** Razão entre CC₅₀ de célula não tumoral/célula tumoral

Como observado na Tabela 2, a linhagem L1210 apresenta uma resposta citotóxica semelhante aos demais modelos de leucemia testados. Vale ressaltar que o SI MF08, possui um CC₅₀ de apenas 3 µM para e IS = 5 para L1210 e HL60, e CC₅₀ de 4 µM e IS = 4 para K562, apresentando assim a maior toxicidade e a melhor seletividade entre os compostos em estudo.

A fidelidade do ciclo celular é monitorada por mecanismos que bloqueiam a progressão de replicação celular caso algum processo crucial não seja finalizado ou haja algum dano celular. Este controle é feito pelos pontos de checagem, que permitem o reparo antes da progressão do ciclo, ou antes da célula entrar em processo de mitose (CLARKE; ALLAN, 2009). Na análise de ciclo celular é possível observar que os SIs MF04, MF06 e MF07 induzem à fragmentação do DNA, enquanto que o composto MF08 causa um bloqueio de ciclo na fase G2/M (Figura 5). O bloqueio na transição da fase G2/M ocorre quando há dano ao DNA ou replicação incompleta do material genético. Esse ponto de checagem previne a segregação cromossomal se o mesmo

não estiver intacto e induz a reparação do DNA danificado (HARTWELL; KASTAN, 1994; ELLEDGE,1996). O atraso na progressão do ciclo celular pode resultar em danos irreparáveis ao DNA, problemas no processo mitótico ou outras formas de stress celular, como indução da apoptose (CLARKE; ALLAN, 2009).

Figura 6- Ciclo celular de L1210 após 24 horas de tratamento com CC_{50} de MF04, 06, 07 (A) e MF05 e 08 (B). G0/G1, G2/M e S indicam fases do ciclo celular, enquanto sub/G1 refere-se à porcentagem de células fragmentadas. Cada fase do ciclo celular foi calculada usando o programa WinMIDI 2.9 e os dados estatísticos foram obtidos através do programa GraphPad Prisma 5. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, $n = 3$.



5.1.2 Morte celular

Para avaliar se a morte celular induzida pelos SIs era por apoptose ou necrose, realizou-se inicialmente uma avaliação morfológica das células L1210 tratadas por 24 horas com a CC_{50} dos compostos para investigação de possíveis alterações necróticas e/ou apoptóticas (Figura 6A). A observação microscópica com dupla coloração de laranja de acridina/brometo de etídeo revelou a vacuolização (setas vermelhas) das células L1210 tratadas por 24 horas com os compostos MF05, 06, e 08. Já as células tratadas com os compostos MF04 e MF07, além de apresentarem vacuolização, apresentaram sinais de necrose (setas amarelas).

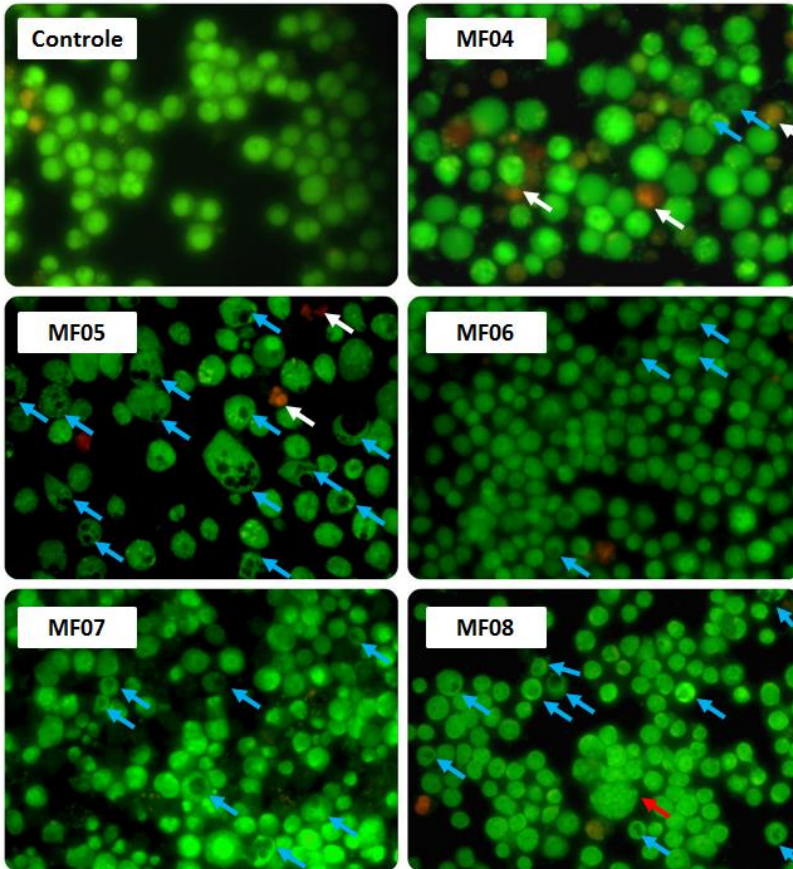
A vacuolização celular é classicamente observadas em processos autofágicos (ZHANG et al., 2010; DENTON; NICOLSON; KUMAR, 2012). Visto que esta ocorre como uma via de morte alternativa à apoptose em células com aporte energético reduzido, Ueda e colaboradores (2013) sugerem que compostos que induzem à autofagia podem ser uma alternativa no tratamento de tumores pancreáticos, que são pouco vascularizados e apresentam maior tolerância à privação de nutrientes. Nesse caso, um composto como o MF05 poderia ser uma alternativa de tratamento desses tumores..

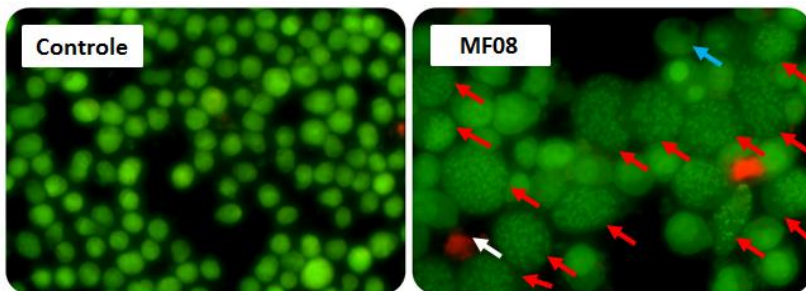
Ainda, apesar de não ser característica de todo processo apoptótico, a vacuolização é descrita por alguns autores como um processo que acompanha esse tipo de mecanismo de morte (FOO et al, 200; WANG et al., 2008), podendo ainda ser denominada de paraptose, para distinção da apoptose clássica conhecida, quando apresentando vacuolização citoplasmática e leve condensação da cromatina, não havendo ativação da via clássica de caspases (SPERANDIO; DE BELLE; BREDESEN, 2000; BRÖKER; KRUYT; GIACCONE, 2005).

No intuito de pesquisar eventos anteriores à morte celular, observou-se que quando usada a CC_{50} do MF08 por 18 h em células da linhagem CCRF-CEM, ocorreu um aumento da quantidade de material genético em grande parte das células, sugerindo que, além de induzir apoptose, esse composto pode interferir no processo de replicação celular (Figura 6B). Estudos indicam que a distribuição aleatória de grande quantidade de cromossomos condensados é causada por uma anormalidade mitótica, caracterizada como mitose catastrófica (RONINSON; BROUDE; CHANG, 2001, KROEMER et al.; 2009, MANSILLA; PRIEBE; PORTUGAL, 2006). Esta anormalidade é causada por um dano ao DNA que resulta em um bloqueio de ciclo celular na transição da fase G2/M, (WONSEY; FOLLETTIE, 2005, VITALE et al., 2011; NITTA et al., 2004, QI; et al., 2012), como observado na análise de ciclo celular em células L1210 com esse composto (Figura 4). Além disso, quando extenso este evento aberrante durante o processo de divisão celular torna-se irreparável, podendo culminar em apoptose (MANSILLA; PRIEBE; PORTUGAL, 2006; VITALE et al., 2011, GALLUZZI et al. 2012), como indícios observados por citometria de fluxo (Figura 7). Baseados nestes resultados, pode-se sugerir que esse seja o possível mecanismo envolvido na ação do composto MF08.

Figura 7 - Microscopia de fluorescência com laranja de acridina/brometo de etídeo. Setas brancas = necrose, setas azuis = vacuolização, setas vermelhas = condensação de material genético. Células L1210 controle (sem tratamento) e tratadas L1210 com a CC_{50} dos compostos em 24 h (A). Células CCRF-CEM controle (sem tratamento) e tratadas com CC_{50} de MF08 em 18 h (B). Aumento de 400x.

A



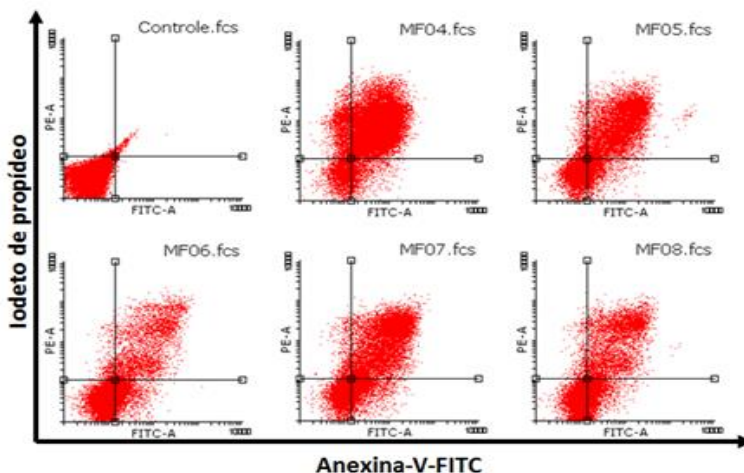
B

Os resultados microscópicos apresentados na Figura 6A corroboram os encontrados na citometria de fluxo com anexina-V-FITC e iodeto de propídeo (Figura 7), em que é possível perceber que na presença do MF04 foi observada a maior população celular em processo necrótico (9%), possivelmente em decorrência de um grupamento nitro no radical 1 da molécula, que a faz permanecer por mais tempo no organismo, conferindo-lhe maior toxicidade (TÁVORA, 2008). Ainda assim, a ação de todos os compostos resultou na conjugação do marcador anexina-V-FITC à proteína de membrana fosfatidilserina, algumas vezes acompanhada da conjugação de iodeto de propídeo ao DNA, sugerindo que esses compostos induzem apoptose tardia, fazendo com que apareçam poros na membrana celular permitindo a permeação do iodeto de propídeo.

Para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no processo de morte causado pelos SIs, buscou-se investigar possíveis alterações relacionadas à mitocôndria, avaliando então o potencial de membrana mitocondrial e a produção de espécies reativas de oxigênio.

Figura 8 - Gráfico de pontos das células tratadas com CC_{50} dos compostos em 24 h e marcadas com Anexina-V-FITC e iodeto de propídeo. Células localizadas no quadrante superior esquerdo = necrose, quadrante superior direito = apoptose tardia, quadrante inferior direito = apoptose, quadrante inferior esquerdo = viáveis. Tabela representativa da dispersão celular (%) de L1210 tratadas com sais de isotiourônio e avaliadas por citometria de fluxo. Os valores dos quadrantes foram calculados utilizando o programa WinMIDI 2.9 e representam a porcentagem de células em cada um deles.

Compostos	Quadrantes (% de células)			
	Inferior Esquerdo	Inferior Direito	Superior Esquerdo	Superior Direito
Controle	98	0	1	1
MF04	10	5	9	75
MF05	40	20	3	37
MF06	67	19	1	13
MF07	29	27	3	41
MF08	46	36	1	17

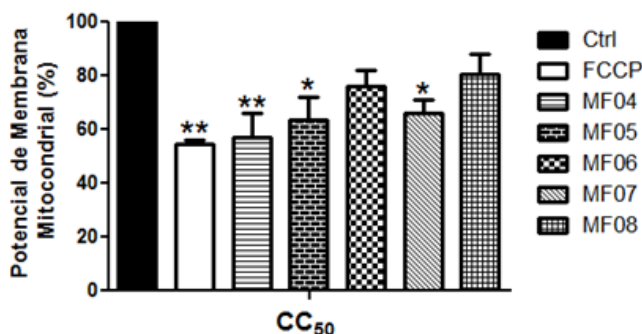


5.1.3 Potencial de membrana mitocondrial

Em alguns processos apoptóticos, a perda do potencial de membrana mitocondrial (PMM) pode ocorrer de maneira reversível ou irreversível, dependendo da extensão do dano, sendo esse fato

determinante também para o extravasamento de moléculas do interior da mitocôndria. Esta perturbação na membrana mitocondrial pode preceder o processo de morte, bem como ocorrer como uma consequência da mesma, como no caso da apoptose.. Considerando os compostos testados, podemos observar uma alteração no PMM causada pelo MF04, 05 e 07 já em 4 h de exposição (Figura 8), enquanto que a externalização da fosfatidilserina foi detectada em citometria de fluxo após 24 h (Figura 7). Este fato sugere que a perda de MMP precede ao processo apoptótico, levando a liberação de fatores apoptogênicos e diminuição da fosforilação oxidativa (LY; GRUBB; LAWEN, 2003).

Figura 9 - Efeito do CC_{50} dos SIs no potencial de membrana mitocondrial de células L1210 após 4h de tratamento. FCCP foi usado como controle positivo e células sem tratamento grupo controle (células sem tratamento) foram consideradas com 100% de potencial de membrana. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, $n = 3$.

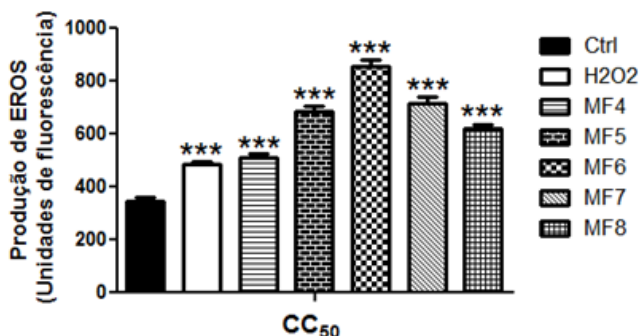


5.1.4 Geração de espécies reativas de oxigênio

Durante o processo de fosforilação oxidativa realizado pela mitocôndria, ocorre a produção de EROs que causam a redução parcial de moléculas de oxigênio, produzindo o ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$), uma espécie reativa de oxigênio, que é convertida em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que subsequentemente pode ser convertido ao radical hidroxil ($\cdot OH$), espécie altamente reativa quando comparada às demais EROs (KANG; PERVAIZ, 2012). Na Figura 9 é possível observar um aumento expressivo na produção de EROs por todos os SIs testados, chamando atenção para o MF06, que induz uma produção de EROS quase três vezes maior que as células controle. As EROS são

consideradas tóxicas para as células, pois quando há um desequilíbrio entre a atividade oxidante e a resposta antioxidante celular, ocorre estresse oxidativo capaz de causar danos a macromoléculas celulares como lipídeos, proteínas e DNA (THANNICKAL; FANBURG, 2000).

Figura 10 - Avaliação da geração de EROS induzidas pelo CC₅₀ dos SIs após 4 horas de tratamento. H₂O₂ foi usada como controle positivo e os resultados foram expressos em unidades de fluorescência ***p<0,001, n=3.



Com base nos dados encontrados, observa-se que os SIs testados parecem não atuar pela rota de apoptose clássica, apesar de apresentarem alguns eventos relacionados a esse tipo de morte. Faz-se importante a realização de ensaios adicionais para que o mecanismo de ação desses compostos seja elucidado.

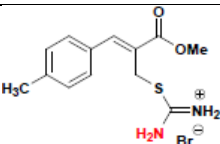
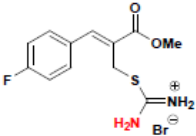
Levando-se em consideração o fato de que a autofagia pode ocorrer como um processo fisiológico na tentativa de recuperar a célula (eliminando organelas como peroxissomos, mitocôndrias e retículo endoplasmático que se encontram danificadas ou em excesso), evitando assim que a mesma entre em apoptose. Podemos também sugerir que pela extensa vacuolização e perda de grande parte do citosol e organelas, a célula seja incapacitada de recuperar suas funções normais, entrando em um processo de morte celular diferente da via apoptótica. Nesse caso, observa-se um grande comprometimento da mitocôndria, sem ativação de caspase e outros fatores envolvidos na rota clássica de apoptose (GOZUACIK; KIMCHI, 2004). Para elucidação do mecanismo de ação dos SIs daremos prosseguimento à investigação buscando elucidar o envolvimento ou não das caspases no processo de morte.

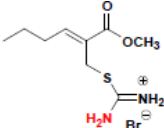
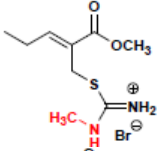
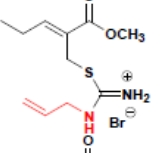

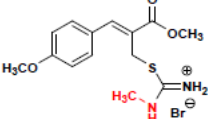
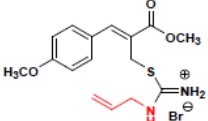
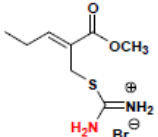
5.2 Derivados do MF08

5.2.1 Citotoxicidade

A partir do composto SI MF08, por apresentar a maior toxicidade e melhor índice de seletividade entre os compostos selecionados (Tabela 2), bem como resultados interessantes obtidos quanto ao mecanismo de morte, pois sugerem uma rota de morte diferente das convencionais, foram desenvolvidos oito derivados desta molécula a fim de elucidar o comportamento celular frente às modificações estruturais realizadas e então comparar com o composto inicial. Foi possível observar que o derivado MF86 que apresenta um anel aromático no substituinte radical 20 foi o que manteve a atividade citotóxica em L1210 mais semelhante ao composto original, porém a seletividade do mesmo diminuiu. As demais modificações estruturais diminuíram o poder citotóxico dos compostos, bem como a seletividade para as células leucêmicas (Tabela 3).

Tabela 3 - Determinação de CC_{50} de sais de isotiourônio em célula de leucemia linfocítica aguda murina (L1210) e fibroblasto (Vero) e índice de seletividade dos compostos após 24 horas de tratamento.

Composto	Estrutura	CC_{50} (μ M)*		Índice de Seletividade (IS)**
		Vero	L1210	Vero/L1210
MF81		20 ± 2	18 ± 2	1
MF82		19 ± 1	13 ± 3	1

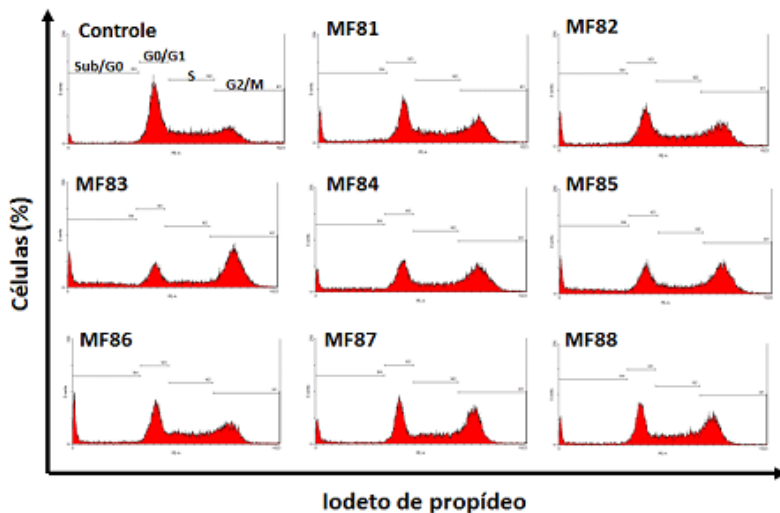
MF83		39 ± 1	14 ± 2	3
MF84		50 ± 3	20 ± 1	3
MF85		30 ± 1	15 ± 1	2
MF86		6 ± 1	3 ± 1	2
MF87		100 ± 3	75 ± 2	1
MF88		80 ± 4	60 ± 1	1
MF08		15 ± 1	3 ± 1	5

* Dados expressos em média ± EP (n = 3).

** Razão entre CC₅₀ de célula não tumoral/célula tumoral

Na sequência, foi avaliado o perfil de distribuição do ciclo celular frente aos compostos MF81 a MF88 a fim de comparação com as características do perfil de distribuição celular obtidas previamente com o sal de isotiurônio MF08 (Figura 10).

Figura 11 - Histograma representativo da distribuição celular após tratamento de 24 horas com CC_{50} dos derivados de MF08 (MF81-88). A tabela anexa a figura apresenta os valores da distribuição celular (%) dos histogramas para cada fase do ciclo celular. G0/G1, G2/M e S indicam fases do ciclo celular, enquanto sub/G1 refere-se à porcentagem de células fragmentadas. Os valores de cada fase do ciclo foram calculados utilizando o programa WinMIDI 2.9.



Fases do Ciclo	Células (%)									
	Controle	MF08	MF81	MF82	MF83	MF84	MF85	MF86	MF87	MF88
Sub/G1	4	16	12	12	19	14	18	14	10	10
G0/G1	42	26	31	29	18	25	23	31	29	31
S	24	9	24	23	12	19	17	24	22	25
G2/M	29	49	33	36	51	42	42	31	40	35

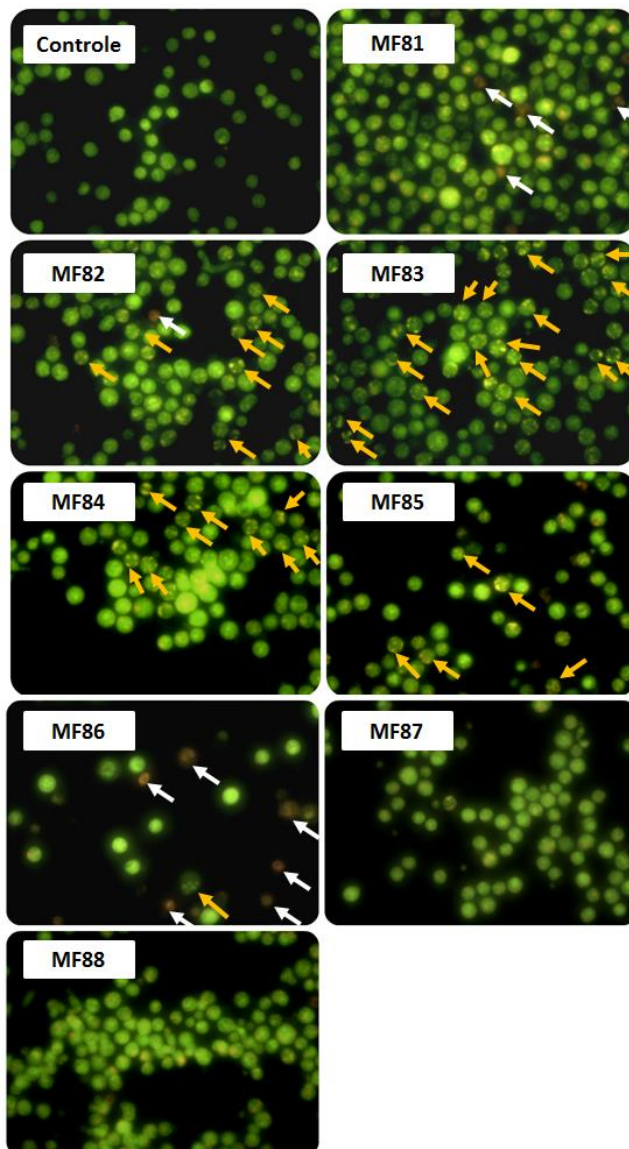
Observou-se que os compostos MF83, 84, 85 e 87 apresentaram um perfil semelhante ao MF08, com bloqueio de G2/M, dando destaque ao MF 83, condição na qual 51% das células encontravam-se nessa fase do ciclo, enquanto que no grupo controle 29% do total de células avaliadas estavam nesta fase do ciclo (Figura 10).

5.2.2 Morte celular

Observando a Tabela 3 é possível notar que as modificações estruturais realizadas para obtenção de compostos derivados do MF08 foram menos ativas que seu composto de origem, tornando todas as moléculas menos tóxicas, com exceção do MF86 que manteve o CC_{50} de 3 μ M. Entretanto, o índice de seletividade diminuiu de 5 para 2, levantando a hipótese de que a substituição de um hidrogênio por um grupo fenil no radical 2 da molécula a torna menos seletiva para a linhagem leucêmica. Em contrapartida, na análise morfológica (Figura 11), o composto MF86 foi o que promoveu maior proporção de células necróticas (setas vermelhas), juntamente com o MF81, enquanto que o MF82, MF83, MF84 e MF85 causaram condensação do material nuclear, indicativo de apoptose.

Portanto, é possível observar que as modificações estruturais realizadas na molécula do MF08 mostraram-se menos eficazes que o composto original, sugerindo que a adição de um anel aromático ao radical 2 (MF86) parece não influenciar na citotoxicidade do mesmo, mas ainda assim interfere na seletividade da molécula. Em seu trabalho, Távora (2008) afirma que aminas secundárias protonizadas ligam-se eletrostaticamente a grupos negativamente carregados de receptores celulares, sugerindo que a porção correspondente ao radical 2 da molécula é a responsável pela interação fármaco-receptor.

Figura 12 - Microscopia de fluorescência com dupla coloração laranja de acridina/brometo de etídeo em células L1210 sem tratamento (controle) e tratadas com CC_{50} dos compostos MF81-88. Setas amarelas indicam fragmentação de DNA e setas brancas indicam necrose (aumento de 400x).



5.3 Tiazinodionas

5.3.1 Citotoxicidade

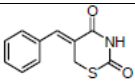
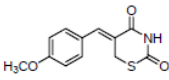
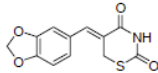
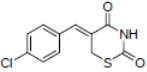
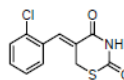
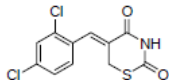
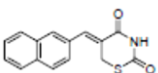
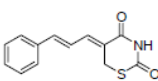
As tiazinodionas (TDs) **1a** a **1h** foram testadas em células de leucemia linfocítica aguda murina (L1210) e humana (CCRF-CEM), melanoma murino (B16F10), câncer de mama humano (MDA-MD-231) e fibroblasto (Vero) como controle não tumoral. O CC_{50} dos compostos (Tabela 4) foi determinado para cada linhagem celular pelo método de MTT seguido de regressão não linear. O índice de seletividade (Tabela 5) foi calculado pela equação descrita anteriormente.

Analisando os resultados descritos na Tabela 4, é possível observar que os compostos **1a** e **1g** demonstraram efeito citotóxico em baixas concentrações tanto em linhagem de leucemia (L1210), apresentando CC_{50} de 35 e 28 μM , respectivamente, quanto em linhagem de melanoma (B16F10), apresentando CC_{50} de 50 e 45 μM , além dos mesmos apresentarem maior índice de seletividade ($IS \geq 2.0$) em ambas as linhagens, quando comparadas com as demais tiazinodionas.

A adição de um grupo fenil ou naftil à cadeia lateral parece aumentar a citotoxicidade (Tabela 4) dessas moléculas e conferir-lhes seletividade (Tabela 5) para as linhagens de leucemia e melanoma (**1a** e **1g**). Por outro lado, a adição de carbonos à cadeia lateral precedendo o anel aromático parece diminuir expressivamente a citotoxicidade da molécula **1h** (Tabela 4). Do mesmo modo, adição de um grupo metóxi ao anel aromático da cadeia lateral no composto **1b** parece diminuir a toxicidade da molécula (Tabela 4).

A presença de um grupo cloro tanto na porção *orto* (**1e**) quanto na porção *orto-para* (**1f**) do anel aromático da cadeia lateral parecem conferir citotoxicidade à molécula (Tabela 4). Ainda, quando na posição *orto*, o grupo cloro parece também influenciar na seletividade da molécula, apresentando um $IS \geq 2.0$ para as células de leucemia L1210 (Tabela 5). Por outro lado, a presença de um grupo cloro na posição *para* (**1d**) parece ser menos eficaz que as anteriormente mencionadas, apresentando menor citotoxicidade e seletividade que as TDs **1e** e **1f** (Tabela 4 e 5).

Tabela 4 – Determinação de CC_{50} das tiazinodionas em fibroblastos (Vero), célula de leucemia linfocítica aguda murina (L1210), célula de leucemia linfocítica aguda humana (CCRF-CEM), melanoma murino (B16F10) e célula de câncer de mama humana (MDA-MB-231), após 24 horas de tratamento.

Composto	Estrutura	CC_{50} (μ M)*				
		Vero	L1210	CCRF-CEM [#]	B16F10	MDA-MB-231 [#]
1a		100±2	35±3	--	50±2	74
1b		>100	>100	--	>100	63
1c		55±3	63±3	--	48±3	96
1d		100±4	60±4	96	100±5	98
1e		60±2	27±2	49	48±2	52
1f		41±5	30±3	40	32±3	35
1g		96±5	28±1	64	45±1	93
1h		>100	>100	>100	>100	>100

* Dados expressos em média ± DP (n = 3).

Valores estimados

Tabela 5 – Índice de seletividade dos compostos após 24 horas de tratamento nas linhagens celulares.

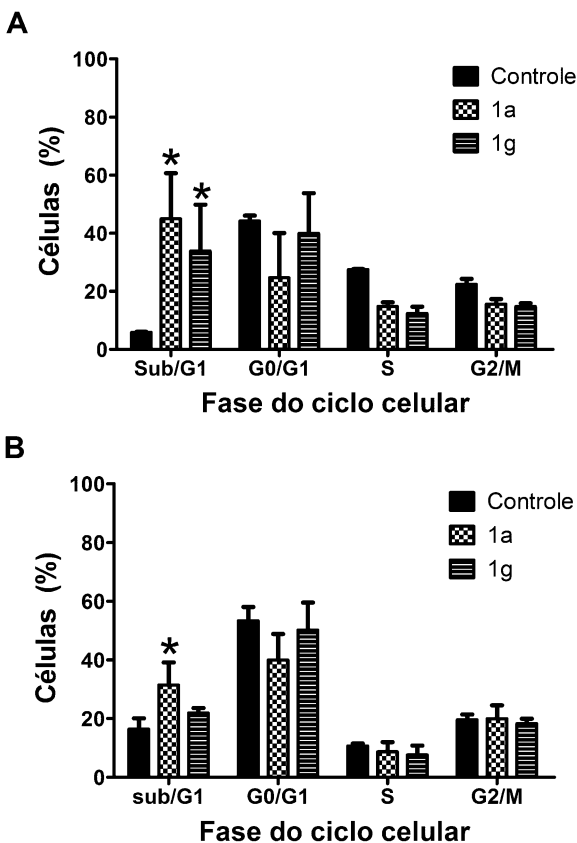
Composto	Índice de Seletividade (IS)**			
	Vero/L1210	Vero/CCRF-CEM [#]	Vero/B16F10	Vero/MDA-MB-231 [#]
1a	2,6	--	2,0	1,4
1b	--	--	--	--
1c	0,9	--	1,1	0,6
1d	1,7	1,0	1,0	1,0
1e	2,2	1,2	1,3	1,2
1f	1,4	1,0	1,3	1,2
1g	3,4	1,5	2,1	1,0
1h	--	--	--	--

** Razão entre CC_{50} de célula não tumoral/célula tumoral

Valores estimados

Devido à maior seletividade dos compostos **1a** e **1g** (Tabela 5) nas linhagens de leucemia e melanoma, a avaliação do ciclo celular foi realizada em ambas as linhagens para avaliar possíveis alterações nessas células. Para isso, as células L1210 e B16F10 foram tratadas por 24 horas com a CC_{50} dos compostos **1a** e **1g** e, como observado na Figura 12, ambos compostos causaram fragmentação celular na linhagem L1210, mas apenas o composto **1a** induziu à fragmentação na linhagem B16F10. Frente á resultados mais expressivos nas células L1210, optou-se por seguir o estudo com linhagem de leucemia para elucidação do mecanismo de ação.

Figura 13 - Ciclo celular de linhagem de leucemia (L1210) (A) e melanoma (B16F10) (B) após 24 horas de tratamento com 1a (35 μ M) e 1g (28 μ M). G0/G1, G2/M e S indicam fases do ciclo celular, enquanto sub/G1 refere-se à porcentagem de células fragmentadas. Cada fase do ciclo celular foi calculada usando o programa WinMIDI 2.9 e os dados estatísticos foram obtidos através do programa GraphPad Prisma 5. * $p < 0,05$, $n = 3$.

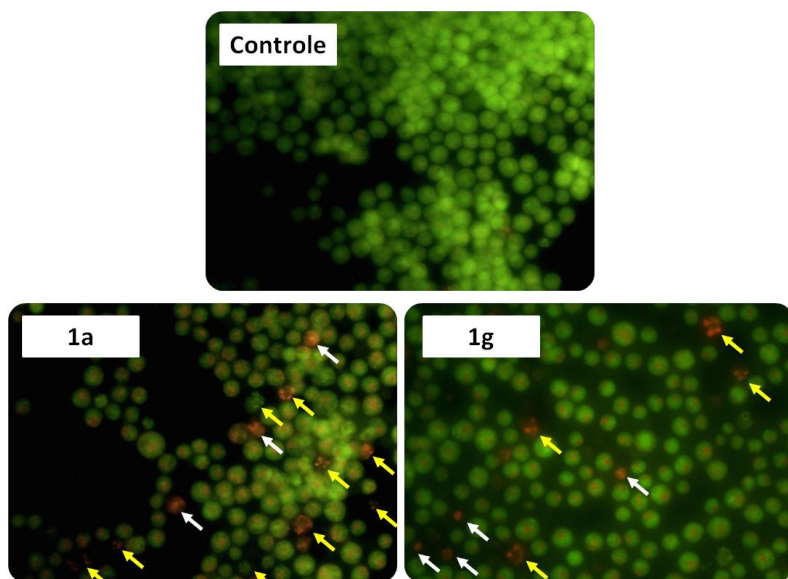


5.3.2 Morte Celular

A fim de investigar se a morte celular causada pelas tiazinodionas em células de leucemia foi resultante de necrose ou apoptose, realizaram-se ensaios qualitativos e quantitativos. Inicialmente foi feita uma avaliação morfológica utilizando microscopia de fluorescência com

dupla coloração de laranja de acridina e brometo de etídeo, em que as células L1210 após tratadas com a CC_{50} de **1a** e **1g** por 24 horas apresentaram fragmentação de DNA e em sua grande maioria, penetração do brometo de etídeo nesses núcleos picnóticos (Figura 13).

Figura 14 - Microscopia de fluorescência com dupla coloração laranja de acridina/brometo de etídeo em células L1210 sem tratamento (controle) e tratadas com CC_{50} dos compostos 1a e 1g. Setas amarelas indicam fragmentação de DNA e setas brancas indicam necrose (aumento de 400x).



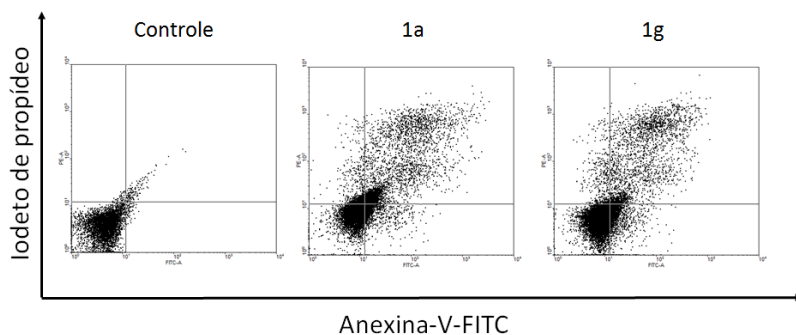
Estas alterações morfológicas sugerem que estes compostos induzem à apoptose tardia, com um certo comprometimento da membrana celular que permitiu que o brometo de etídeo pudesse transpor esta barreira e ligar-se ao material nuclear fragmentado (Figura 13).

Posteriormente foi realizada a avaliação da morte celular por citometria de fluxo, com a utilização de anexina-V-FITC e iodeto de propídeo, condição em que foi possível verificar que as observações microscópicas das células frente às TDs testadas corroboram os resultados encontrados pela citometria de fluxo (Figura 14), apresentando uma maior concentração da população celular no

quadrante referente à apoptose tardia (Q2), seguido do grupo de células referentes à apoptose (Q3).

Figura 15- Gráfico de pontos das células tratadas com CC_{50} dos compostos 1a e 1g em 24 h e marcadas com Anexina-V-FITC e iodeto de propídeo. Células localizadas em Q1 = necrose, Q2 = apoptose tardia, Q3 = apoptose, Q4 = viáveis. Os valores dos quadrantes foram calculados utilizando o programa WinMIDI 2.9 e representam a porcentagem de células em cada um deles.

Compostos	Quadrantes (% de células)			
	Inferior esquerdo	Inferior direito	Superior esquerdo	Superior direito
Controle	96,01	1,17	0,87	1,95
1a	48,89	14,34	7,83	27,95
1g	67,70	13,89	2,72	15,69



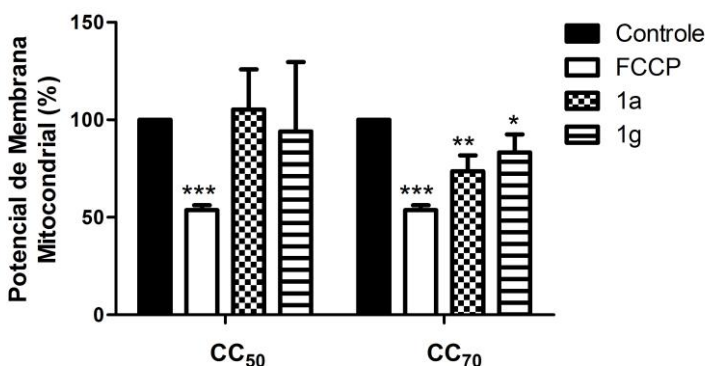
5.3.3 Potencial de Membrana Mitocondrial

Depois de caracterizado o tipo de morte celular envolvido na citotoxicidade dos compostos em estudo, deu-se continuidade na investigação das alterações celulares causadas pelas tiazinodionas no potencial de membrana mitocondrial (Figura 15).

As células foram tratadas com duas diferentes concentrações, o CC_{50} e CC_{70} das TDs em estudo. Conforme observado na Figura 15, após 4 horas de tratamento com a CC_{50} dos compostos, as células não apresentaram alteração no potencial de membrana mitocondrial, no entanto, ao aumentar a concentração até a CC_{70} das TDs, tanto o composto **1a** quanto o **1g** apresentaram um desequilíbrio no potencial de

membrana mitocondrial, indicando que possivelmente seja necessário um estímulo maior, ou alternativamente, um período maior para que esses compostos possam causar um efeito em nível mitocondrial, ou mesmo para detectar-se experimentalmente.

Figura 16 - Efeito do CC_{50} e CC_{70} das tiazinodionas **1a** e **1g** no potencial de membrana mitocondrial de células L1210 após 4h de tratamento. FCCP foi usado como controle positivo e células sem tratamento (grupo controle) foram consideradas com 100% de potencial de membrana. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, $n=3$.

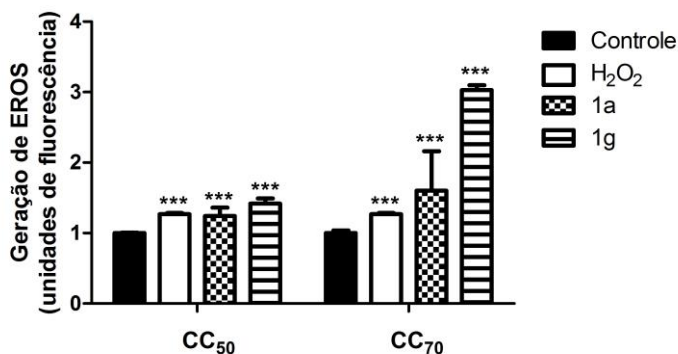


5.3.4 Geração de Espécies reativas de oxigênio

A atividade mitocondrial está também relacionada à produção de EROs, que são produtos metabólicos celulares em resposta a diversos estímulos. A presença de EROs pode induzir o estresse oxidativo resultando em morte celular por necrose, ou ainda ativar o processo apoptótico quando as moléculas reativas são oriundas da mitocôndria, uma vez que trata-se da principal organela envolvida no desequilíbrio metabólico/energético celular (FLEURY; MIGNOTTE; VAYSSIÈRE, 2002). Os compostos **1a** e **1g** foram avaliados quanto à capacidade de induzir o aumento da geração de EROs por ensaio fluorimétrico. Observou-se que após 4 horas de tratamento das células leucêmicas, ambas tiazinodionas promoveram um aumento na produção de EROs quando utilizada a CC_{50} dos compostos. Com o aumento da concentração para a CC_{70} das TDS, observou-se um expressivo aumento

na produção de EROs nas células tratadas com o composto **1g**, apresentando valores quase três vezes maiores que no grupo controle (Figura 16).

Figura 17 - Avaliação da geração de espécies reativas de oxigênio induzidas pelo CC₅₀ das tiazinodionas **1a** e **1g** após 4h de tratamento. H₂O₂ foi usada como controle positivo e os resultados foram expressos em unidades de fluorescência. ***p<0,001, n=3.



As espécies reativas de oxigênio estão presentes tanto em estágios iniciais quanto avançados no processo de morte por apoptose, atuando, por exemplo, em eventos anteriores à permeabilização da membrana mitocondrial, o que torna mais difícil determinar se a acumulação de EROs é a causa ou um efeito nas alterações mitocondriais (FLEURY; MIGNOTTE; VAYSSIÈRE, 2002).

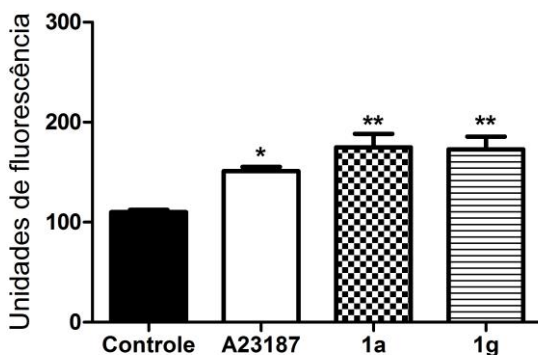
5.3.5 Cálcio intracelular

O retículo endoplasmático (RE) é uma complexa rede membranosa que possui um papel importante no enovelamento de proteínas secretórias e de membrana, na homeostase do cálcio e síntese de lipídios. Em condições de estresse, sensores transmembrana detectam o acúmulo de proteínas enoveladas e ativam a cascata de sinalização do sistema de resposta de proteínas enoveladas (UPR). Quando esse sistema não consegue reverter a situação de estresse ou quando essa condição permanece por longos períodos, o estresse de RE leva à morte

celular por apoptose (MINAMINO; KOMURO; KITAKAZE, 2010). As funções normais do RE podem ser afetadas por diversos fatores como hipóxia, hipoglicemia, hipertermia, acidose, níveis de Ca^{2+} , níveis energéticos, entre outros, resultando no estresse de RE e impactando no enovelamento de proteínas no lúmen dessa organela (SCHÖNTHAL, 2012).

Tanto o estresse de RE quanto o estresse oxidativo via geração de EROs podem aumentar o extravasamento de Ca^{2+} do interior do RE. O aumento de Ca^{2+} no meio citosólico pode então estimular a produção de novas EROs pela mitocôndria (MALHOTRA; KAUFMAN, 2007).

Figura 18 - Efeito do CC_{50} das tiazinodionas **1a** e **1g** nos níveis de cálcio intracelular em células L1210 utilizando a sonda fluorescente Fluo-3-AM após 4 h de tratamento. O ionóforo de cálcio A23187 foi usado como controle positivo. Resultados foram expressos pela razão entre a fluorescência da sonda/conteúdo proteico e comparado com o grupo controle (células sem tratamento). ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, $n=3$.



Como previamente mostrado e discutido, foi observado que as tiazinodionas **1a** e **1g** aumentam a produção de EROs, bem como interferem na permeabilidade da membrana mitocondrial, realizou-se a determinação dos níveis de cálcio intracelular (Figura 17) para investigar o possível desequilíbrio do mesmo no processo de morte envolvido na ação das TDs. Após 4 horas de tratamento com os compostos foi possível observar um aumento nos níveis de cálcio intracelular em relação ao grupo controle (sem tratamento).

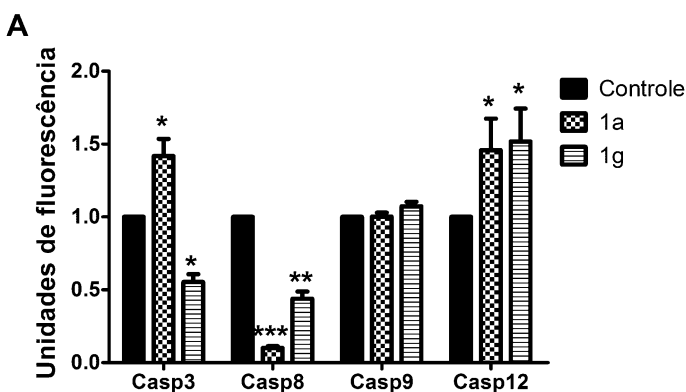
Mobilizações nos depósitos de cálcio intracelular, como a depleção e alteração no sistema de transporte dessas moléculas pode

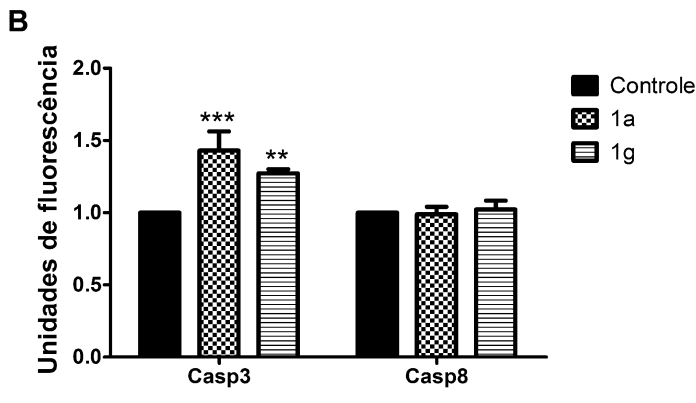
ativar o estresse de RE levando à liberação da procaspase-12, que se encontra conjugada à membrana do retículo endoplasmático. Uma vez ativada, a caspase-12 causa ativação de caspases efetoras e eventualmente culminando em apoptose (ORRENIUS; ZHIVOTOYSKY; NICOTERA, 2003).

5.3.6 Ativação de caspases

Sabendo-se que as caspases atuam na cascata de sinalização da via da apoptose, a ativação das caspases -12, -9, -8 e -3 foram avaliadas nas células de leucemia após o tratamento de 4 horas e 12 horas com a CC_{50} dos compostos **1a** e **1g**. Como observado na Figura 18A, ambas as TDs ativaram inicialmente a caspase-12, já em um período de 4 horas de tratamento com os compostos, além de ativação da caspase-3 pelo composto **1a**. Em seguida vemos também a ativação da caspase-3 no tratamento de 12 horas com a TZD **1g** (Figura 18B), nos permitindo concluir que é possível que para esse composto, o tempo para a ativação dessa caspase efetora seja maior que para o composto **1a**, mas que de maneira geral ambos apresentam a mesma rota de morte.

Figura 19 - Quantificação de caspase-3, -8, -9 e -12 em L1210. Células foram tratadas com CC_{50} dos compostos 1a e 1g. A atividade das caspases está apresentada em unidades de fluorescência em comparação com grupo controle (células sem tratamento) após 4 horas (A) e 12 horas (B) de tratamento. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, $n = 3$.

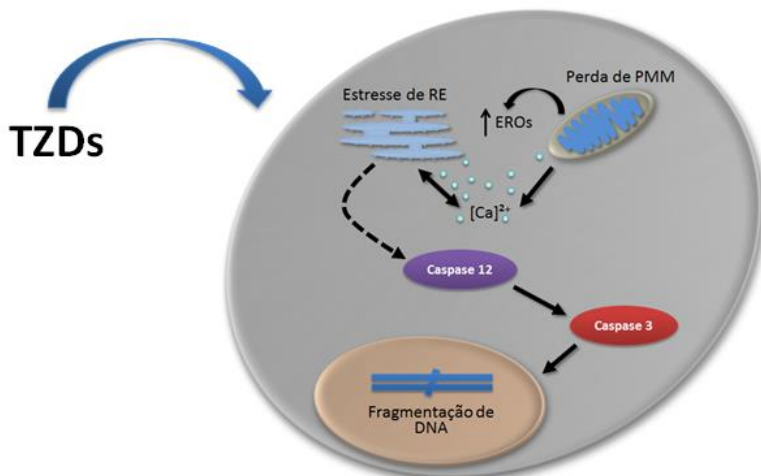




É também possível observar no gráfico o decaimento da caspase-8 no tratamento de 4 horas com os compostos, quando comparado com o grupo controle (Figura 18A), porém esses níveis se normalizam após o período de 12 horas (Figura 18B). Considerando os resultados obtidos em 12 horas, podemos concluir que essa diferença na quantificação da caspase-8 pode ser apenas devido a sensibilidade da metodologia empregada ou que o **1a** tenha atividade pró-caspase mais lentamente. A caspase-9 não se mostrou ativada após tratamento com as tiazinodionas (Fig17A), levando a crer que essa enzima não esteja envolvida na cascata de sinalização de morte induzida por estes compostos.

Sugere-se, a partir destes resultados que a ação das TDs **1a** e **1g** envolve um desequilíbrio metabólico, apresentado pelo aumento da produção de EROs e extravasamento das mesmas para o meio citosólico. Além disso, esse estresse metabólico também resulta no aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial e extravasamento do Ca^{2+} armazenado no interior dessa organela para o meio citosólico. Tanto as EROs quanto a perda da homeostasia do Ca^{2+} podem gerar o estresse de retículo endoplasmático que leva ao desacoplamento da procaspase-12 que ativa a caspase-3 e finalmente essas células entrarão em processo de apoptose. Com base nesses resultados, foi elaborada a figura 19 para ilustrar o mecanismo de morte envolvido na ação das tiazinodionas.

Figura 20 - Esquema proposto para ilustrar as alterações celulares causadas pelas tiazinodionas 1a e 1g em células de leucemia. A CC_{50} dos compostos causa aumento da geração de EROs e perda do potencial de membrana mitocondrial que leva à alterações nos níveis de cálcio intracelular e estresse de retículo endoplasmático.



Fonte: Adaptado de FERREIRA, M. et al.,2013.

Juntamente com a síntese química das tiazinodionas, os resultados obtidos originaram o artigo intitulado “*Synthesis of 1,3-thiazine-2,4-diones with potential anticancer activity*”, publicado no mês de dezembro de 2013 na *European Journal of Medicinal Chemistry* (Apêndice).

6 CONCLUSÕES

Entre os quinze sais de isotiourônio e derivados testados inicialmente (MF01 a MF15), os que apresentaram melhor efeito citotóxico, melhor índice de seletividade e, considerando ainda as semelhanças estruturais e por isso escolhidos para dar continuidade aos experimentos, foram os SIs MF04, MF05, MF06, MF07 e MF08. Da mesma maneira, entre as oito tiazinodionas testadas (**1a** a **1h**), as TDs **1a** e **1g** apresentaram melhor efeito citotóxico, bem como maior seletividade.

Tanto os sais de isotiourônio (MF04 a MF08), quanto as tiazinodionas (**1a** e **1g**) previamente selecionados apresentaram maior citotoxicidade e seletividade para células de leucemia, apresentando semelhante CC₅₀ entre as linhagens leucêmicas estudadas.

Quanto ao perfil do ciclo celular, os SIs MF04, MF06 e MF07 e as TDs **1a** e **1g** induziram à fragmentação celular, enquanto que o MF08 causa um bloqueio na transição da fase G2/M.

Apesar de não observadas alterações significativas no perfil do ciclo celular quando as células foram tratadas com o SI MF05 observou-se uma extensa vacuolização na avaliação microscópica, podendo sugerir uma paraptose ou autofagia como mecanismo de morte. Ainda, a citometria de fluxo indica a externalização da fosfatidilserina, um conhecido marcador de processos apoptótico iniciais. Isso nos faz crer que esse composto possui uma interessante atividade biológica, talvez incluindo mais de um mecanismo de morte.

Como mecanismo de morte, as células leucêmicas tratadas com os sais de isotiourônio apresentaram alterações morfológicas sugestivas de apoptose. Ainda, o composto MF08 apresentou características morfológicas peculiares na microscopia de fluorescência, indicando que seu mecanismo de morte talvez envolva mitose catastrófica. As TDs **1a** e **1g** apresentam como rota de morte a despolarização da membrana mitocondrial e o estresse de retículo endoplasmático, gerando um aumento de espécies reativas de oxigênio e alteração nos níveis de cálcio intracelular que levaram à ativação da cascata de caspases -12 e -3, culminando em apoptose.

Considerando-se os ótimos resultados obtidos quanto à citotoxicidade e seletividade do sal de isotiourônio MF08 foram sintetizados mais oito compostos com modificações na molécula original, porém esses apresentaram resultados inferiores ao composto original. Este composto, portanto, juntamente com os demais sais de

isotiourônio (MF04, MF05, MF06 e MF07) apresentam resultados promissores para a continuidade das investigações e elucidação do mecanismo de morte envolvido por esses compostos. Para isso, outros ensaios bioquímicos como avaliação da possibilidade de atuação das caspases e proteínas pró e antiapoptóticas fazem-se necessários para a correta diferenciação dos mecanismos envolvidos nesta atividade. Ainda, devido a certas semelhanças morfológicas e bioquímicas entre os diferentes mecanismos de morte celular, uma avaliação molecular torna-se importante para a caracterização da via de morte induzida por novos agentes terapêuticos.

7 PERSPECTIVAS

a) Devido a indícios semelhantes à mitose catastrófica encontrados com o uso do composto MF08, faz-se interessante a investigação mais detalhada do mecanismo de ação desse sal de isotiourônio.

b) Para os demais sais de isotiourônio, a investigação da ativação de caspases -3, -8, -9 e -12, bem como o conteúdo de cálcio intracelular deverão ser realizadas

c) O derivado de sal de isotiourônio MF11 também apresentou resultados interessantes na triagem inicial de citotoxicidade dos compostos, destacando o índice de seletividade que é de 7 (Tabela 1), portanto o mesmo será incluído nos testes juntamente com os demais SIs.

d) Avaliar o Índice de seletividade em outras linhagens celulares e posteriormente em células em cultura primária.

e) Além dos ensaios *in vitro*, serão realizados estudos *in vivo* com o intuito de dar início a estudos pré-clínicos com sais de isotiourônio. Além disso, a avaliação da eficácia e segurança dos compostos em modelos animais faz-se importante para que posteriormente, compostos com promissora atividade antitumoral possam ser testados em ensaios clínicos em humanos (KREUTZ, 1992).

REFERENCIAS

ALLRED, C. D.; KILGORE, M. W. Selectiv activation of PPAR γ in breast, colon, and lung cancer cell lines. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 235, Issue 1-2, p. 21-29, 2005.

ALMEIDA, V.L., et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que integram com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

ALTMAN, B. J.; RATHMELL, J. C. Metabolic stress in autophagy and cell death pathways. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v.4, n.9, 2012.

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

AMERES, SL.; MARTINEZ, J. SCHOROEDER, R. Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC. **Cell**, 130, p. 101–112, 2007.

BADAWI, A. M.; AZZAM, E. M. S.; MORSY, S. M. I. Surface and biocidal activity of some synthesized metallo azobenzene isothiuronium salts. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 8661-8665, 2006.

BADIE, C. ET AL. p53-dependent G2 arrest associated with a decrease in cyclins A2 and B1 levels in a human carcinoma cell line. **British Journal of Cancer**, v. 82, n. 3, p. 642–650, 2000.

BAUDINO, T. A. *et al.* c-Myc is essential for vasculogenesis and angiogenesis during development and tumor progression. **Genes & Development**, v. 16, p. 2530-2543, 2002.

BERGSBAKEN, T.; FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Pyroptosis: host cell death and inflammation. **Nature Reviews: Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 99-109, 2009.

BERTRAM, J. S. The molecular biology of cancer. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 21, n. 6, p. 167-223, 2000.

BEVERS, E. M. *et al.* Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, p. 317-330, 1999.

BONINI, A. L.; MOURA, L. A. R.; FRANCO, M. Revisão: Apoptose em glomerulopatias. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 22, n. 2, p. 70-77, 2000.

BRÖKER, L. E.; KRUYT, F. A.; GIACCONE, G. Cell death independent of caspases: a review. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 9, p. 3155-3162, 2005.

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

BURKE, V.P.; STARTZELL, J.M. The Leukemias. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, v. 20, p. 597-608, 2008.

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

CHAUDHRY, J. *et al.* Antihyperglycemic effect of a new thiazolidinedione analogue and its role in ameliorating oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. **Life Sciences**, v. 80, n. 12, p. 1135-1142, 2007.

CLARKE, P. R.; ALLAN, L. A. Cell-cycle control in the face of damage – a matter of life or death. **Trends in Cell Biology**. v.19, n.3, p.89-98, 2009.

CLARKSON, B. et al. Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer and possible curative Strategies. **Leukemia**. v. 17, p1211-1262, 2003.

COLLINS, K.; JACKS, T.; PAVLETICH, N. P. **The cell cycle and cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.94, p.2776–2778, 1997.

CORNACCHIONI, A. L. B., et al. Recidivas extramedulares em leucemia linfocítica aguda: impacto da quimioterapia e definição de um grupo particularmente favorável. **Pediatria**, v. 26, n. 2, p. 27-33, 2004.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Robbins: Patologia Estrutural e Funcional**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

CROCE, C. M. Oncogenes and cancer. **New England Journal of Medicine**, v.358, p.502-511, 2008.

DALBY, K. N. et al. Targeting the prodeath and prosurvival functions of autophagy as novel therapeutic strategies in cancer. **Autophagy**, v.6, n.3, p.322-329, 2010.

DENTON, D.; NICOLSON, S.; KUMAR, S. Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. **Cell Death Differentiation**, v.19, n.1, p.87-95, 2012.

DIGHIERO, G.; HAMBLIN, T. J. Chronic lymphocytic leukaemia. **Lancet**, v.371, p.1017–1029, 2008.

DOBKIN, A. B.; WYANT, G. M. The physiological effects of intravenous anaesthesia on man. **Canadian Anaesthists Society Journal**, v. 4, n. 3, p. 295-337, 1957.

ELLEIDGE, S. J. Cell Cycle Checkpoints: Preventing an Identity Crisis. **Science**, v.274, 1996.

ENOMOTO, M. *et al.* Mechanisms of signal Transduction: Novel Positive Feedback Loop Between Cdk1 and Chk1 in the Nucleus during G2/M Transition. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 34223-34230, 2009.

EVAN, G.I.; VOUSDEN, K.H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. **Nature**, v.411, n.6835, p.342-348, 2001.

FACCHINI, L. M.; PENN, L. Z. The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. **The FASEB Journal**, v. 12, p. 633-651, 1998.

FADERL, S. *et al.* The biology of chronic mieloyd leukemia. **The New England Journal of Medicine**. v.341. n.3, p.164-172, 1999.

FAN, T. J.; HAN, L. H.; CONG, R. S.; LIANG J. Caspase family proteases and apoptosis. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, v.37, n.11, p.719-727, 2005.

FARIAS, M.G; CASTRO, S. M. Diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 2, p.91-98, 2004.

FAZI, B. *et al.* Fenretinide induces autophagic cell death in caspase-defective breast cancer cells. **Autophagy**, v.4, n.4, p.435-441, 2008.

FERNALD, K.; KUROKAWA, M. Evading apoptosis in cancer. *Trends in Cell Biology*, v.23, n.12, p.620-633, 2013.

FERREIRA, M. et al. Synthesis of 1,3-thiazine-2,4-diones with potential anticancer activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.70, p.411-418, 2013.

FERREIRA, M. **Síntese de sais de isotiourônio e sua versatilidade em reações de acetilação e na preparação de heterociclos multifuncionalizados**. 2011. 220f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

FLEURY, C.; MIGNOTTE, B.; VAYSSIÈRE, J.-L. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling, **Biochimie**, v.84, p.131-141, 2002.

FOO, N.C. *et al.* Cellular Vacuolization and Apoptosis Induced by Hepatitis B Virus Large Surface Protein. **Hepatology**, v. 36, n.6, 2002.

FRESHNEY, R. **Culture of animals cells: A manual of basic technique**. New York, Alan R. Liss. Inc., p.117, 1987.

GALLI, A. *et al.* Antidiabetic thiazolidinediones inhibit invasiveness of pancreatic cancer cells via PPAR γ independent mechanisms. **Gut**, v. 53, p. 1688-1697, 2004.

GALLUZI, L., et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death and Differentiation**, v.19, p.107–120, 2012.

GALLUZZI L, *et al.* Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death Differtiation**, v.19, p.107-120, 2012.

GHIA, P.; FERRERI, A. J. M.; CALIGARIS-CAPPIO, F. Chronic lymphocytic leukemia.. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v.64, p. 234–246, 2007.

GOZUACIK, D.; KIMCHI, A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. **Oncogene**, v.23, n.16, p.2891-2906, 2004.

GREAVES, M. F. Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukaemia. **European Journal of Cancer**, v. 35, n. 2, p. 173-85, 1999.

GREAVES, M. F. Stem cell origins of leukaemia and curability. **British Journal of Cancer**, v. 67, n. 3, p. 413-23, 1993.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Resistência do corpo à infecções: I. Leucócitos, granulócitos, sistema monocítico-macrofágico e inflamação. In: GUYTON, A. C.; HALL, J. E. (Eds). **Tratado de Fisiologia Médica**, ed. 12. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011, p. 437.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v.144, n.5, p.646-674, 2011.

HARTWELL, L. H.; KASTAN, M. B. Cell Cycle Control and Cancer. **Science**. v.266, 1994.

HOTCHKISS, R. S., et al. Cell Death. **New England Journal of Medicine**, v.361, p.1570-1583, 2009.

INCA - **Instituto Nacional de Cancer**. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>>. Acesso em: 22 de outubro de 2013.

IWAI, N. et al. Structure-activity relationship study of the bacterial actin-like protein mreB inhibitors: Effects' of substitution of

benzyl group in S-benzylthiourea. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.71, p.246-248, 2007.

JEONG, S.Y; SEOL, D.W. The role of mitochondria in apoptosis. **BMB Reports**, v. 41, n. 1, p.11-22, 2008.

KAKIZAWA, Y. *et al.* Organic–inorganic hybrid-nanocarrier of siRNA constructing through the self-assembly of calcium phosphate and PEG-based block anioner. **Journal of Controlled Release**, v. 111, p. 368-370, 2006.

KANG, J.; PERVAIZ, S. Mitochondria: RedoxMetabolism and Dysfunction. **Biochemistry Research International**, v.3, 2012.

KANNO, S-I. *et al.* Diethyldithiocarbamate-Induced Cytotoxicity and Apoptosis in Leukemia Cell. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.26, n.7, p.964-968, 2003.

KASIBHATLA, S.; TSENG, B. Why target apoptosis in cancer treatment? **Molecular Cancerer Therapy**, v.2, n.6, p.573-80, 2003.

KEPP, O.; GALLUZZI, L.; LIPINSKI, M.; YUAN, J.; KROEMER, G. Cell death assays for drug discovery. **Nature Reviews: Drug Discovery**, v.10, n.3, p.221-37, 2011.

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

KIMURA, M. *et al.* Mitotic catastrophe and cell death induced by depletion of centrosomal proteins. **Cell Death and Disease**, v. 4, 2013.

KORONKIEWICZ, M.; CHILMONCZYK, Z.; KAZIMIERCZUK, Z. Proapoptotic effects of novel pentabromobenzylisothiureas in human leukemia cell lines. **Medicinal Chemistry Research**, v.21, n.10, p. 3111-3118, 2012.

KRENTZ, A. J.; FRIEDMANN, P.S. Type 2 diabetes, psoriasis and thiazolidinediones. **International Journal of Clinical Practice**, v.60, p. 362-363, 2006.

KREUTZ, F.T. O laboratório de biologia tumoral – a cultura de células e xenotransplantes. In: FLECK, J. **Câncer integração clínico biológica**. Rio de Janeiro Medsi, p. 337-352, 1992.

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

KROEMER, G.; LEVINE, B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, v.9, n.12, p.1004-10, 2008.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. **Physiological Reviews**, v.87, p.99-163, 2007.

KUO, J.-H. S. et al. Flow Cytometric Characterization of Interactions between U-937 Human Macrophages and Positively Charged Catanionic Vesicles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.64, n.2, p.307-313, 2008.

LANZ, H. L. et al. Mitotic catastrophe triggered in human cancer cells by the viral protein apoptin. **Cell Death and Disease**, v.4, 2013.

LASH, L.H. Mitochondrial glutathione transport: Physiological, pathological and toxicological implications, **Chemico Biological Interactions**, v. 163, p. 54-67, 2006.

LEE, B. Y. et al. Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. **Aging Cell** v.5, n.2, p.187-195, 2006.

LEITE, M. et al. Critical evaluation of techniques to detect and measure cell death--study in a model of UV radiation of the leukaemic cell line HL60. **Analytical Cell Pathology**. v19, p.139-151, 1999.

LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA: CONDUTAS DO INCA, **Revista Brasileira de Cancerologia**. v.49, n. 1, p.5-8, 2003.

LIAO, T. T. et al. .Sensitivity of morphological change of Vero cells exposed to lipophilic compounds and its mechanism. **Journal of Hazardous Materials**. v.179 , p.1055-1064, 2010.

LINDQVIST A., et al. Cyclin B1–Cdk1 activation continues after centrosome separation to control mitotic progression. **PLoS Biology**, v.5, n.5, e123, 2007.

LODISH, H., et al. Proto-Oncogenes and Tumor-Suppressor Genes. In: LODISH, H., et al., (Orgs). **Molecular Cell Biology**. New York: W. H. Freeman, 2000.

LONGO, D. L. Principles of cancer treatment. In: LONGO, D. L. et al. (Eds.) **Harrison's Hematology and Oncology**. New York: McGraw-Hill Companies, Inc., 2010, p.-344-373.

LOWE, S. W.; LIN, A. W. Apoptosis in cancer. **Carcinogenesis**, v.21, n.3, p.485-495, 2000.

LY, J. D.; GRUBB, D. R.; LAWEN, A. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) in apoptosis; an update. **Apoptosis**, v. 8, ed. 2, p. 115-128. 2003.

MALARKEY, D. E.; MARONPOT, R. R. Carcinogenesis, In: Philip Wexler (ed.). **Encyclopedia of Toxicology**, New York: Elsevier, 2005, p.445-466.

MALHOTRA, J. D.; KAUFMAN, R. J. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? **Antioxidant and Redox Signaling**, v.9, n.12, p.2277-2293, 2007.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature Reviews: Cancer**, v.9, n.3, p.153-66, 2009.

MANSILLA, S.; PRIEBE, W.; PORTUGAL, J. Mitotic Catastrophe Results in Cell Death by Caspase-Dependent and Caspase-Independent Mechanisms. **Cell Cycle**, v.5(1), p. 53-60. 2006.

MASSAGUÉ, J. G1 cell-cycle control and cancer. **Nature**, v.432, p.298-306, 2004.

MATTSON, M. P.; CHAN, S. L. Calcium orchestrates apoptosis. **Nature Cell Biology**, v.5, n.12, p.1041-3, 2003.

McBRIDE, H.M.; NEUSPIEL, M.; WASIAK, S. Mitochondria: more than just a powerhouse. **Current Biology**, v. 16, p. 551-560, 2006.

Minamino, T.; Komuro, I.; Kitakaze, M. Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease. **Circulation Research**, v.107, n.9, p.1071-1082, 2010.

MITCHELL, R. N. et al. Fundamentos de Robbins e Cotran, **Patologia: bases patológicas das doenças**. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.153-185 / 575-582, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v.65, p.55-63, 1983.

MURATI, A. et al. Myeloid malignancies: mutations, models and management. **BMC Cancer**, v.12, n.304, 2012.

NAGATA, D. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor- γ and growth inhibition by its ligands in prostate cancer. **Cancer Detection and Prevention**, 32, p. 259–266. 2008.

NCI – **National Cancer Institute** - EUA. Disponível em: <<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/leuks.html>>, Acesso em: 28 de novembro de 2013.

NIGG, E. A. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, v.2, p.21-32, 2001.

NITTA, M. *et al.* Spindle checkpoint function is required for mitotic catastrophe induced by DNA-damaging agents. **Oncogene**, v. 23, p. 6548-6558. 2004.

NITTA, M. Spindle checkpoint function is required for mitotic catastrophe induced by DNA-damaging agents. **Oncogene**, v.23, p.6548–6558, 2004.

NÚÑEZ, N. P.; LIU, H.; MEADOWS, G. G. PPAR- γ ligands and amino acid deprivation promote apoptosis of melanoma, prostate, and breast cancer cells. **Cancer Letters**, v. 236, Issue 1, p. 133-141. 2006.

ONCIU, M. Acute Lymphoblastic Leukemia. Hematology/Oncology **Clinics of North America**, v. 23, p. 655–674, 2009.

ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B.; NICOTERA, P. Regulation of cell death: the calcium apoptosis link. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, v.7, p.552-565, 2003.

PAWLIK, A. *et al.* Phenethyl isothiocyanate-induced cytoskeletal changes and cell death in lung cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, p.3577-3594, 2012.

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

PINTON, P. *et al.* Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca^{2+} transfer in the control of apoptosis. **Oncogene**, v.27, n.50, p.6407-6418, 2008.

PITOT, H. C. The molecular biology of carcinogenesis. **Cancer**, v.72, n.3, p.962-70, 1993

PLASSCHAERT, S. L. ; KAMPS, W. A. *et al.* Prognosis in childhood and adult acute lymphoblastic leukaemia: a question of maturation? **Cancer Treatment Reviews**, v. 30, n. 1, p. 37-51, 2004.

POON, RANDY Y. C.; CHOW, JEREMY P.H. Mitotic Catastrophe. In: Enders, Greg H. (Ed.). **Cell cycle deregulation in Cancer**. Philadelphia: Humana Press, 2010. p. 79-96.

PORTUGAL, P.; MANSILLA, S.; BATALLER, M. Mechanisms of drug-induced mitotic catastrophe in cancer cells. **Current Pharmaceutical Design**, v.16, p.69-78, 2010.

PUI, C. H.; ROBISON, L. L.; LOOK, A. T. Acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet**, v.371: p. 1030–1043, 2008.

PUI, C.H.; JEHA, S. New therapeutic strategies for the treatment of acute lymphoblastic leukaemia. **Nature Reviews: Drug Discovery**, v.6, n. 2, p. 149-65, 2007.

QI, M. *et al.* Pseudolaric acid B induces mitotic catastrophe followed by apoptotic cell death in murine fibrosarcoma L929 cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 683, p. 16-26. 2012.

REGAN, B. M.; GALYSH, F. T.; MORRIS, R. N., 2-thiopseudourea moiety a new local anesthesiophore. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.10, 649-&, 1967.

RELLO-VARONA, S. *et al.* An automated fluorescence videomicroscopy assay for the detection of mitotic catastrophe. **Cell Death and Disease**, v.1, n.2, e.25, 2010.

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

RONINSON, I.B.; BROUDE, E.V.; CHANG, B.D. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. **Drug Resist Updat**, v.4(5), p. 303-313. 2001.

ROSENFELDT, M. T.; RYAN, K. M. The multiple roles of autophagy in cancer. **Carcinogenesis**, v.32, n.7, p.955-63, 2011.

RUBNITZ, J. E.; GIBSON, B.; SMITH, F. O. Acute myeloid leukemia. **Hematology/Oncoly Clinics of North America**, v.24, p.35-63, 2010.

SAHA, V.; LILLEYMAN, J. S., Leukaemia. **Current Paediatrics**, v.8, p.73-77, 1998.

SAIKUMAR, P.; VENKATACHALAM, M. A. Apoptosis and cell death. In: CAGLE, P.T.; ALLEN, T.C. (Eds.). **Basic Concepts of Molecular Pathology**. New York: Springer, 2009, p.29-40.

SAWYERS, Charles L. Chronic myeloid leukemia. **The New England Journal of Medicine**. v.340, n17, p1330-1339, apr.1999.

SCHÖNTHAL, A. H. Endoplasmic Reticulum Stress: Its Role in Disease and Novel Prospects for Therapy. **Scientifica (Cairo)**, 2012.

SPERANDIO, S.; DE BELLE, I.; BREDESEN, D. E. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.97, n.26, p.14376-14381, 2000.

SPERANDIO, S.; et al. Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix. **Cell Death Differentiation**. v.11, n.10, p.1066-1075, 2004.

SRIHARI, P.; et al. Solvent free synthesis of 1,5-disubstituted tetrazoles derived from Baylis Hillman acetates as potential TNF-alpha inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.19, p.5569-5572, 2009.

STEVENS, A.; LOWE, J. **Patologia**. 2.ed. São Paulo: Manole, 2002. p. 425-431.

SUGIMOTO, K.*et al.* Frequent Mutations in the p53 gene in human myeloid leukemia cell lines. **Blood**, 1:79(9), p. 2378-2383. 1992.

SZCZEPAŃSKI; T.; VAN DER VELDEN, V. H.; VAN DONGEN, J. J. Classification systems for acute and chronic leukaemias. **Best Practice Research & Clinical Haematology**, v. 16, n. 4, p. 561-582, 2003.

TAKAHASHI, N. *et al.* Activation of PPAR α inhibits cell growth and induces apoptosis in human gastric cancer cells. **FEBS Letters**, num. 455, p. 135-139. 1999.

TAVARES, A. A. D. S.; TAVARES, J. M. R. S. **Princípios Gerais de Culturas de Células e Citometria de Fluxo para Avaliação**

dos Efeitos da Radiação Ionizante. Porto/Portugal, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.(2009): 33.

THANNICKAL, V. J.; FANBURG, B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol Physiol**, v. 279, p. 1005-1028, 2000.

TRANI, A. et al. R. Thioureas and isothiuronium salts of the aglycone of teicoplanin .1. synthesis and biological-activity. **Journal of Antibiotics**, v.42, p.1268-1275, 1989.

VERMES, I; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. **Journal of Immunological Methods**, v.243, p167–190, 2000.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE; D. R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, v. 36, p.131–149, 2003.

UEDA, J. Y et al. (+)-Grandifloracin, an antiausterity agent, induces autophagic PANC-1 pancreatic cancer cell death. **Drug, Design, Development and Therapy**, v. 18, n. 8, p. 39-47, 2013.

VITALE, I.; GALLUZZI, L.; CASTEDO, M.; KROEMER, G. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, v. 12, p.385-392, 2011.

WANG, F. *et al.* Oxidative stress contributes to silica nanoparticle-induced cytotoxicity in human embryonic kidney cells. **Toxicology In Vitro**, v.23, n.5, p.808-815, 2009.

WANG, X. W., et al. GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, V. 96, p. 3706–3711, 1999.

WANG, X.P. *et al.* Live morphological analysis of taxol-induced cytoplasmic vacuolization in human lung adenocarcinoma cells. **Micron**, v. 39, p. 1216-1221. 2008.

WHO - **World Health Organization**. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>>, Acesso em: 03 de novembro de 2013.

WONSEY, D. R.; FOLLETTIE, M. T. Loss of the Forkhead Transcription Factor FoxM1 Causes Centrosome Amplification and Mitotic Catastrophe. **Cancer Res**, v.65, p. 5181-5189, 2005.

WU, J.; SUN, J.; XUE, Y. Involvement of JNK and P53 activation in G2/M cell cycle arrest and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in neuron cells. **Toxicology Letters**, v.199, n.3, p.269-276, 2010.

WU, P. C. *et al.* Accelerated Cellular Senescence in Solid Tumor Therapy. **Experimental Oncology**, v. 34, ed. 3, p. 298-305, 2012.

YANG, L.; WU, S.;ZHANG, Q.; LIU, F.; WU, P. 23,24-Dihydrocurbitacin B induces G2/M cell-cycle arrest and mitochondria-dependent apoptosis in human breast cancer cells (Bcap37). **Cancer Letters**, v. 256, n.2, p.267-278, 2007.

ZASK, A. *et al.* Synthesis and antihyperglycemic activity of a novel 5-(naphthalenylsulfonyl)-2,4-thiazolidinediones. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.33, n.5, p.1418-1423, 1990.

ZENS, T. *et al.* TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, n. 29, v. 28, 2010.

ZHANG, Y. *et al.* Nano rare-earth oxides induced size-dependent vacuolization: an independent pathway from autophagy. **International Journal of Nanomedicine**, v. 5, p. 601-609, 2010.

ZHAO, Z. et al. p53 loss promotes acute myeloid leukemia by enabling aberrant self-renewal. **Genes & Development**. v.24, p.1389-1402, 2010.



Original article

Synthesis of 1,3-thiazine-2,4-diones with potential anticancer activity



Misael Ferreira^{a,1}, Laura Sartori Assunção^{b,1}, Fabíola Branco Filippin-Monteiro^b,
Tânia Beatriz Creczynski-Pasa^{b,1}, Marcus Mandolesi Sá^{a,*,1}

^aDepartamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

^bDepartamento de Clínica Farmacológica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 September 2013

Received in revised form

3 October 2013

Accepted 7 October 2013

Available online 14 October 2013

Keywords:

1,3-Thiazine-2,4-dione

Anticancer activity

Leukemia

Apoptosis

ABSTRACT

2-Amino-1,3-thiazine-4-ones were subjected to acetylation followed by mild acid hydrolysis to give compounds containing the 1,3-thiazine-2,4-dione core. The potential of these 5*N*-containing heterocycles as antitumor agents against human cancer cell lines, among other types, was evaluated. The results show that phenyl- and naphthyl-substituted thiazinediones presented selective antitumoral activity against leukemia cells. These compounds caused cell death by DNA fragmentation and the mechanism of action seems to involve caspase cascade activation, imbalance in intracellular Ca²⁺ and mitochondrial metabolism, and/or endoplasmic reticulum stress.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Cancer is one of the most prevalent causes of death in several countries [1]. Despite the huge efforts to implement novel chemotherapeutic strategies for the treatment of different types of cancer, these diseases remain one of the major concerns worldwide. Consequently, there is an urgent need to find unexplored classes of substances with selective action against cancer cells. The regulation of the apoptotic pathways associated with cell death is known as an important approach to understand a great variety of medical illnesses, including cancer [2,3]. Therefore, the identification of apoptosis inducers to combat cancer cells represents an attractive strategy to the discovery and development of potential antitumor agents [4,5].

Many heterocyclic compounds containing the S–C–N framework are related to an extensive spectrum of biological activities [6–8]. In particular, thiazolidine-2,4-diones (TZDs, Fig. 1) are an important group of 5*N*-containing heterocycles, which are high-affinity ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-γ) [9,10], a family of nuclear receptors that play a

pivotal role in regulating gene expression. TZDs, such as the glitazones, are recognized for their ability to display antihyperglycemic activity and have been widely employed for the treatment of diabetes [11–13]. Conversely, recent studies have shown that TZDs also reduce multiple types of cancer, including breast, colon, lung, prostate, and stomach [14–18]. However, biological activity related to 1,3-thiazine-2,4-diones (Fig. 1), the 6-membered heterocycles homologous to TZD, is less frequently reported [19,20], the only exception being 5-ethyl-6-phenyl-1,3-thiazine-2,4-dione (Dolitrene [21]), an anesthetic employed as a pain-killer.

In previous research, we explored cell death pathways, mainly via apoptosis [22–24], including studies involving the development of mild and efficient methodologies to construct the 1,3-thiazine core [25,26] from allylic bromides derived from the Morita–Baylis–Hillman (MBH) reaction [27]. Consequently, we focused on the development of a facile strategy for the synthesis of 1,3-thiazine-2,4-diones and carried out a broad study on their involvement in apoptotic processes related to antitumor activity.

2. Results and discussion

2.1. Chemistry

The synthetic plan employed to prepare the target 1,3-thiazine-2,4-diones **1** is presented in Scheme 1 and begins with the allylic bromide **2**, a readily available precursor obtained through the

* Corresponding author. Tel.: +55 48 37263946; fax: +55 48 37216890.

E-mail address: marcus.mandolesi@ufsc.br (M.M.S.).

¹ As first authors, M.E. and L.S.A. participated considerably in the parts of the study related to chemistry and biology, respectively, along with the senior researchers M.M.S. and T.B.C.P.