

Laura Sartori Assunção

**ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DO
SAL DE ISOTIOURÔNIO MF08 EM MODELO DE MELANOMA
MURINO**

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Farmácia. da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Doutor em Farmácia
Orientador: Prof. Dr. Tânia Beatriz
Creczynski-Pasa

Florianópolis
2017

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

Sartori Assunção, Laura

Estudo pré-clínico da atividade antitumoral do Sal de Isotiorônio MF08 em modelo de melanoma murino / Laura Sartori Assunção ; orientador, Tânia B. Creczynski-Pasa - Florianópolis, SC, 2017.

157 p.

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

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Atividade antitumoral. 3. Sal de Isotiorônio MF08. I. Creczynski-Pasa, Tânia B.. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Farmácia. III. Título.

Laura Sartori Assunção

**ESTUDOS PRÉ-CLÍNICO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DO
SAL DE ISOTIOURÔNIO MF08 EM MODELO DE MELANOMA
MURINO**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor em Farmácia”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Florianópolis, 31 de março de 2017.

Prof.^a Dr.^a Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura
Universidade Estadual de Maringá

Prof.^a Dr.^a Sheila Winnischofer
Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. Louis Prergoud Sando
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Lilian Sibebe de Campos Bernardes
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr.^a Adny Henrique Silva

Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

À minha família, meu porto seguro e meu alicerce. Meus pais Ari e Maria Salette, os grandes incentivadores do caminho que segui. Ao meu irmão Léo e Ana Julia. Obrigada por todo apoio, amor e carinho que recebo, dedico esta tese a vocês;

À Prof.^a Tânia B. Creczynski Pasa, por ser minha orientadora e mentora. Obrigada pelo conhecimento compartilhado, pelo acolhimento e por possibilitar que nesses últimos seis anos eu fizesse parte da grande “família GEIMM”;

À Dra. Iara F. Kretzer, por toda ajuda e conhecimento que foram de suma importância para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pelas incontáveis madrugadas de experimentos, pelas conversas e conselhos e, acima de tudo, pela amizade;

Aos amigos do laboratório (GEIMM), os quais tive o privilégio de conviver diariamente, aos que permanecem e aos que já seguiram seus caminhos, muito obrigada pelo carinho, amizade, incentivo e parceria em todos esses anos;

Às colegas/amigas que participaram no desenvolvimento desse trabalho. Marjorie, Anne e Bianca, agradeço pela ajuda e amizade de vocês;

À Prof.^a Tânia Fröde, agradeço por gentilmente fornecer seu laboratório para que testes *in vivo* fossem realizados;

Aos colegas do LAPI, obrigada por abrirem as portas e me acolherem no seu laboratório;

À Prof.^a Evelise Nazari e Dra. Cláudia Albuquerque do Laboratório de Desenvolvimento Animal da UFSC, agradeço pela colaboração e pelo auxílio nos estudos histológicos;

Ao Prof. Marcus Mandolesi Sá e Dr. Misael Ferreira, obrigada pela colaboração e fornecimento do composto utilizado para o desenvolvimento deste estudo;

Aos professores membros da banca examinadora, pela disponibilidade em avaliar e contribuir com esta tese;

Aos servidores, a Sra. Ivonete Agapito, que cuida da organização diária do laboratório, ao secretário Bruno por toda ajuda prestada nesses anos e à secretária Maira, aos técnicos do LAMEB, Bibiana, Vanessa, Denis e Camile por estarem sempre dispostos a ajudarem em meus questionamentos;

Ao Programa de Pós Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, por ter possibilitado o desenvolvimento e conclusão deste trabalho;

Ao CNPq, CAPES, Ciências sem Fronteiras e FAPESC pelo suporte financeiro;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram com a realização deste trabalho, o meu muito obrigado!

RESUMO

O câncer representa um problema de saúde mundial. Apesar dos constantes esforços e significativos avanços na pesquisa e desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos, a recidiva da doença devido à heterogeneidade do tumor e a resistência aos quimioterápicos permanece sendo um grande desafio na busca pela cura. Nesse contexto, os sais de isotiourônio vêm chamando atenção por diversas atividades biológicas, entre elas promissora atividade antitumoral. Em estudo anterior desenvolvido por nosso grupo de pesquisa foram testadas 28 moléculas com potencial atividade antitumoral, entre as quais se destacou o sal de isotiourônio brometo de (Z)-2-(isotioureidometil)-2-pentenoato de metila (SI-MF08) por apresentar significativa citotoxicidade em linhagem tumoral *in vitro* e um mecanismo de ação de morte celular que parece ativar diferentes sinalizações que levam à morte da célula tumoral. Esta ação multialvos pode vir a ser uma vantagem na busca por um futuro fármaco, possibilitando contornar a resistência ao tratamento desenvolvida por células tumorais. Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a citotoxicidade do SI-MF08 *in vitro* e realizar estudos pré-clínicos para avaliar a potencial atividade antitumoral. O primeiro capítulo deste trabalho mostra os estudos em linhagem celular de leucemia e mecanismo de ação envolvido na citotoxicidade do composto. Foi possível compreender que a molécula atua ativando a via extrínseca da apoptose via receptor de membrana Fas e ativação de caspases -8 e -3, além de causar bloqueio mitótico em fase G2/M do ciclo celular e geração de espécies reativas de oxigênio que leva ao estresse de retículo endoplasmático e perda do potencial de membrana mitocondrial. O estresse oxidativo gerado causa danos irreversíveis nas mitocôndrias levando à ativação de formação de vesículas ácidas para eliminação dessas organelas no intuito de reestabelecer a homeostasia da célula. O segundo capítulo do trabalho teve como objetivo avaliar a atividade citotóxica do composto em linhagem celular de melanoma para posterior aplicação em modelo de melanoma *in vivo*. Observou-se que o SI-MF08 também apresentou citotoxicidade para a linhagem celular de melanoma e o mecanismo de morte envolvido no processo foi semelhante ao encontrado nos resultados do primeiro modelo. O terceiro capítulo do trabalho refere-se aos estudos de citotoxicidade do composto em camundongos na busca pela dose máxima que não apresenta efeitos significativos. Dessa forma, observou-se no estudo de dose única que a dose limite para ser administrada é de 15 mg/kg do composto. Em

seguida, no estudo de doses repetidas de 10 dias observou-se que a dose de 12 mg/kg de SI-MF08 representa a dose máxima de trabalho. O quarto capítulo deste trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antitumoral do SI-MF08 em camundongos portadores de melanoma. Os animais administrados com a dose de 7,5 mg/kg do composto não apresentaram os efeitos deletérios da doença como perda de peso e anemia, contudo a dose não foi capaz de melhorar a sobrevida desses animais ou reduzir significativamente o crescimento tumoral. Entretanto a dose de 12 mg/kg não só inibiu os efeitos deletérios da doença como também aumentou a taxa de sobrevida desses animais e reduziu significativamente o crescimento tumoral, de acordo com padrões de institutos internacionais de pesquisa em câncer.

Palavras-chave: sal de isotiourônio, SI-MF08, atividade antitumoral, leucemia, melanoma, estudo pré-clínico,

ABSTRACT

Cancer is a global health problem. Despite the efforts and significant advances in the research and development for new chemotherapeutic agents, recurrence of the disease due to tumor heterogeneity and chemotherapy resistance remains a major challenge in the search for the cure. In this context, isothiuronium salts have been attracting attention due to its several biological activities, among those is the promisor antitumor activity. In a previous work performed by our research group, 28 molecules with potential antitumor activity were tested. Among those, the isothiuronium salt methyl (Z)-2-(isothioureidomethyl)-2-pentenoate hydrobromide (IS-MF08) displayed significant cytotoxicity in tumoral cell line and a mechanism that seems to triggers different signals that lead to tumoral cell death. This multi-targeting mechanism may be an advantage in the search for a future drug, making possible to circumvent the resistance to treatment developed by tumor cells. Thus, the objective of this work was to characterize the cytotoxicity of IS-MF08 *in vitro* and to perform preclinical studies to evaluate the potential antitumor activity. It made possible to understand that the molecule activates the extrinsic pathway of apoptosis via Fas membrane receptor and further activation of caspases -8 and -3, causing mitotic block in the G2 / M phase of the cell cycle and generation of reactive oxygen species that leads to endoplasmic reticulum stress and loss of mitochondrial membrane potential. The oxidative stress generated causes irreversible damage in the mitochondria, leading to the activation of acid vesicles formation in order to eliminate these organelles and reestablish the homeostasis of the cell. The second chapter of the study aimed to evaluate the cytotoxic activity of the compound in melanoma cell line to later application in *in vivo* melanoma model. IS-MF08 also showed to be cytotoxic to melanoma cell line and the mechanism of death involved in the process was similar to that founded in the results of the first model. The third chapter of the work refers to the cytotoxicity studies of the compound in mice in the search for the maximum dose that has no significant effects. Thus, it has been observed in the single dose study that the dose limit of the compound to be administered is 15 mg/kg. Following, in a 10-day repeated dose study, it was observed that 12 mg/kg of IS-MF08 represents the maximum working dose. The fourth chapter of this work aimed to evaluate the antitumor activity of IS-MF08 in melanoma bearing mice. Animals that were administered with the dose of 7.5 mg/kg of the compound did not exhibit the deleterious effects of the disease as weight loss and anemia, however the dose was

not able to enhance the survival rate of these animals or even reduce tumor growth significantly. However, the dose of 12 mg/kg not only inhibited the deleterious effects of the disease but also increased the survival rate of these animals and significantly reduced tumor growth, according to the standards of international cancer research institutes.

Key words: isothiuronium salt, IS-MF08, antitumor activity, leukemia, melanoma, preclinical study

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diagrama dos eventos envolvidos na promoção e desenvolvimento tumoral.	25
Figura 2 - Diagrama de formação dos elementos figurados do sangue.	28
Figura 3 – Método sistemático ABCDE para avaliação de lesão.....	34
Figura 4 – Estrutura molecular do brometo de (z)-2-(isotioureidometil)-2-pentenoato de metila (SI-MF08).....	43
Figura 5 - Curva dose- resposta da atividade citotóxica do SI-MF08. ...	51
Figura 6 – Mudanças estruturais em células L1210.	53
Figura 7 – Bloqueio mitótico de células L1210 expostas ao SI-MF08 .	54
Figura 8 - Potencial de membrana mitocondrial de células L1210.	55
Figura 9 – Geração de EROs em células de leucemia expostas ao SI-MF08	56
Figura 10 – Formação de vesículas ácidas em células L1210.	58
Figura 11 – Ativação de caspases em células expostas ao SI-MF08.....	62
Figura 12 – Quantificação de receptores Fas em células L1210 expostas ao SI-MF08.	63
Figura 13 – Proteínas relacionadas a apoptose e autofagia envolvidas na morte de células L1210 expostas ao SI-MF08.	65
Figura 14 - Efeito do SI-MF08 em linhagem celular L1210.....	68
Figura 15 - Curva dose- resposta da atividade citotóxica do SI-MF08.	76
Figura 16 – Ciclo celular de células B16F10 expostas ao SI-MF08.	78
Figura 17 – Avaliação da morte de células B16F10 tratadas com SI-MF08.....	80
Figura 18 – Micrografias de células B16F10 expostas ao SI-MF08.	82
Figura 19 - Efeito do SI-MF08 em linhagem celular B16F10	84
Figura 20 – Esquema de administração de doses do estudo de toxicidade e parâmetros avaliados.	91
Figura 21 - Ensaio de hemocompatibilidade do SI-MF08	94
Figura 22- Parâmetros hematológicos de animais tratados com dose única de SI-MF08.....	98
Figura 23 – Celularidade da medula dos animais tratados com dose única SI-MF08.	99
Figura 24 – Parâmetros bioquímicos dos animais tratados com dose única de SI-MF08.....	101
Figura 25 – Peso e variação de peso dos animais tratados com doses repetidas de SI-MF08.	104
Figura 26 – Parâmetros hematológicos dos animais tratados com doses repetidas de SI-MF08.	105

Figura 27 – Celularidade da medula dos animais tratados com doses repetidas de SI-MF08.....	107
Figura 28 – Parâmetros bioquímicos dos animais tratados com doses repetidas de SI-MF08.....	110
Figura 29 – Esquema representativo de inoculação subcutânea de células B16F10 no dorso de camundongos C57BL/6J/Unib.....	118
Figura 30 – Fluxograma representativo do estudo de atividade antitumoral do SI-MF08.....	119
Figura 31 – Linha do tempo do estudo de atividade antitumoral <i>in vivo</i>	122
Figura 32 - Taxa de sobrevivência dos animais portadores de tumor tratados com SI-MF08.....	123
Figura 33 – Volume tumoral dos animais tratados com SI-MF08.	125
Figura 34 – Variação de peso dos animais portadores de tumor tratados com SI-MF08.....	127
Figura 35 – Perfil hematológico dos animais portadores de tumor tratados com SI-MF08.	128
Figura 36 – Fotomicrografias representativas do aspecto histológico dos tumores.....	130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Viabilidade das células B16F10 expostas ao SI-MF08 e marcadas com anexina-V-FITC e iodeto de propídeo.....	80
Tabela 2 - Avaliação da sobrevivência e variação de peso dos animais	96
Tabela 3 – Mortalidade dos camundongos C57BL/6J/Unib com tumor subcutâneo de melanoma B16F10.....	124
Tabela 4 - Atividade antitumoral de SI-MF08 em animais C57BL/6J/Unib com tumor subcutâneo de melanoma B16F10.....	125

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μM	micromolar
ABL	gene “ <i>Abelson Leukemia Virus</i> ”
BCR	gene “ <i>Breakpoint Cluster Region</i> ”
ALT	alanina aminotransferase
AST	aspartato aminotransferase
B16F10	linhagem celular de melanoma murino
BSA	albumina sérica bovina
CO_2	dióxido de carbono
dL	decilitro
DMSO	dimetilsulfóxido
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs	espécies reativas de oxigênio
FAL	fosfatase alcalina
FITC	isotiocianato de fluoresceína
GABA	ácido gama aminobutírico
IC_{50}	concentração que inibe 50% da atividade das desidrogenases celulares
INCA	Instituto Nacional de Câncer José de Alencar
JC-1	5,5',6,6'-tetracloro1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolcarbocianina
kg	quilograma
LDH	Lactato Desidrogenase
LLA	Leucemia Linfocítica Aguda
LLC	Leucemia Linfocítica Crônica
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MF08	Brometo de (Z)-2-(isotioureidometil)-2-pentenoato de metila
mg	Miligrama
MTT	Brometo de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NIH-3T3	Linhagem celular de fibroblasto murino
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
PI	Propidium iodide (iodeto de propídeo)
PMM	Potencial de Membrana Mitocondrial
RE	Retículo Endoplasmático
RNase	Ribonuclease

SI
WHO

Sal de Isotiorônio
“*World Health Organization*”

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	21
1.1 OBJETIVOS	22
1.1.1 Objetivo Geral	22
1.1.2 Objetivos Específicos	22
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 Câncer	23
2.2 Bases dos mecanismos moleculares do câncer	24
2.3 Leucemias	27
2.4 Melanoma	32
2.5 Pesquisa e desenvolvimento de quimioterápicos	36
2.6 Sais de isotiourônio	38
CAPÍTULO 1. MECANISMO DE AÇÃO DO SI-MF08 EM LINHAGEM TUMORAL DE LEUCEMIA	41
1. Introdução	42
2 Materiais e métodos	44
2.2 Reagentes	44
2.3 Cultura celular	44
2.4 Tratamento Celular	44
2.5 Ensaio de Viabilidade Celular – MTT	45
2.6 Cálculo do índice de seletividade	45
2.7 Avaliação ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão (MET)	46
2.8 Investigação da formação de vacúolos ácidos por microscopia confocal	46
2.9 Quantificação da formação de vacúolos ácidos por citometria de fluxo	47
2.10 Investigação do potencial de membrana mitocondrial	47
2.11 Avaliação da atividade da caspases -3, -8, -9 e -12	48
2.12 Quantificação da proteína Fas por citometria de fluxo	48
2.13 Investigação de proteínas envolvidas em processos apoptóticos/autofágicos por Western Blot	49
2.14 Análise estatística	50
3 Resultados e Discussão	50
3.1 Citotoxicidade do SI-MF08 em linhagem não tumoral e índice de seletividade	50
3.2 Alterações morfológicas em células L1210 expostas ao SI-MF08	52

3.3	Potencial de Membrana Mitocondrial	55
3.4	Formação de vacúolos ácidos	57
3.5	Ativação da cascata de caspases	61
3.6	Ativação do receptor de membrana Fas	63
3.7	Quantificação de proteínas efetoras de apoptose Bcl-2 e Bcl- _{xL}	64

4	Conclusão	68
----------	------------------------	-----------

CAPÍTULO 2. ATIVIDADE ANTITUMORAL DO SI-MF08 EM CÉLULAS DE MELANOMA B16F10..... 71

1	Introdução.....	72
----------	------------------------	-----------

2	Materiais e Métodos	73
----------	----------------------------------	-----------

2.1	Reagentes	73
-----	-----------------	----

2.2	Cultura celular.....	73
-----	----------------------	----

2.3	Tratamento Celular	73
-----	--------------------------	----

2.4	Ensaio de Viabilidade Celular – MTT	73
-----	---	----

2.5	Cálculo do índice de seletividade.....	73
-----	--	----

2.6	Avaliação da dispersão das células no ciclo celular por citometria de fluxo.....	73
-----	--	----

2.7	Investigação do tipo de morte celular por citometria de fluxo	74
-----	---	----

2.8	Avaliação morfológica por microscopia eletrônica de transmissão	75
-----	---	----

2.9	Análise estatística.....	75
-----	--------------------------	----

3	Resultados e Discussão	75
----------	-------------------------------------	-----------

3.1	Citotoxicidade e seletividade do SI- MF08 em linhagem celular de fibroblasto e melanoma murino.....	75
-----	---	----

3.2	Perfil de distribuição das células B16F10 no ciclo celular após tratamento com SI-MF08	77
-----	--	----

3.3	Avaliação do perfil de morte celular de células B16F10 expostas ao SI-MF08.....	79
-----	---	----

3.4	Alterações em micro e macroestruturas causadas pelo SI-MF08 em células B16F10	82
-----	---	----

4	Conclusão	84
----------	------------------------	-----------

CAPÍTULO 3. ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DE TOXICIDADE DO SI-MF08 EM MODELO MURINO..... 87

1	Introdução.....	88
----------	------------------------	-----------

2	Materiais e Métodos	89
----------	----------------------------------	-----------

2.1	Reagentes	89
-----	-----------------	----

2.2	Aspectos Éticos	89
-----	-----------------------	----

2.3	Animais	89
-----	---------------	----

2.2	Atividade hemolítica	90
2.4	Preparo das injeções	90
2.5	Avaliação da toxicidade do SI-MF08 <i>in vivo</i>	90
2.6	Parâmetros hematológicos.....	92
2.7	Parâmetros bioquímicos	92
2.8	Celularidade da medula.....	93
2.8	Análise estatística.....	93
3	Resultados e Discussão	93
3.1	Hemocompatibilidade do SI-MF08.....	93
3.2	Toxicidade do SI- MF08 em camundongos C57BL/6J/UNIB - Dose única.....	95
3.2.1	Peso e sobrevida	95
3.2.2	Parâmetros hematológicos	97
3.2.3	Celularidade da medula	98
3.2.4	Parâmetros bioquímicos.....	99
3.3	Toxicidade do SI- MF08 em camundongos C57BL/6J/UNIB - Doses repetidas.....	102
3.3.1	Peso e sobrevida	103
3.3.2	Parâmetros hematológicos	104
3.3.3	Celularidade da medula	106
3.3.4	Parâmetros bioquímicos.....	107
4	Conclusão.....	113

CAPÍTULO 4. ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VIVO* DO SI-MF08 EM MODELO DE MELANOMA

1	Introdução	116
2	Materiais e Métodos.....	117
2.1	Reagentes	117
2.2	Aspectos Éticos	117
2.3	Animais	117
2.4	Cultura de células.....	118
2.5	Implante de células de melanoma murino B16F10 em camundongos C57BL/6J/ Unib.....	118
2.2	Tratamento dos animais portadores de tumor com SI-MF08 118	
2.3	Volume tumoral e peso dos animais.....	119
2.4	Parâmetros hematológicos.....	120
2.5	Celularidade da medula.....	120
2.6	Análise histológica do tumor.....	120
2.7	Análise estatística.....	121
3	Resultados e Discussão	121

3.1	Probabilidade de sobrevida	123
3.2	Crescimento tumoral	124
3.3	Peso dos animais	126
3.4	Parâmetros hematológicos	127
3.5	Análise histológica dos tumores.....	129
4	Conclusão	132
	CONCLUSÕES GERAIS.....	133
	REFERÊNCIAS.....	137
	APÊNDICE A – Artigo publicado na revista European Journal of Medicinal Chemistry	161
	APÊNDICE B – Artigos a serem submetidos	162
	ANEXO A – Parecer do comitê de ética no uso de animais.	163

INTRODUÇÃO

O câncer está entre as principais causas de morte no mundo todo (WHO, 2017).

A maioria dos tratamentos quimioterápicos causam intensa toxicidade aos pacientes, criando a necessidade de redução de dose e tempo de utilização, reduzindo consequentemente a eficácia (FRIBERG et al., 2002; WANG; PROBIN; ZHOU, 2006). Outro problema enfrentado é a heterogeneidade das neoplasias, que fazem com que os tratamentos, via de regra, sejam ineficazes (DEXTER; LEITH, 1986; FIDLER, 1978; ZELLMER et al., 2014)

A heterogeneidade não se restringe apenas às neoplasias entre pacientes, mas também às células do tumor de um mesmo paciente, em relação ao poder de malignidade e angiogênese, sensibilidade ao agente quimioterápico e potencial metastático e de recidiva (LI et al., 2014; MARUSYK; POLYAK, 2010; ZELLMER et al., 2014)

Na maioria dos cânceres, a recidiva é a maior causa de morte e pode estar relacionada às células tumorais residuais após tratamento quimioterápico. Essas células acabam por desenvolver mecanismos para driblar a ação dos quimioterápicos, aumentando o poder de agressividade e invasividade do tumor (HEGDE et al., 2012; KOTTKE et al., 2013; LI et al., 2014; ZELLMER et al., 2014).

Em trabalhos anteriores, nosso grupo estudou uma série de 28 sais de isotiourônio -aril e -alquil substituídos entre os quais o brometo de (Z)-2-(isotioureidometil)-2-pentenoato de metila (SI-MF08) se destacou por apresentar significativa atividade citotóxica ($IC_{50} = 3 \mu M$) e expressiva seletividade ($IS = 24$) para linhagem celular de leucemia. Além disso, o mecanismo de atividade antitumoral do composto parece ir além da ativação da via clássica de morte por apoptose, ativando vias auxiliares de morte celular (FERREIRA et al., 2017).

A pesquisa para desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos envolve a identificação de novos agentes através de estudos *in vitro*, seguido de testes em roedores para avaliar a atividade biológica e estudos toxicológicos para definição de dose segura para posterior estudo em humanos (HOLLINGSHEAD, 2008). Neste sentido, este trabalho visa evidenciar os mecanismos moleculares envolvidos na atividade antitumoral do SI-MF08 *in vitro* e realizar ensaios pré-clínicos de toxicidade e atividade antitumoral em modelo de roedores.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Realizar estudo pré-clínico para avaliar a potencial atividade antitumoral do Sal de Isotiourônio MF08.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Investigar o mecanismo de ação do SI-MF08 na linhagem celular de leucemia L1210.
- Avaliar a citotoxicidade do SI-MF08 na linhagem celular de melanoma B16F10.
- Realizar estudo de toxicidade de dose única e doses repetidas em camundongos C57BL/6J/Unib tratados com SI-MF08.
- Avaliar o efeito antitumoral do SI-MF08 em modelo de melanoma B16F10 em camundongos C57BL/6J/Unib.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer

Atualmente, o câncer é a segunda doença que mais mata no mundo todo, atingindo a marca de 8,8 milhões de mortes em 2015. Entre os homens o câncer mais comum é o de pulmão, seguido pelo câncer de próstata, colorretal, estômago, e fígado. Entre as mulheres, o câncer mais comum é o câncer de mama, seguido de câncer colorretal, pulmão, colo de útero e estômago (WHO, 2017).

Segundo estimativa do Instituto Nacional de Câncer José de Alencar (INCA), haverá 600 mil novos casos de câncer no Brasil para o biênio de 2016-2017. Em nível nacional, os tipos mais frequentes de câncer entre os homens são, em ordem de ocorrência, o câncer de próstata, pulmão, intestino, estômago e cavidade oral. Entre as mulheres, o câncer de mama lidera a lista, seguido do câncer de intestino, colo de útero, pulmão e estômago (INCA, 2015).

O termo câncer abrange um amplo grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento anormal de células com poder de se multiplicar além de seus limites normais, podendo invadir tecidos adjacentes. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), os fatores envolvidos na transformação de uma célula normal em célula tumoral podem ser classificados como: físicos (radiação ultravioleta e radiação ionizante), químicos (aflatoxina, arsênico, componentes do tabaco, etc.) e biológicos (vírus, bactérias e parasitas). Ainda, a idade do paciente é um fator importante a ser considerado no risco de desenvolvimento de certas neoplasias, pela combinação de riscos acumulados com a perda da capacidade de reparo da célula danificada (WHO, 2017).

Hábitos como o tabagismo, o consumo de álcool, má alimentação e sedentarismo são os maiores fatores de risco para desenvolvimento de câncer, entre outras doenças. Entre os fatores biológicos, infecções virais por Papilomavirus Humano (HPV), Hepatite B, Hepatite C, e Epstein-Barr, bem como infecção bacteriana por *Helicobacter pylori*, representaram 15% dos fatores responsáveis por câncer no ano de 2012 (WHO, 2017).

Existem mais de 100 tipos de câncer e a denominação de cada um é dada, via de regra, de acordo com o órgão ou o tipo de célula envolvido na iniciação da doença (WHO, 2013). Entre as centenas de câncer existentes, encontram-se classificadas as leucemias e o melanoma.

2.2 Bases dos mecanismos moleculares do câncer

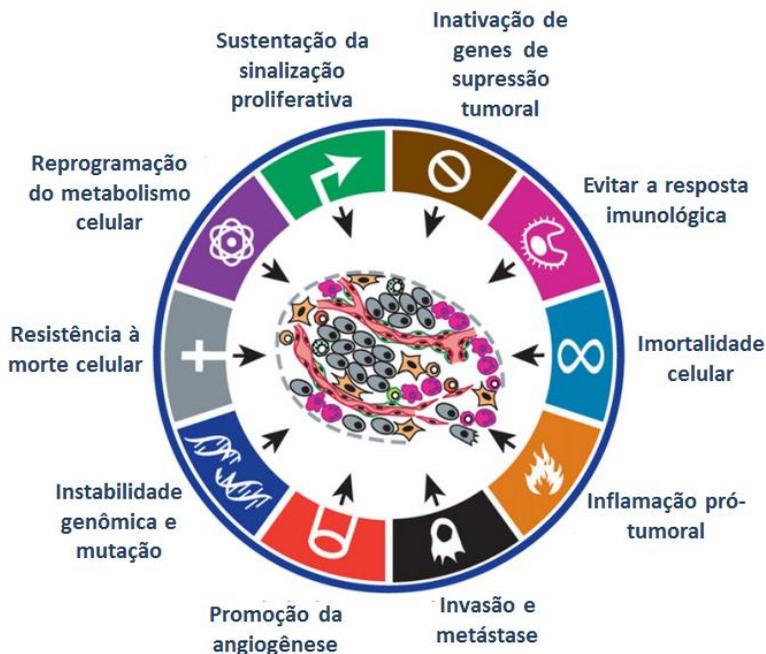
O dano ao DNA é o processo primordial no qual após células normais passarem por uma sequência de mutações durante o processo de replicação acabam por originarem células malignas. Contudo, é importante salientar que devido aos múltiplos pontos de checagem existentes no ciclo de replicação celular, que têm como objetivo evitar a progressão da divisão celular quando uma falha no material genético é detectada, de maneira geral é preciso que haja mais de uma mutação em genes de suma importância para que ocorra a malignidade das células (BERTRAM, 2000; TURKSON, 2017).

Esse evento pode ser resultado de processos endógenos, como erros na replicação do DNA e instabilidade das bases do DNA causado pela geração de radicais livres durante o metabolismo celular. Ainda, processos exógenos previamente citados (radiação UV, substâncias químicas e outros) também podem danificar o material genético e desencadear essas mutações malignas. No caso de infecções virais como por HPV, que pode levar ao câncer de colo de útero, são os genes que codificam o vírus que interagem com o DNA celular e estimulam as mutações malignas (BERTRAM, 2000).

As alterações genéticas envolvidas na mutação celular podem ser divididas em dois grandes grupos: mutações com ganho de função, ou mutações com perda de função. As mutações com ganho de função promovem a sobrevivência da célula tumoral, atuando no ciclo celular, angiogênese, migração, invasão celular e metástase. Já as mutações que exercem perda de função ocorrem em genes nos quais os produtos normalmente atuam restringindo o crescimento e sobrevivência da célula tumoral (TURKSON, 2017).

Em 2000 Hanahan e Weinberg propuseram uma lista de habilidades que as células tumorais apresentam que permitem o estabelecimento e desenvolvimento dos tumores. No ano de 2011, com o avanço no conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na promoção do câncer os autores publicaram novo trabalho incluindo novas habilidades então conhecidas. O diagrama abaixo (Figura 1) apresenta os eventos envolvidos na promoção do desenvolvimento tumoral.

Figura 1 – Diagrama dos eventos envolvidos na promoção e desenvolvimento tumoral.



Adaptado de: Hannahan; Weinberg, 2011.

Durante o processo de mutação das células normais, genes envolvidos na homeostasia da proliferação e morte celular sofrem mutações que resultam na ativação de oncogenes. Os oncogenes são os responsáveis por estimular a proliferação ou proteger contra a ativação da morte celular em células tumorais. Os oncogenes também podem atuar inativando genes que participam do controle da proliferação celular (genes de supressão tumoral) (BERTRAM, 2000).

Assim como em tecidos normais, o tumor necessita do fornecimento de oxigênio e energia suficientes para sua manutenção. Contudo, a rápida e descontrolada proliferação das células neoplásicas faz com que o tecido tumoral necessite de mais suprimentos que o normal. Dessa forma, dois mecanismos são ativados: o primeiro é a reprogramação do metabolismo energético da célula para que a mesma possa produzir mais energia, fornecendo o aporte energético necessário

para o processo de replicação; o segundo mecanismo é a estimulação da neovascularização (angiogênese) através de fatores angiogênicos para permitir a chegada de nutrientes e oxigênio ao ambiente tumoral em quantidades suficientes (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Alguns tumores apresentam grande quantidade de células do sistema imune que geram um processo inflamatório no ambiente tumoral. Esse processo inflamatório contribui para a progressão do tumor através do fornecimento de biomoléculas que mantêm a sinalização de proliferação, fatores angiogênicos, de invasão e de metástase. Ainda, as células envolvidas no processo inflamatório podem liberar espécies reativas de oxigênio que atuam como fator mutagênico em células normais de tecidos vizinhos transformando-as em células neoplásicas (COUSSENS; WERB, 2002; DENARDO; ANDREU; COUSSENS, 2010; GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Outra característica das células tumorais é o poder de invasão e metastização. A metástase é o deslocamento das células tumorais do seu local de origem para um local secundário. Inicialmente, ocorre a invasão tumoral, em que células neoplásicas migram do seu local de origem e adentram tecidos adjacentes, alcançando o lúmen de vasos linfáticos ou corrente sanguínea. Em seguida essas células neoplásicas deslocam-se para longe do seu tumor de origem e um novo tumor desenvolve-se distante do tecido inicial (FRIEDL; ALEXANDER, 2011; KRAKHMAL et al., 2015; MARTIN et al., 2013). O processo metastático pode ser classificado em dois momentos: inicialmente, ocorre a disseminação do câncer do local primário em tecido distantes; em um segundo momento, deve ocorrer a adaptação dessas células em um novo ambiente, longe do microambiente tumoral e todos os seus estímulos de crescimento iniciais. Em outras palavras, refere-se à transformação de micrometástases em tumores macroscópicos (HANAHAN; WEINBERG, 2011). A metástase das células tumorais dificulta o tratamento da doença e apresenta pior prognóstico à cura do paciente.

A latência do câncer é um desafio da clínica na busca pela cura. É o período entre a erradicação do tumor primário e o ressurgimento da doença, local ou sistêmica (metástase) a partir de células residuais do tumor que não foram eliminadas com o tratamento, ameaçando a vida de pacientes anteriormente considerados livres da doença, uma vez que essas células normalmente tornam-se resistentes à terapia convencional (BARTOSH et al., 2016).

A presença de células residuais em estágio de quiescência (estágio anterior ao início da divisão celular, em que as células podem permanecer por longos períodos) representam um desafio no tratamento de tumores sólidos ou doenças hematológicas, uma vez que as terapias convencionais têm como alvo a rápida proliferação das células tumorais (AGUIRRE-GHISO, 2008).

A quiescência das células tumorais pode ocorrer pela interrupção da sinalização de fatores de crescimento tumoral e adesão das células neoplásicas no microambiente tumoral (AGUIRRE-GHISO, 2008).

As células tronco tumorais pertencem a um subgrupo de células quiescentes no tumor que apresentam alta capacidade proliferativa e de auto renovação, diferenciando-se em descendentes heterogêneos que mantém certa similaridade com o tumor inicial (ZHAO, 2016). São células progenitoras tumorais que apresentam características semelhantes às células progenitoras do tecido de origem que podem persistir por longos períodos de latência da doença (anos ou até décadas) após a ressecção cirúrgica do tumor ou tratamento com radio/quimioterapia (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Neste sentido, a presença de células tronco tumorais representa um desafio na terapêutica, uma vez que uma única população geneticamente homogênea de um tumor pode apresentar heterogeneidade no que diz respeito ao seu fenótipo, devido à presença de células em diferentes estágios de diferenciação e que não respondem à terapia da mesma forma que as demais células neoplásicas presentes no tumor (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

2.3 Leucemias

No ano de 2012, as leucemias ocuparam o 11º lugar no ranking dos cânceres mais incidentes (quase 352 mil novos casos) e 10º lugar nas causas de morte (quase 265 mil mortes) entre os diversos tipos de câncer existentes (WHO, 2014).

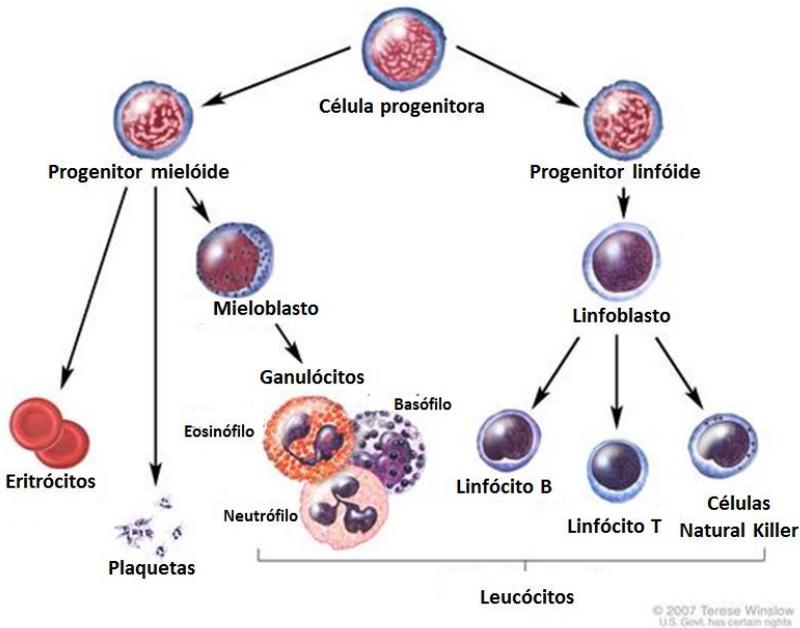
A leucemia caracteriza-se por uma neoplasia originada na medula óssea, podendo ser dividida em grandes grupos quanto ao tempo de desenvolvimento e tipo celular afetado. Com relação ao tempo de desenvolvimento, pode ser classificada como aguda (caracterizada pelo rápido aumento de células imaturas no sangue) e crônica (aumento excessivo de células maduras anormais)(BURKE; STARTZELL, 2008; INCA, 2015).

Com relação ao tipo celular afetado, subdivide-se em linfóide ou mielóide. Todas as células sanguíneas são oriundas de uma mesma

célula pruripotente que se forma na medula óssea, essas células então se diferenciam em mielóide ou linfóide. As células mielóides são diferenciadas na medula óssea, enquanto que as células linfóides são diferenciadas no tecido linfático (BURKE; STARTZELL, 2008).

A Figura 2 a seguir representa os elementos figurados do sangue, ilustrando as duas linhagens mencionadas.

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



Adaptado de: NCI, 2017a

Os avanços na aplicação de métodos genômicos permitiram explorar o conhecimento de mecanismos moleculares de transformação celular e levaram a um melhor conhecimento de novas variantes de doenças previamente conhecidas (WHO, 2014). Com isso, a classificação das neoplasias mielóides e leucemias agudas proposta pela OMS em 2001 e 2008 levam em consideração não apenas características celulares morfológicas, mas também utilizam de informações citoquímicas, imunofenotípicas, genéticas e sinais clínicos. Ainda, com o aumento do número de ferramentas utilizadas para caracterização dessas doenças e o constante avanço no discernimento dos subtipos de

maligñidades existentes, no ano de 2016 a OMS lançou a quarta edição revisada da “Classificação da OMS de tumores de tecidos hematopoiéticos e linfóides” (Tradução livre do inglês “*WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*”) (ARBER et al., 2016; VARDIMAN JW, THIELE J, 2009; WHO, 2014).

A classificação proposta pela OMS atualmente é muito mais extensa e detalhada, em que, por exemplo, as leucemias mielóide agudas encontram-se agora categorizadas como mais de 20 subtipos, fornecendo valiosas informações para melhor compreensão das singularidades de cada doença e proporcionando melhor direcionamento na escolha da terapia (ARBER et al., 2016). Todavia, neste trabalho nos ateremos apenas à classificação mais ampla dessas neoplasias.

As leucemias agudas são caracterizadas pela presença de grande número de blastos (precursores mielóide e linfóides imaturos) na medula óssea. Essas células substituem progressivamente a medula óssea normal, atingindo a corrente sanguínea e substituindo as células sanguíneas maduras.

A **leucemia linfocítica aguda (LLA)** é mais comum em crianças, sendo também o câncer mais comum dessa faixa etária. Por outro lado, a leucemia linfocítica crônica (LLC) é mais comum em adultos, ocorre majoritariamente em países desenvolvidos e está associada à exposição de substâncias tóxicas. Foram estimados mundialmente 352 mil novos casos de leucemia (2,5% do total de novos casos de câncer) e 265 mil casos de óbitos para o ano de 2012 (INCA, 2015).

A LLA apresenta picos de incidência de 2 a 5 anos de idade, com um índice de sobrevivência de 85 - 90% nessa faixa etária. Contudo, o prognóstico não é tão promissor quando acomete bebês e adultos (INABA; GREAVES; MULLIGHAN, 2013; ONCIU, 2009).

A causa da doença é multifatorial, envolvendo estímulos exógenos, endógenos e genéticos como a exposição intrauterina à radiação ionizante, pesticidas e solventes, uso de álcool e tabaco durante a gestação, além de doenças como a Síndrome de Down e Síndrome de Bloom (ONCIU, 2009; PUI; ROBISON; LOOK, 2008).

As manifestações clínicas da LLA estão relacionadas à carga celular e grau de substituição na medula óssea, levando à citopenia. Os sintomas mais comuns incluem febre, causada tanto pela leucemia quanto por uma infecção secundária à neutropenia (contagem baixa de neutrófilos); fadiga e letargia, como manifestação da anemia; dores nas articulações; sangramentos, relacionados à trombocitopenia (redução do

número de plaquetas no sangue) (BURKE; STARTZELL, 2008; ONCIU, 2009).

O tratamento da LLA consiste em terapia intensiva de curto prazo. O tratamento da doença pode ser dividido em 3 etapas: na etapa de remissão o objetivo é erradicar 99% da carga leucêmica e restaurar a hemopoiese. Para isso, uma combinação de glicocorticoides, quimioterápico e um terceiro fármaco é utilizada. Na fase de consolidação, é feita a intensificação do tratamento para erradicar as células leucêmicas residuais que apresentam resistência e assim, reduzir a incidência de recidiva (retorno da doença). A terceira e última fase é a de continuação de tratamento. Apesar de dois terços dos pacientes serem tratados com sucesso no período de 12 meses, a manutenção do tratamento quimioterápico é feito por cerca de 2 anos, para garantia de que não ocorrerá recidiva da doença (PUI; ROBISON; LOOK, 2008).

A recidiva da doença ocorre pela presença de células residuais que encontram-se em período de latência, em que células residuais do câncer encontram-se em estágio de quiescência (estágio anterior ao início da divisão celular), representando uma doença assintomática que pode durar por longos períodos (AGUIRRE-GHISO, 2008; BARTOSH et al., 2016). Parte dessas células quiescentes são células tronco tumorais, que possuem características diferentes das células primárias do tumor e dessa forma apresentam resistência à terapia (ZHAO, 2016).

A **leucemia mielóide aguda** (LMA) por outro lado, é mais comum em adultos, com crescente aumento da incidência a partir dos 50 anos de idade, sendo mais comum em adultos com idade média de 70 anos.

A exposição à radiação ionizante, benzeno e o uso de medicações que causam dano ao DNA interferem na diferenciação de células progenitoras multipotentes, interferindo na maturação das células e causando um acúmulo de blastos (mais de 20% do total de células nucleadas na medula óssea ou sangue), refletindo na diminuição de granulócitos, monócitos, plaquetas e eritrócitos no sangue (ESTEY; DÖHNER, 2006; HEEREMA-MCKENNEY; ARBER, 2009; JOHANSSON; HARRISON, 2015; O'DONNELL et al., 2012).

As manifestações clínicas da LMA assemelham-se às previamente mencionadas em pacientes com LLA: fadiga, infecções e hemorragias decorrentes da citopenia causada pela doença (FERRARA; SCHIFFER, 2013).

O esquema de tratamento convencional da LMA é similar ao da LLA, com uma fase de indução, que busca a remissão completa da doença, seguido da fase de consolidação. A fase de indução é

constituída normalmente de 3 dias de tratamento com antraciclina, seguida de 7 dias de citarabina. Considera-se remissão completa a presença de menos de 5% de blastos em uma medula óssea normocelular, além da ausência de leucemia extramedular e recuperação dos parâmetros hematológicos normais. Em seguida, a fase de consolidação visa eliminar a leucemia residual que persiste após a fase de indução. Ainda, associado ao tratamento quimioterápico pode ser feito a transfusão de células progenitoras (ESTEY; DÖHNER, 2006; FERRARA; SCHIFFER, 2013; O'DONNELL et al., 2012).

Apesar da redução nas mortes precoces decorrentes da doença pelo avanço nas medicações usadas no tratamento de LMA, mais da metade dos adultos e cerca de 90% dos idosos acabam por morrer da doença. As causas disso incluem refratariedade ao tratamento inicial e recidiva da doença após remissão completa, além de comorbidades associadas ao fator da idade do paciente (ESTEY; DÖHNER, 2006; FERRARA; SCHIFFER, 2013).

A leucemia mielóide crônica (LMC) caracteriza-se pela presença do cromossomo Philadelphia, oriundo da translocação do gene BCR (*Breakpoint Region Cluster*) do cromossomo 22 com o gene ABL1 (*Ableson Leukemia Virus*) do cromossomo 9, dando origem ao gene de fusão BCR-ABL1 que é traduzido na proteína Bcr-Abl1. Essa proteína atua no aumento de proliferação celular e resistência à apoptose. (APPERLEY, 2015; HEHLMANN; HOCHHAUS; BACCARANI, 2007; SAWYERS, 1999).

Contudo, a presença do gene também permitiu o desenvolvimento de marcadores específicos para diagnóstico e monitoramento da doença, além do desenvolvimento de terapia-alvo para tratamento com o uso de inibidores da tirosinoquinase, um quimioterápico que liga-se ao receptor na proteína, inibindo o estímulo de proliferação das células neoplásicas (APPERLEY, 2015; HEHLMANN; HOCHHAUS; BACCARANI, 2007; MELO; HUGHES; APPERLEY, 2003).

A LMC é prevalente em homens acima de 50 anos. O diagnóstico é feito por exame de sangue, marcado pelo aumento de leucócitos, e investigação da presença do cromossomo Philadelphia. A maioria dos pacientes é diagnosticada na fase crônica, fase em que a doença pode ser facilmente controlada, porém sem o tratamento adequado pode evoluir para um período de crescente instabilidade, transformando-se em uma doença aguda conhecida como crise blástica. (APPERLEY, 2015; VON BUBNOFF; DUYSER, 2010).

Foi a primeira neoplasia associada à aberração cromossomal e a primeira na qual foi empregado o uso de terapia-alvo, tornando-se

modelo para pesquisa e controle de outras desordens malignas (HEHLMANN; HOCHHAUS; BACCARANI, 2007; SAWYERS, 1999).

A **leucemia linfóide crônica (LLC)** caracteriza-se pelo acúmulo de linfócitos B CD5+ no sangue periférico, medula óssea, linfonodos e baço. Dessa forma, as células envolvidas nessa doença apresentam fenótipo específico, mas apesar da homogeneidade de fenótipo um terço dos pacientes nunca precisará de tratamento, com longo período de sobrevivência, outro um terço apresentam uma progressão lenta da doença, com longo período de sobrevivência, enquanto que a terceira parte dos pacientes são acometidos por uma forma mais agressiva, com necessidade de tratamento imediato (BOELEN et al., 2009; GHIA; FERRERI; CALIGARIS-CAPPIO, 2007).

Além do usual aumento na contagem de linfócitos, característico das leucemias, um diferencial da LMC é a linfadenomegalia (aumento dos linfonodos), presente em grande parte dos casos (GHIA; FERRERI; CALIGARIS-CAPPIO, 2007).

O surgimento da LLC não envolve nenhum fator de risco ambiental, porém estudos mostram a relação em pacientes imunodeficientes e com predisposição genética familiar (cerca 6 a 9 vezes mais chances de desenvolver a doença na presença de um familiar próximo com histórico), com prevalência em sujeitos com mais de 70 anos (EICHHORST et al., 2015; GHIA; FERRERI; CALIGARIS-CAPPIO, 2007).

A evolução e eficácia do tratamento da LLC dependem das mutações envolvidas no desenvolvimento da doença. A terapia envolve a combinação de quimioterápicos, podendo ser associado transplante de medula óssea. Ainda, a recidiva é comum nesse tipo de doença, e nesse caso a terapia inicial pode ser utilizada quando ocorre após longos períodos de remissão (BOELEN et al., 2009; EICHHORST et al., 2015).

2.4 Melanoma

O melanoma é a forma mais agressiva do câncer de pele, e ocorre pela proliferação maligna dos melanócitos, células responsáveis pela produção de melanina (pigmentação da pele), formando lesões pré-malignas na pele, com citologia atípica (ARRANGOIZ, 2016; WHO, 2014).

Em 95% dos casos, o melanoma ocorre na pele dos indivíduos, porém pode também surgir em mucosas da boca, nariz, anus, vagina e

intestino (BANDARCHI et al., 2010; SCHADENDORF et al., 2015; WHO, 2014).

A exposição à radiação UV, idade, sexo, predisposição, histórico familiar e histórico de melanoma prévio são fatores de risco a serem considerados para a doença (WHO, 2014).

A exposição ambiental à radiação UV é a maior causa do desenvolvimento de melanomas (cerca de 80% dos casos). A maior parte do dano celular decorrente dessa exposição é causado durante a infância e adolescência e, em combinação com a susceptibilidade genética, leva a mutações nos melanócitos que resultam na ativação de oncogenes, inativação de genes de supressão tumoral e redução nos mecanismos de reparo do DNA (ARRANGOIZ, 2016; INCA, 2015; WHO, 2014).

Apesar da estimativa divulgada pelo INCA para o ano de 2016 apresentar baixa incidência de novos casos de melanoma no Brasil, quando comparado a outros tipos de câncer (foram estimados 5.670 novos casos), sua letalidade é elevada, sendo que as maiores taxas de incidência estimadas tanto para homens quanto para mulheres encontram-se na região Sul (INCA, 2015).

Estima-se que 232 mil novos casos foram diagnosticados mundialmente no ano de 2012, com 55 mil óbitos para esse período. O melanoma acomete principalmente países com população caucasiana. Dessa forma, Regiões como Oceania, Europa e América do norte apresentam 80% dos casos de melanoma e 65% dos óbitos decorrentes dessa doença (WHO, 2014).

Em 1985 foi criado o método sistemático com o acrônimo ABCD para identificação de lesões pigmentadas com possível malignidade. O acrônimo especifica a observação de: A = assimetria; B = bordas irregulares; C = variação de cor; D = diâmetro > 6 mm (FRIEDMAN; RIGEL; KOPF, 1985). Em 2004 esse método foi revisado e a inclusão da letra E (evolução) foi acrescentada na avaliação (Fig. 3) (ABBASI et al., 2004). Ainda, outros sinais como inflamação, coceira ou sensação alterada no local da lesão, sangramento e formação de crosta também devem ser considerados (MACKIE, 1990).

Figura 3 – Método sistemático ABCDE para avaliação de lesão



Fonte: ARRANGOIZ, 2016

Após identificação visual dos sinais de malignidade, a confirmação é realizada através de biópsia do tecido, podendo ser subdividido em 4 grandes subgrupos, de acordo com características histopatológicas:

- O **melanoma de dispersão superficial** é o subtipo mais comum de melanoma, sendo que 25% são associados a nevos preexistentes. Acomete normalmente pessoas de pele branca e apresentam-se como uma placa pigmentada de bordas e superfície irregulares com variação de cor.

- O **melanoma lentigo maligno** corresponde a 4 - 15% dos melanomas, acometendo principalmente idosos com peles que foram danificadas pelo sol. Iniciam-se como melanoma *in situ*, podendo tornar-se invasivo em 5-8% dos casos, contudo essa transformação é lenta, podendo levar de 10 a 50 anos antes de crescerem de maneira vertical. A regressão nesse tipo de melanoma é comum.

- O **melanoma lentiginoso acral** é o tipo menos comum, representando 2-8% de todos os melanomas em pessoas de pele clara e 29-72% em pessoas de pele escura. Desenvolve-se comumente em regiões palmares e plantares, com diâmetro maior que 3 cm. É o tipo de melanoma mais comum em pessoas asiáticas e indivíduos de pele escura.

- O **melanoma nodular** é caracterizado pela falta de crescimento radial em áreas periféricas ao redor do crescimento vertical. Nos estágios iniciais, não possui características comuns do melanoma, apresentando-se com bordas regulares e de pequeno tamanho. São lesões mais escuras e em forma de domo. Representa 15 - 30% dos melanomas e progride para melanoma invasivo mais rápido que os outros tipos. Nests casos, a regressão é incomum (ARRANGOIZ, 2016; SCHADENDORF et al., 2015; SHAIN; BASTIAN, 2016; WHITEMAN; PAVAN; BASTIAN, 2011).

Pacientes com melanoma são categorizados em 3 grupos, de acordo com o grau de malignidade da doença: os estágios I e II apresentam melanoma localizado, sem evidência de metástase, no estágio III há presença da neoplasia em tecidos próximos ao tumor inicial e no estágio IV os pacientes apresentam metástase em locais distantes do local inicial (WHO, 2014).

As metástases oriundas do melanoma cutâneo são classificadas em 3 grupos: a **metástase satélite** localiza-se em uma distância de até 2 cm do tumor inicial; a **metástase em trânsito** encontra-se a mais de 2 cm do tumor inicial, mas na mesma região do tumor de origem; e a **metástase distante**, encontrada fora da região do tumor primário, acometendo órgãos distantes e normalmente com características celulares diferentes das células encontradas no tumor primário. Os dois primeiros tipos de metástase ocorrem via circulação linfática na derme e

apresentam 60% de chance de remissão em 5 anos (MAVERAKIS et al., 2015).

O tratamento padrão para o melanoma é a remoção do tumor a partir de uma incisão na região em que o mesmo encontra-se localizado. A incisão deve ser feita com ampla margem de segurança ao redor do local do tumor (lateralmente e profundamente) para garantir que todas as células neoplásicas sejam removidas. Pode também ser associada terapia sistêmica como tratamento adjuvante com o uso de quimioterápicos tradicionais, além de imunoterapia (anticorpos monoclonais) e, mais recentemente, foi introduzida a terapia-alvo, com o uso de inibidores da via de sinalização de genes que encontram-se mutados no melanoma. Ainda, a cirurgia de metástases distantes do tumor inicial, por exemplo de pulmões, também pode ser associado ao tratamento com intuito de aumentar o tempo de sobrevida do paciente (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007; MAVERAKIS et al., 2015; SCHADENDORF et al., 2015; WHO, 2014).

O melanoma apresenta bom prognóstico se diagnosticado e tratado cedo, porém em fases mais avançadas, principalmente com a presença de metástase, apresentam um prognóstico ruim (INCA, 2015; WHO, 2014).

2.5 Pesquisa e desenvolvimento de quimioterápicos

Atualmente, as terapias utilizadas no tratamento do câncer envolvem a cirurgia para remoção de tumores sólidos, radioterapia, quimioterapia, imunoterapia, hormonioterapia para cânceres hormônio dependentes, terapia de genes-alvo e transplante de células progenitoras. A escolha da terapia vai depender do tipo de câncer, mas de maneira geral a quimioterapia é o tratamento mais utilizado nos mais diversos tipos de neoplasias existentes (NCI, 2017b).

A maioria dos tratamentos quimioterápicos causam intensa toxicidade aos pacientes, levando à necessidade de redução de dose e tempo de utilização, e conseqüentemente reduzindo a eficácia dos tratamentos (FRIBERG et al., 2002; WANG; PROBIN; ZHOU, 2006). Outro problema enfrentado é a heterogeneidade das neoplasias, que fazem com que os tratamentos, via de regra, sejam ineficazes (DEXTER; LEITH, 1986; FIDLER, 1978; ZELLMER et al., 2014).

A heterogeneidade não se restringe apenas às neoplasias entre pacientes, mas também às células do tumor de um mesmo paciente, em relação ao poder de malignidade e angiogênese, sensibilidade ao agente

quimioterápico e potencial metastático e de recidiva (LI et al., 2014; MARUSYK; POLYAK, 2010; ZELLMER et al., 2014).

Na maioria dos cânceres, a recidiva é a maior causa de morte e pode estar relacionada às células tumorais residuais após tratamento quimioterápico. Essas células acabam por desenvolver mecanismos para driblar a ação dos quimioterápicos, aumentando o poder de agressividade e invasividade do tumor (HEGDE et al., 2012; KOTTKE et al., 2013; LI et al., 2014; ZELLMER et al., 2014).

A oncologia representa nos dias de hoje a maior área de investimento em termos de número de projetos, testes clínicos e gastos com pesquisa e desenvolvimento na indústria farmacêutica (XU; MAO, 2016). Segundo a OMS, o impacto econômico do câncer é significativo e se apresenta de forma crescente, com um custo estimado de aproximadamente 1,16 trilhões de dólares no ano de 2010 (WHO, 2014). Porém, apesar dos avanços na compreensão da biologia do câncer, a habilidade de transformar esse conhecimento em novas terapias ainda é limitada, sendo que apenas 10% das pesquisas são bem sucedidas (XU; MAO, 2016).

Atualmente existem mais de 100 trabalhos escritos com estudo de quimioterápicos sendo pesquisados para cerca de 200 diferentes tipos de tumores. Ainda assim, a taxa de cura para 4% dos cânceres que requerem tratamento sistêmico permanece muito baixa, fazendo-se necessário a continuidade da pesquisa de novos fármacos (BURGER; FIEBIG, 2004).

A pesquisa para desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos envolvem estudos *in vitro* para inicialmente identificar novos agentes, seguido por testes em roedores para avaliar a potencial atividade biológica, estudos farmacológicos para definir absorção, distribuição, metabolismo e eliminação, e estudos toxicológicos para definição da dose segura para início de estudos com humanos (HOLLINGSHEAD, 2008).

É importante destacar que o uso de animais em testes de toxicidade e atividade de novos fármacos deve ser feita de forma racional, bem como definido o melhor modelo para cada situação. Para tanto, dispõe-se de diversas diretrizes e protocolos internacionais e nacionais que auxiliam no delineamento de estudos (ANVISA, 2013; EMA, 2010a; LASA/NC3RS, 2009; OECD, 2001a; UNDP; WORLD BANK; WHO, 2004).

2.6 Sais de isotiourônio

Estudos revelam que as tiouréias, os sais de isotiourônio e análogos representam uma importante classe de compostos com atividade biológica, entre elas herbicidas (SALAMA et al., 2015), agonistas de receptores GABA_A (ALLAN et al., 1997) e de histamina H₃ (GANELLI et al., 1992), além de exibirem ações antiinflamatória (SRIHARI et al., 2009), anestésica (REGAN; GALYSH; MORRIS, 1967), antiviral (VENKATACHALAM; MAO; UCKUN, 2004), antibacteriana (BADAWI; AZZAM; MORSY, 2006; BELLA; TAIT; PARENTI, 1986; IWAI et al., 2007; TRANI et al., 1989) e fungicida (BADAWI; AZZAM; MORSY, 2006).

Além das diversas aplicações citadas, a atividade antitumoral desses compostos também vem sendo estudada (EL-HENAWY et al., 2013; FERREIRA et al., 2013; KORONKIEWICZ et al., 2012, 2015; KORONKIEWICZ; CHILMONCZYK; KAZIMIERCZUK, 2012; VENKATACHALAM et al., 2007) e recentemente uma molécula pertencente ao grupo encontra-se em fase 1 de testes clínicos para o tratamento de tumores sólidos após ter apresentando atividade antitumoral em estudos com câncer de pulmão, próstata, cólon e mama (KUMAR et al., 2011; SHAPIRO et al., 2015).

Em estudo publicado anteriormente, demonstramos que as tiazindionas, heterocíclicas cuja síntese envolve o uso de sais de isotiourônio apresentam potencial atividade antitumoral quando testadas em linhagens de leucemia, atuando no desequilíbrio do cálcio intracelular e metabolismo mitocondrial, induzindo ao estresse de retículo endoplasmático e ativação da cascata de caspases, culminando na morte celular por fragmentação do DNA (FERREIRA et al., 2013).

Outro estudo realizado por nosso grupo mostra que os sais de isotiourônio reduzem a expressão do gene NRAS associado à resistência a quimioterápicos em melanomas, induzindo à apoptose das células neoplásicas e diminuindo o poder metastático das mesmas (CISILOTTO et al., 2015).

Do mesmo modo, uma série de 28 moléculas de sais isotiourônio -aril e -alquil substituídas foram submetidas a uma triagem para potencial atividade tumoral e observou-se que algumas delas apresentavam expressiva citotoxicidade e seletividade em linhagem celular de leucemia. Entre as moléculas estudadas, o brometo de (Z)-2-(isotioureidometil)-2-pentenoato de metila (SI-MF08) destacou-se por apresentar melhor atividade citotóxica, sendo capaz de causar a morte da linhagem celular de leucemia com uma concentração de 3 μ M, além de

apresentar alta seletividade para a linhagem tumoral quando comparados os efeitos do composto em linhagem não tumoral (IS = 71) (FERREIRA et al., 2017). Na investigação do mecanismo de ação do composto, observou-se que o SI-MF08 causa um bloqueio de ciclo celular na fase G2/M, impedindo a progressão do processo de replicação, levando à morte das células tumorais por apoptose (ASSUNÇÃO, 2013). Desta forma, a alta citotoxicidade, combinada com a seletividade da molécula para células tumorais e a ativação da morte pela via da apoptose, sugerem que o SI-MF08 seja uma molécula interessante para o estudo de atividade antitumoral

**CAPÍTULO 1. MECANISMO
DE AÇÃO DO SI-MF08 EM
LINHAGEM TUMORAL DE
LEUCEMIA**

1. Introdução

A apoptose é o nome dado ao tipo de morte celular envolvida em processos fisiológicos que ocorrem desde o desenvolvimento embrionário, atuando também na renovação tecidual e na homeostasia de órgãos e tecidos, com eliminação de componentes que perderam sua funcionalidade (BONINI; MOURA; FRANCO, 2000).

A apoptose tem sido considerada um alvo importante na pesquisa de quimioterápicos. A identificação de genes e produtos gênicos envolvidos em processos apoptóticos, bem como informações sobre o mecanismo de ação de proteínas pró- e anti-apoptóticas permitem o conhecimento de novas abordagens na terapia do câncer (KAUFMANN; EARNSHAW, 2000; REED, 2002)

A ativação da apoptose pode ocorrer através da via extrínseca e/ou intrínseca. Na via extrínseca, a sinalização inicial ocorre via receptores de morte na membrana celular. Esses receptores contêm um domínio citosólico que permite a ligação a proteínas sinalizadoras da cascata de morte denominadas caspases que ativam a cascata de sinalização de morte (FULDA; DEBATIN, 2006; KAUFMANN; EARNSHAW, 2000; REED; PELLECCIA, 2005).

A via intrínseca da sinalização da apoptose envolve a ativação de caspases diferentes da via extrínseca, além da inibição de fatores anti-apoptóticos da família Bcl-2 e permeabilização da membrana mitocondrial para liberação de fatores pró-apoptóticos do seu interior.

Entre os membros da família de proteínas Bcl-2, destacam-se a proteína anti-apoptótica Bcl-2 e Bcl-x_L como promissores alvos no desenvolvimento de novos fármacos (FULDA; DEBATIN, 2006; KAUFMANN; EARNSHAW, 2000; O'NEILL; HOCKENBERY, 2003; REED; PELLECCIA, 2005).

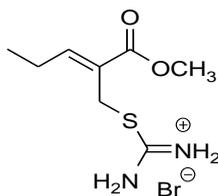
A proteína Bcl-2 atua também na regulação de processos autofágicos. A autofagia é um evento que ocorre em resposta a diversas situações como privação de nutrientes, acumulação de proteínas mal enoveladas e organelas danificadas (DALBY et al., 2010; KEPP et al, 2011; ROSENFELDT; RYAN, 2011; DENTON; NICOLSON; KUMAR, 2012). Na presença de uma das situações mencionadas, ocorre a formação de vesículas autofágicas que envolverão pequenas porções do citosol contendo as proteínas ou organelas danificadas para degradação das mesmas e manutenção da homeostasia celular.

Assim, a indução da autofagia pela inibição de proteínas anti-autofágicas como a Bcl-2 pode ser utilizada como alternativa terapêutica na morte celular de alguns tipos de câncer, quando essas células não

apresentam moduladores apoptóticos, ou como uma via complementar à ativação da apoptose, para potencializar a ação antitumoral (FAZI, 2008; DALBY et al., 2010; GALLUZZI et al., 2012).

Verificamos anteriormente que o sal de isotiourônio MF08 (brometo de (z)-2-(isotioureidometil)-2-pentenoato de metila) (Fig. 4) apresentou expressiva atividade citotóxica, destacando-se com melhor atividade antitumoral entre um grupo de 28 moléculas testadas em linhagem celular de leucemia.

Figura 4 – Estrutura molecular do brometo de (z)-2-(isotioureidometil)-2-pentenoato de metila (SI-MF08)



O SI-MF08 foi sintetizado através da reação de Morita-Baylis-Hillman pelo Dr. Misael Ferreira e pelo Prof. Dr. Marcus Mandolesi Sá do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC (SÁ et al., 2010).

O composto apresentou IC_{50} (concentração inibitória de 50% das células) de 3 μ M. Observou-se ainda que o mecanismo de ação dessa molécula envolve externalização da fosfatidilserina, aumento de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), formação de vacúolos citoplasmáticos sugestivos de processo autofágico, bloqueio do ciclo celular na fase G2/M e fragmentação do DNA (ASSUNÇÃO, 2013).

Estes resultados indicam que o composto ativa diferentes mecanismos que induzem à morte da célula, o que pode ser uma maneira interessante de driblar a resistência da célula tumoral aos tratamentos quimioterápicos convencionais (MARQUEZ et al., 2013).

A resistência a quimioterápicos pode ocorrer pela heterogeneidade do tumor, pela ativação de bombas de efluxo na membrana celular, inativação do fármaco ou mudanças no alvo bem como alterações celulares decorrentes de uma resposta ao estresse induzido pelo tratamento (NOBILI et al., 2006; SUI et al., 2013). Como exemplo do último mecanismo, podemos citar a capacidade da célula de driblar a apoptose induzida pelo fármaco (IGNEY; KRAMMER, 2002; MARQUEZ et al., 2013; NOBILI et al., 2006; POMMIER et al., 2004; PORTT et al., 2011). Sendo assim, o SI-MF08 demonstrou-se uma

molécula com promissora atividade antitumoral, portanto novos estudos foram realizados para melhor compreensão de sua atuação na fisiologia da célula tumoral.

2 Materiais e métodos

2.2 Reagentes

O meio de cultura, soro fetal bovino, tripsina e os antibióticos penicilina/streptomicina foram adquiridos da GIBCO (Grand Island, NY, EUA). A sonda JC-1 (5,5',6,6'-tetracloro1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolocarbocianina) foi obtida da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). Os anticorpos primários Bcl-2, Bcl-x_L, β-actina e o anticorpo secundário IgG ligado à peroxidase foi fornecido pela Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas, TX, EUA). O iodeto de propídeo foi obtido da Millipore (Billerica, MA, EUA), o dimetilsulfóxido (DMSO) foi obtido pela Merck (Darmstadt, Germany) e o Amersham ECL™ pela GE Healthcare (Little Chalfont, UK). A sonda LysoTracker® Green foi obtida da Thermo-Fisher (Waltham, Massachusetts, USA) e demais reagentes foram adquiridas da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.3 Cultura celular

As células de leucemia murina L1210 e fibroblasto murino NIH-3T3 foram mantidas em garrafas plásticas de cultura contendo meio RPMI ou DEMEM, respectivamente, 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) com contagem em câmara de Neubauer e foi estabelecido um limite mínimo de 90% de viabilidade para realização dos experimentos. Os ensaios foram realizados com células a partir da 3ª passagem e com limite de até 6 passagens.

2.4 Tratamento Celular

O sal de isotiourônio MF08 foi dissolvido em água miliQ e armazenado a 4°C em alíquotas. A solução estoque foi diluída em meio de cultura para atingir as concentrações desejadas nos experimentos. As

células NIH-3T3 foram plaqueadas 24 horas antes da adição do composto para aderência nas placas e as células L1210 foram plaqueadas juntamente com o composto. Como controle, foram utilizadas células sem adições.

2.5 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 (MTT) para determinar a viabilidade celular por meio da atividade mitocondrial, majoritariamente pela hidrogenases. O MTT é um sal de tetrazólio solúvel em água, o qual é convertido em um formazan púrpura insolúvel após a clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais (MOSMANN, 1983). As células NIH-3T3 (1×10^4 / poço) foram plaqueadas 12 horas antes da exposição ao SI-MF08 para aderência das mesmas na placa. Depois de aderidas as células foram expostas a concentrações crescentes de SI-MF08 ($1 \mu\text{M}$ a $100 \mu\text{M}$) em meio de cultura em placa de 96 poços por 24 h. Após período de incubação o meio foi substituído por uma solução de MTT ($0,25 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) por 2 horas a 37°C . Em seguida, 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 por regressão linear. Portanto, quanto maior a densidade óptica obtida no ensaio, maior o número de células viáveis. A concentração que inibe em 50% a atividade das desidrogenases mitocondriais (IC_{50}) foi calculada usando o programa GraphPad Prisma 5.

2.6 Cálculo do índice de seletividade

O índice de seletividade (IS) do composto foi definido pela razão da IC_{50} do composto entre as linhagens não-tumoral e tumoral, conforme fórmula a seguir:

$$IS = \frac{IC_{50} \text{ em célula não - tumoral}}{IC_{50} \text{ em célula tumoral}} \quad (1)$$

2.7 Avaliação ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As células L1210 foram plaqueadas (1×10^6 /poço) em placa de 12 poços e foram expostas a 1,5 – 2,0 – 3,0 μM de SI-MF08 por 24 horas. Em seguida, as células foram centrifugadas a 400 x g por 10 minutos, lavadas com PBS 3x para completa remoção do meio de cultura e fixadas por 8 horas com 4% de paraformaldeído e 2,5% glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio pH 7,2; 0,1M.

As células foram novamente lavadas 3x com a solução tampão, pós-fixadas com 1% de tetróxido de ósmio com ferrocianeto de potássio e cloreto de cálcio seguido outra lavagem com solução tampão. A desidratação das amostras foi feita com séries crescentes de acetona e as células foram infiltradas em resina para emblocamento. Seções ultrafinas foram obtidas em ultramicrotomo e contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo para visualização em microscópio de transmissão JEM-1011 (JEOL).

2.8 Investigação da formação de vacúolos ácidos por microscopia confocal

A formação de vacúolos ácidos decorrentes do tratamento com o composto foi observada através de microscopia confocal a utilização do corante laranja de acridina (DEGTYAREV; REICHELTLIN, 2014; HARHAJI-TRAJKOVIC et al., 2009; KANZAWA et al., 2004). Para a realização do ensaio, as células L1210 foram plaqueadas em uma densidade de 1×10^6 /poço em placa de 12 poços e incubadas por 24 horas com o composto. Após incubação, as células foram centrifugadas a 400 x g por 10 minutos em 200 μL de PBS. Dessa suspensão, uma alíquota de 20 μL foi colocada em placa de petri apropriada para visualização em microscópio confocal e coradas com laranja de acridina (0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As células foram visualizadas em fluorescência verde (Laser de Argônio com 488 nm de excitação e 540 nm de emissão), vermelha (Laser He-Ne com 594 nm de excitação e 680 nm de emissão) e em campo claro. As imagens foram capturadas em microscópio Leica DMI6000 B acoplado a um scanner confocal TCS SP5. Em condições normais, as células L1210 apresentaram citoplasma e núcleo corados em verde, na presença de vacúolos ácidos, o corante penetra esses compartimentos e emite fluorescência vermelha, possibilitando a distinção dos mesmos.

2.9 Quantificação da formação de vacúolos ácidos por citometria de fluxo

Para quantificação dos vacúolos ácidos, as células L1210 (1×10^6 /poço) foram expostas a $3,0 \mu\text{M}$ de SI-MF08 em placa de 12 poços por 24 horas. Após incubação com composto, as células foram marcadas com 50 nm de LysoTracker® Green por 1 hora a 37°C (CHIKTE; PANCHAL; WARNES, 2014). Células incubadas sem composto foram utilizadas com controle negativo e para controle positivo as células foram sonicadas 10 x com pulsos de 3 segundos após marcação com a sonda fluorescente, conforme descrito por Degtyarev, Reichelt e Lin (2014), com algumas modificações. Após tempo de marcação das amostras, as células foram centrifugadas a $400 \times g$ por 10 minutos, lavadas 2x com 1 mL de PBS, ressuspensas em $400 \mu\text{L}$ de PBS gelado e mantidas em gelo até a aquisição no aparelho. A quantificação do número de eventos com vacúolos ácidos foi realizada em citômetro de fluxo FACSCanto (Becton Dickinson) utilizando o software Flowing 2.5.1 (Universidade de Turku, Finlândia). Para cada amostra, foram analisados 7 mil eventos.

2.10 Investigação do potencial de membrana mitocondrial

A avaliação do potencial de membrana mitocondrial das células L1210 frente à exposição ao SI-MF08 foi avaliada utilizando a sonda fluorescente JC-1 (iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolcarbocianina), uma substância catiônica capaz de penetrar a membrana negativa da mitocôndria quando o potencial está estabelecido, apresentando-se na forma de agregados que emitem fluorescência vermelha. No caso de perda do potencial da membrana mitocondrial, ocorre a liberação desta sonda para o citoplasma em forma de monômeros que emitem fluorescência verde.

Para realização deste ensaio, as células foram plaqueadas em placas de 12 poços em uma densidade de 1×10^6 células/poço e expostas ao composto por 4 horas. Em seguida, a sonda lipofílica, catiônica fluorescente JC-1 foi adicionada por 20 minutos a 37°C ($5\% \text{ CO}_2$) e posteriormente as células foram entrifugadas a $400g$ por 10 minutos e lavadas 2 vezes com 1 mL de PBS para completa remoção do excedente de sonda. As amostras foram ressuspensas em $500 \mu\text{L}$ de PBS para medição da fluorescência em espectrofluorímetro (Perkin-Elmer LS55) com excitação de 485 nm e emissão de 535 nm para fluorescência verde, e 560 nm de emissão e 595 nm de excitação para fluorescência

vermelha. Os resultados da razão entre as fluorescências vermelho e verde, após normalização do conteúdo proteico, das células expostas ao composto e foram comparados com o grupo controle (células sem exposição ao SI-MF08), que foram consideradas como possuindo 100% de potencial de membrana mitocondrial. Como controle positivo foi utilizado FCCP (fluorocarbonil-cianeto fenilhidrazona) 1 μM , um desacoplador da cadeia transportadora de elétrons.

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

A atividade das caspases -3, -8, -9 e -12 das células L1210 expostas ao SI-MF08 foram monitoradas pela produção de substrato fluorescente, segundo protocolo do fabricante (SIGMA-ALDRICH). Para isso, as células (3×10^6 / poço) foram plaqueadas em placas de 6 poços e incubadas com meio de cultura contendo a IC_{50} do composto por 4 ou 12 horas. Após, as células foram lavadas com PBS e lisadas com tampão contendo 50 mM HEPES pH 7.4, 5 mM de CHAPS (3-propano sulfonato [(3-*Colamidopropil*)-dimetil amônio]), 5 mM de DDT (ditiotreitól), 1 mM de PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil), 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 x 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 μM Ac-DEVD-AMC; caspase-8: 100 μM Ac-IEDT-AMC; caspase-9: 100 μM Ac-LEDH-AFC; caspase-12: 50 μM 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 emissão de 460 nm. Os resultados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prisma 5 e comparados ao grupo controle (sem exposição ao SI-MF08). Dados foram expressos em unidades de fluorescência.

2.12 Quantificação da proteína Fas por citometria de fluxo

Para a avaliação da quantidade de proteínas envolvidas no processo apoptótico, as células L1210 (1×10^6) foram plaqueadas em placa de 12 poços e incubadas por 12 ou 24 horas com SI-MF08. Em

seguida as células foram centrifugadas a 400 x g por 10 minutos e lavadas duas vezes com 1 mL de PBS. As amostras foram ressuspensas em 60 µL de PBS + 1% de SFB. Em seguida, 50 µL das amostras foram incubadas com 10 µL de anticorpo monoclonal específico por 30 minutos a 4°C. Posteriormente as células foram lavadas com tampão e ressuspensas em PBS + 1% de SFB para aquisição em citômetro de fluxo (FACS CANTO II, BD Biosciences). A verificação de fluorescência inespecífica foi realizada com a utilização de um isotipo e a expressão das proteínas em estudo expressas em células expostas ao composto foram comparadas com a quantidade de proteína expressas em células do grupo controle (sem exposição ao composto).

2.13 Investigação de proteínas envolvidas em processos apoptóticos/autofágicos por Western Blot

Para a avaliação do conteúdo proteico de Bcl-2 e Bcl-x_L, as células L1210 foram plaqueadas numa densidade de 3 x 10⁶ células/poço em placa de 6 poços e incubadas com 1,5 µM e 3,0 µM de SI-MF08 por 48 horas. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 400 x g por 10 minutos e lavadas duas vezes com 1 mL de PBS. A extração de proteínas foi feita com a utilização de 120 µL de tampão RIPA contendo inibidores de protease (TrisHCl 10 mM, NaCl 150 mM, 1% de Triton X-100[®], 0,1% de SDS, 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil, 5 µg/mL de aprotinina, 1 µg/mL leupeptina e 1 µg/mL de pepstatina), seguido da quantificação de proteínas totais pelo método de Lowry (1951). Após quantificação, 35 µg de proteínas totais foram separadas eletroforéticamente em gel de dodecilsulfato de poliacrilamida 15% e transferidas para membrana de nitrocelulose seguido de bloqueio com 5% de albumina bovina em solução salina tamponada com Tris e Tween-20[®] (TBS-T). Em seguida as membranas foram incubadas overnight a 4° C com anticorpos monoclonais específicos para detecção de Bcl-2, Bcl-x_L ou β-actina nas concentrações de 1:100, 1:100 e 1:2000, respectivamente (diluição em TBS-T contendo 2,5 % de albumina sérica bovina). Após, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG murina conjugado à peroxidase (concentração de 1:20.000) para visualização de complexos quimioluminescentes utilizando Amersham ECL[™] (GE Healthcare, GB) detectados com ChemiDoc MP (Bio-Rad, CA, EUA). As imagens das proteínas foram analisadas com o programa ImageLab e os dados foram normalizados pela quantidade de β-actina encontrada em cada amostra.

2.14 Análise estatística

Os resultados das análises foram expressos como média \pm EPM de três experimentos independentes e análise estatística foi realizada com o programa GraphPad Prisma 5 utilizando teste T de Student e valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3 Resultados e Discussão

3.1 Citotoxicidade do SI-MF08 em linhagem não tumoral e índice de seletividade

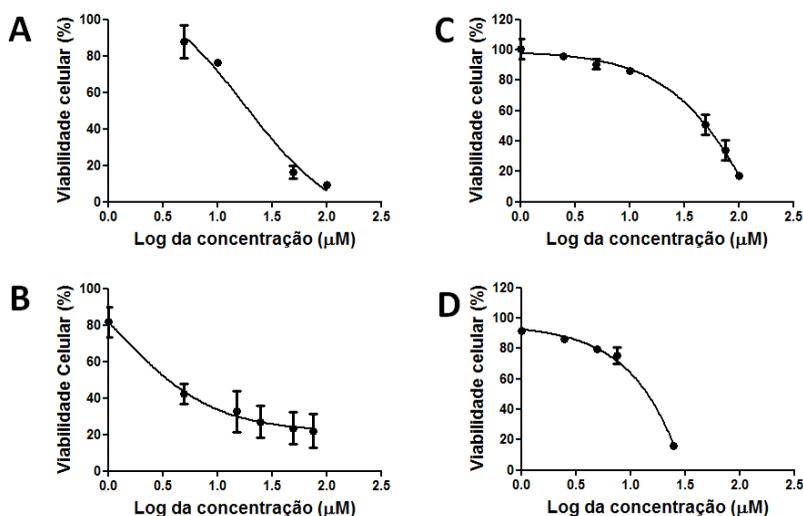
Em estudos anteriores, observou-se que o SI-MF08 apresenta IC_{50} de apenas 3 μ M para a linhagem celular de leucemia murina L1210 (ASSUNÇÃO, 2013; FERREIRA et al., 2017), portanto com o objetivo de avaliar a seletividade da molécula para células tumorais realizou-se o estudo de citotoxicidade do composto em linhagem não tumoral de fibroblasto murino NIH-3T3.

Para isso, doses crescentes do composto (5 μ M a 100 μ M) foram adicionadas à cultura celular de fibroblasto murino NIH-3T3 por um período de 24 horas para avaliação da citotoxicidade do composto e determinação da IC_{50} (concentração que inibe 50% a atividade das desidrogenases mitocondriais) através do método de MTT (MOSMANN, 1983). Para fins comparativos, a citotoxicidade do agente tumoral mitoxantrona foi também avaliada nas mesmas condições do SI-MF08.

A mitoxantrona é uma molécula sintética estruturalmente similar às antraciclina. As antraciclina são moléculas naturais ao qual o agente antitumoral doxorubicina pertence (KOMESHIMA; TSURUO; UMEZAWA, 1988). A doxorubicina é amplamente utilizada no tratamento de leucemias, câncer de mama e outros tumores sólidos, porém sua baixa biodisponibilidade faz com que seja necessário o uso de altas doses, aumentando o risco de cardiotoxicidade devido a efeitos cumulativos, além de mielossupressão e nefrotoxicidade (CHHIKARA et al., 2011). A mitoxantrona por sua vez, foi desenvolvida com o objetivo de reduzir a cardiotoxicidade presente em moléculas naturais como a doxorubicina e melhorar o índice terapêutico. É usada no tratamento do câncer de mama, ovário, próstata, linfomas e leucemias, incluindo a LLA (HAJIHASSAN; RABBANI-CHADEGANI, 2009; PARKER et al., 2010; PATEL; TRÉDAN; TANNOCK, 2013)

Através da interpolação das concentrações utilizadas com a resposta da atividade das desidrogenases mitocondriais, foi possível determinar através do programa estatístico GraphPad Prisma 5 uma IC_{50} de 71 μM nas células NIH-3T3. A Figura 5 representa a curva dose-resposta do SI-MF08 em 24 h de exposição em células NIH-3T3 (Fig. 5-A) e L1210 (Fig. 5-B). Da mesma forma, foi avaliada a citotoxicidade do agente antitumoral mitoxantrona nas linhagens celulares NIH-3T3 (Fig. 5-C) e L1210 (Fig. 5-D) apresentando uma IC_{50} de 15 μM e 45 μM , respectivamente.

Figura 5 - Curva dose- resposta da atividade citotóxica do SI-MF08.



A citotoxicidade do SI-MF08 foi avaliada através do método de MTT, após as células serem expostas por 24 horas a concentrações crescentes do composto em fibroblasto murino NIH-3T3 (A) e células de leucemia L1210 (B). Foi também avaliada a citotoxicidade do agente antitumoral mitoxantrona nas linhagens celulares NIH-3T3 (C) e L1210 (D) sob as mesmas condições descritas pra o SI-MF08. Valores expressos em média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

Ainda, a razão entre a IC_{50} da linhagem não tumoral e a IC_{50} da linhagem tumoral nos permitiu determinar o índice de seletividade (IS) (1). Observou-se dessa forma que o IS do SI-MF08 é de 24. Por outro lado, a mitoxantrona apresentou $IS = 3$.

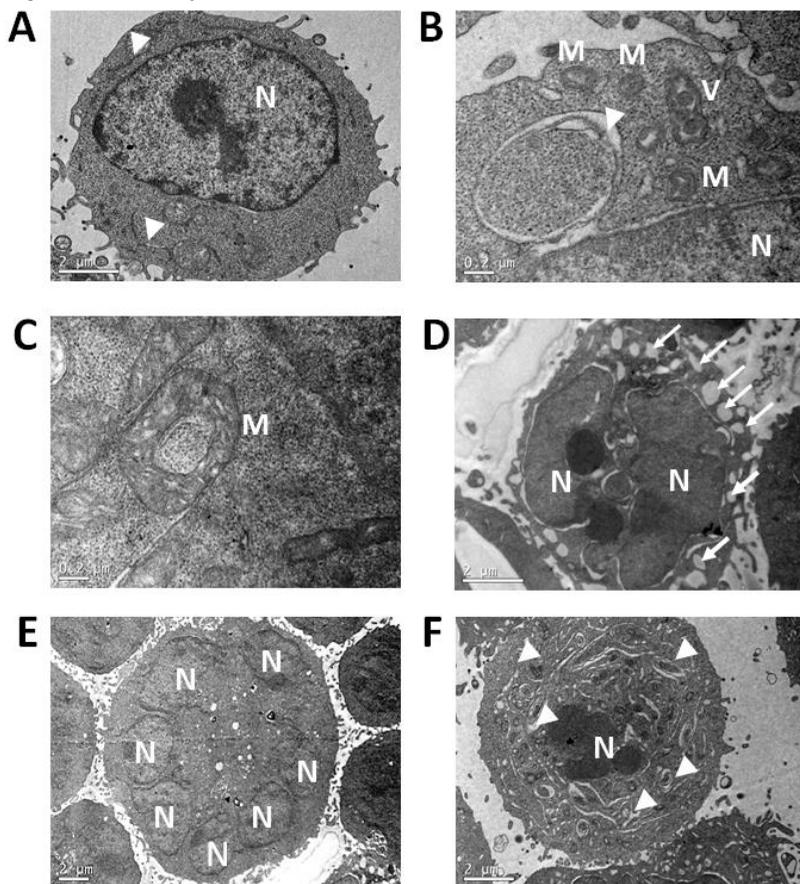
A seletividade de um composto para células tumorais é um fator importante na busca por novos agentes quimioterápicos, sendo um indício de que a molécula possa apresentar menor toxicidade sistêmica quando usada em pacientes (LÓPEZ-LÁZARO, 2015). Portanto, podemos dizer que nas linhagens estudadas, além de apresentar maior citotoxicidade, o SI-MF08 apresentou também maior seletividade ($IC_{50}=3 \mu\text{M}$ e $SI=24$) quando comparado a um agente antitumoral de referência.

3.2 Alterações morfológicas em células L1210 expostas ao SI-MF08

Para avaliação das alterações morfológicas envolvidas na citotoxicidade do SI-MF08, seções ultrafinas de células L1210 foram avaliadas após 24 horas de exposição do composto. A Figura 6 a seguir mostra o aumento das cisternas do RE (Fig. 6-B e F), além de formação de vacúolos autofágicos (Fig. 6-B), vacuolização citoplasmática (Fig. 6-D) e mitocôndria “donut-like” (Fig. 6-C), indicando alterações no metabolismo celular, causadas pelo composto. Em trabalho anterior, observou-se que o composto gerava nestas mesmas células um aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (ASSUNÇÃO, 2013).

O estresse de RE apresenta aumento das cisternas dessa organela, com liberação de cálcio para o citosol que é então recaptado pela mitocôndria, causando um desequilíbrio no metabolismo mitocondrial com aumento da geração de EROs. Quando ocorre grande acúmulo de EROs no interior da mitocôndria, há aumento da matriz mitocondrial, perda do potencial de membrana mitocondrial com abertura dos poros da membrana e liberação de íons cálcio para o citosol, induzindo a mais estresse de RE e assim dando continuidade ao ciclo de eventos envolvidos no desequilíbrio intracelular (WANG; YOULE, 2009; ZEESHAN et al., 2016). Ainda, a dilatação das cisternas do RE ocorre em processos apoptóticos para formação de vesículas e vacúolos (LY; GRUBB; LAWEN, 2003). Portanto, a micrografia apresentada na Figura 6-F parece representar um passo a frente da micrografia da célula apresentada na Figura 6-D no processo de morte, em que as cisternas do RE se dilatam (Fig. 6-F) e posteriormente surgem em seu lugar vacúolos citoplasmáticos que se estendem ao redor de todo núcleo da célula (Fig. 6-D).

Figura 6 – Mudanças estruturais em células L1210.

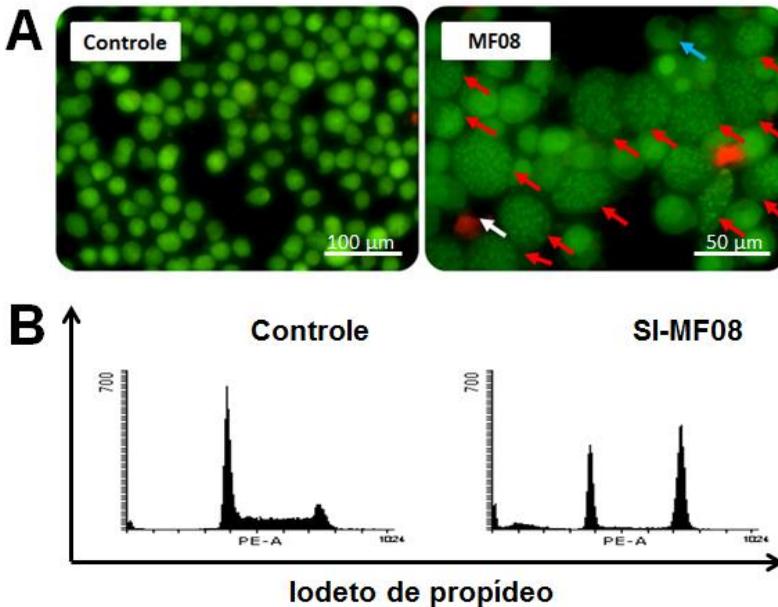


Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão de células L1210 cultivadas sem exposição ao composto (grupo controle) (A) e de células expostas por 24 horas ao SI-MF08 em concentrações de 1,5 μM (B e C), 2,0 μM (D e E) e 3,0 μM (F). “N” indica o núcleo da célula; “M” representa mitocôndrias, “V” indica vacúolo autofágico, triângulos indicam o RE e setas apontam para vacuolização do citoplasma.

Além disso, pontos mais eletrodensos na região do núcleo como observados na Figura 6-D e F representam a condensação da cromatina, outro fenômeno observado em processos apoptóticos.

A captação de cálcio e a formação de EROs no interior da mitocôndria pode levar à uma mudança conformacional da organela pela perda do potencial de membrana mitocondrial, em que a mitocôndria adquire a forma circular, semelhante à uma rosquinha (donut-like mitochondria), na tentativa de impedir sua perda de funcionalidade causada pelo estresse oxidativo (AHMAD et al., 2013; BENARD et al., 2007; GREGORCZYK et al., 2014; LIU; HAJNÓCZKY, 2011). Na Figura 6-C observa-se que em contato com SI-MF08, as células L1210 apresentaram mitocôndrias com formato circular correspondentes ao fenômeno descrito.

Figura 7 – Bloqueio mitótico de células L1210 expostas ao SI-MF08



Células de leucemia tratadas com a IC_{50} do SI-MF08 apresentaram bloqueio mitótico. Visualização em microscópio de fluorescência com laranja de acridina e brometo de etídio evidenciou segregação cromossomal (setas vermelhas) após exposição ao SI-MF08. Seta branca indica célula em necrose e seta azul indica vacuolização citoplasmática. Fonte: ASSUNÇÃO, 2013 (A). Histograma representativo da dispersão das células de leucemia nas fases do ciclo celular indica que o composto causou aumento do número de eventos na fase G2/M

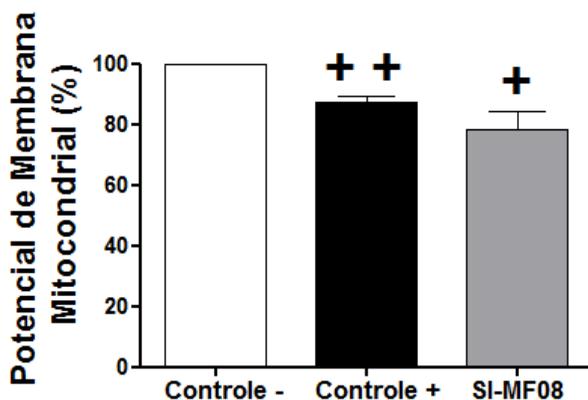
quando comparado ao grupo controle. Células foram marcadas com iodeto de propídeo (intercalante de DNA) e adquiridas em citômetro de fluxo (B).

O composto causou também multinucleação celular (Fig. 6-E), sugestivo de catástrofe mitótica. Alterações morfológicas semelhantes já foram reportadas por Vitale e colaboradores (2011) em micrografias de células de carcinoma colorretal HCT-116 obtidas por MET, sugerindo que esse evento possa ser decorrente de uma catástrofe mitótica. Em estudo anterior com SI-MF08, essa hipótese já havia sido levantada, uma vez que o mesmo causa segregação cromossomal (Fig. 7-A), levando a um acúmulo no número de eventos na fase G2/M do ciclo celular (Fig. 7-B) quando as células foram avaliadas por citometria de fluxo (ASSUNÇÃO, 2013).

3.3 Potencial de Membrana Mitocondrial

A permeabilidade da membrana da mitocôndria é controlada pelo potencial de membrana mitocondrial (PMM), que é a diferença de carga existente entre o citosol e a matriz mitocondrial. Quando estabelecido, o PMM permite o controle da troca de íons do interior da mitocôndria e citoplasma, bem como participa da estruturação da matriz da organela (GOTTLIEB et al., 2003; LY; GRUBB; LAWEN, 2003).

Figura 8 - Potencial de membrana mitocondrial de células L1210.

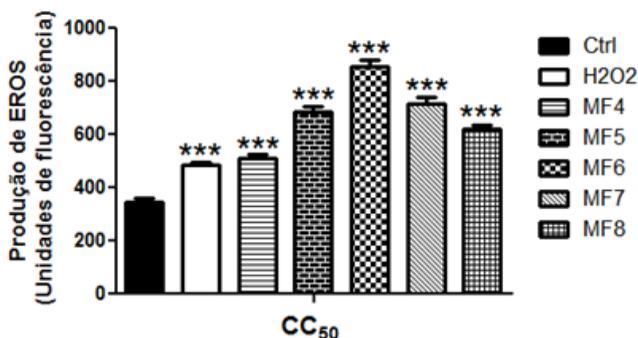


Células foram expostas a 3,0 μM de SI-MF08. Como controle negativo, células foram cultivadas em condições normais. Para controle positivo, células foram incubadas com FCCP. Dados representam médias \pm desvio padrão de três experimentos independentes. ++ $p < 0,004$ e + $p < 0,02$.

Para confirmação da mudança no potencial de membrana mitocondrial sugerida como uma das alterações metabólicas causadas pelo composto nas células estudadas, utilizou-se a sonda fluorescente JC-1 que foi quantificada espectrofluorimetricamente. A razão entre a fluorescência verde e vermelha emitida pela sonda demonstrou que houve uma perda do PMM após 4 horas de exposição ao composto, conforme se observa na Figura 8.

A perda do PMM ocorre em processos de morte celular como a apoptose, levando ao aumento da geração de EROs, ruptura da membrana externa da organela e liberação de moléculas envolvidas na cascata de sinalização de morte (GOTTLIEB et al., 2003; KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007; TSUJIMOTO; SHIMIZU, 2007; WANG; YOULE, 2009). Como observado em trabalho anterior, o SI-MF08 também causa aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (Fig. 9) (ASSUNÇÃO, 2013), resultando na perda de PMM observada.

Figura 9 – Geração de EROs em células de leucemia expostas ao SI-MF08



Avaliação da geração de EROS induzidas pela IC₅₀ dos SIs após 4 horas de exposição aos compostos. H₂O₂ foi usado como controle positivo. No gráfico, MF8 corresponde ao SI-MF08. A geração de EROs foi avaliada com a sonda DCFH-DA (2', 7'- diclorodihidrofluoresceína diacetato) e quantificado espectrofluorimetricamente. Resultados foram analisados com análise de variância de uma via (ANOVA), seguido de pós-teste de Dunnet. Valores foram expressos em unidades de fluorescência ***p<0,0001, n = 3 ± EPM. Fonte: ASSUNÇÃO, 2013.

3.4 Formação de vacúolos ácidos

O controle do metabolismo e homeostasia celular envolve processos autofágicos para degradação de organelas com perda de funcionalidade. Para isso, ocorre a formação de uma membrana que circunda parte do citoplasma contendo as organelas disfuncionais e essas que são apresentadas aos lisossomos e degradadas enzimaticamente no interior dessas vesículas ácidas. Em casos de extensivo dano celular, a autofagia também pode ocorrer como um mecanismo de morte celular (LEVINE; KROEMER, 2008; MIZUSHIMA, 2007; NODA; INAGAKI, 2015).

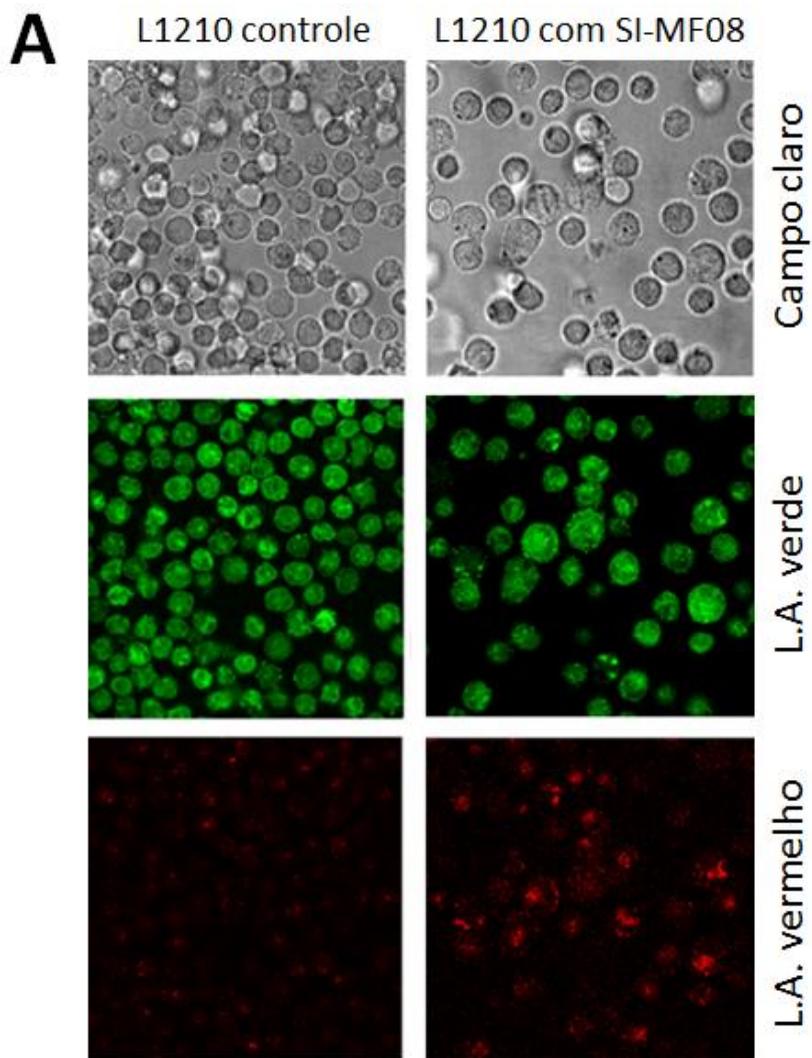
Com o propósito de investigar e quantificar possíveis vacúolos autofágicos conforme sugerido na Figura 6-B e D, as células L1210 foram coradas com laranja de acridina.

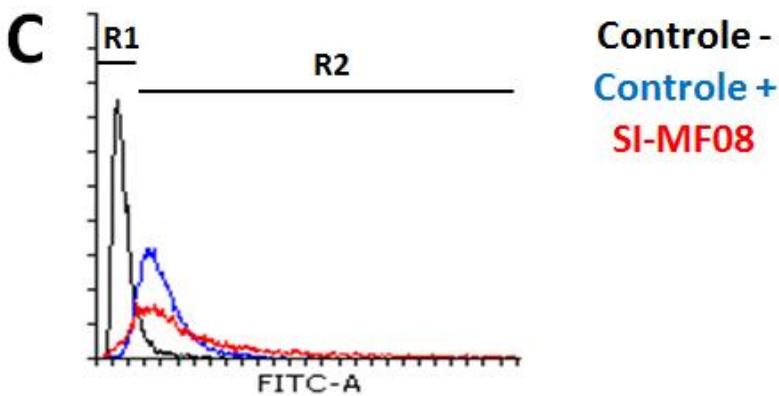
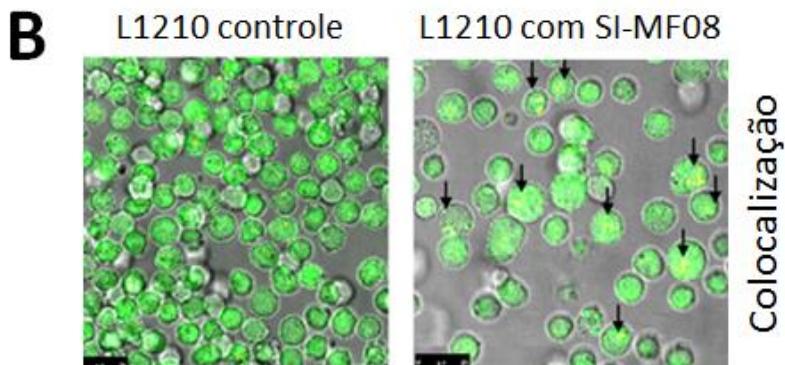
O marcador fluorescente laranja de acridina é uma substância lipofílica sem carga que age como uma base fraca e penetra as membranas biológicas da célula, espalhando-se pelo citoplasma e núcleo, emitindo fluorescência verde. Na presença de compartimentos ácidos, o corante se acumula no interior dessas vesículas em sua forma protonada formando agregados que emitem fluorescência vermelha. A intensidade da fluorescência vermelha é proporcional ao grau de acidez, permitindo que tanto o número de células autofágicas quanto a intensidade de autofagia, inferida pela avaliação da quantidade de compartimentos celulares ácidos, possam ser avaliados (KANZAWA et al., 2004).

As Figuras 10-A e B apresentam as micrografias obtidas por microscópio de fluorescência confocal das células L1210 incubadas 24 horas com 3 μ M de SI-MF08 e células controle (sem SI-MF08) para comparação da quantidade de vesículas ácidas. Imagens das células foram obtidas em campo claro e em campo escuro para captação de fluorescência verde e vermelha (Fig. 10-A). Por fim, a sobreposição das micrografias contendo as fluorescências verde e vermelha permitiu colocalização das vesículas no interior da célula, representado pela fluorescência amarela (Fig. 10-B).

Sendo assim, observa-se que após exposição ao SI-MF08, as células L1210 induziram o aumento da formação de vesículas ácidas no citoplasma na tentativa de reestabelecer a homeostasia celular após sofrerem um estresse oxidativo e dano às ultraestruturas.

Figura 10 – Formação de vesículas ácidas em células L1210.





	Células (%)	
	R1	R2
Control -	95	5
Control +	33	67
SI-MF08	24	76

Microscopia confocal de células L1210 marcadas com laranja de acridina após 24 horas de exposição a 3 μ M de SI-MF08 e células controle (sem exposição ao SI-MF08). Micrografias foram obtidas em campo claro e campo escuro para visualização de fluorescência verde e vermelha (A). A colocalização das vesículas ácidas no interior da célula apresenta fluorescência verde, indicada

pelas setas (B). Aquisição de células L1210 em citômetro de fluxo após marcação com LysoTracker® Green para quantificação das vesículas ácidas. Como controle positivo, células foram sonicadas com 9 pulsos de 3 segundos para indução da formação de vesículas. Como controle negativo, células foram cultivadas sem exposição ao SI-MF08. O deslocamento do histograma da região um (R1) para a região dois (R2) representa o aumento da fluorescência. A tabela representa o número de eventos quantificados em cada região (R1 e R2) (C).

Devido à ruptura das vesículas pela alta intensidade da luz de excitação os agregados de L.A. internalizados extravasaram para o citoplasma e não foi possível quantificar a fluorescência vermelha em tempo no citômetro de fluxo. Problema semelhante já foi reportado por Pierzyńska-Mach, Janowski e Dobrucki (2014) em estudo comparativo de sondas para marcação dessas vesículas, sugerindo que devido a intensidade da luz de excitação emitida sob a amostra, ocorre a ruptura da vesícula e extravasamento dos agregados de L.A.

Portanto, na tentativa de melhorar a quantificação das vesículas, uma sonda mais estável foi utilizada para quantificação por citometria de fluxo. As células foram expostas ao SI-MF08 mantendo a mesma concentração e tempo de incubação do experimento anterior. Em seguida, as células L1210 foram marcadas com LysoTracker Green® e avaliadas em citômetro de fluxo.

O histograma da Figura 10-C representa a sobreposição dos picos de fluorescência das células controle negativo, controle positivo e células expostas ao SI-MF08, seguido da tabela expressando o número de células que apresentam formação de vesículas ácidas para cada condição celular. O grupo controle negativo (células cultivadas sem exposição ao SI-MF08 ou sonicada) foi considerado como a região de fluorescência de fundo, portanto o deslocamento dos eventos da região um (R1) para a região dois (R2) nas células do grupo controle positivo e tratadas com SI-MF08 representam o aumento de fluorescência emitido pela sonda pela formação de vacúolos ácidos.

Quando expostas ao composto, as células apresentaram um deslocamento do pico de fluorescência de R1 para R2, representativo do aumento do número de vesículas marcadas. Na tabela esse efeito refletiu em um valor de 76% de células marcadas para o grupo exposto ao SI-MF08. Ainda, as células incubadas com SI-MF08 apresentaram maior número de eventos marcados com a sonda que o grupo controle positivo utilizado por Degtyarev, Reichelt e Lin (2014) no estudo de marcadores dessas vesículas ácidas, onde as células foram submetidas à sonicada para indução da formação de vesículas.

O aumento da fluorescência em ambos os experimentos sugere que o estresse oxidativo gerado pela exposição ao SI-MF08 leva à perda da função de organelas como as mitocôndrias, ativando a formação de vesículas digestivas para eliminar essa organela e tentar reestabelecer a homeostasia celular.

3.5 Ativação da cascata de caspases

Durante o processo de apoptose, uma cascata de efetores pro-apoptóticos são ativados, entre essas moléculas, as caspases encontram-se envolvidas nas vias de sinalização extrínseca e intrínseca. A avaliação da ativação das caspases, além de auxiliar na confirmação do processo de morte celular por apoptose, também indica por qual via de sinalização isso ocorre, sendo que diferentes caspases são ativadas em cada uma das vias (ASHKENAZI, 2008; CULLEN; MARTIN, 2009; ELMORE, 2007; RIEDL; SHI, 2004).

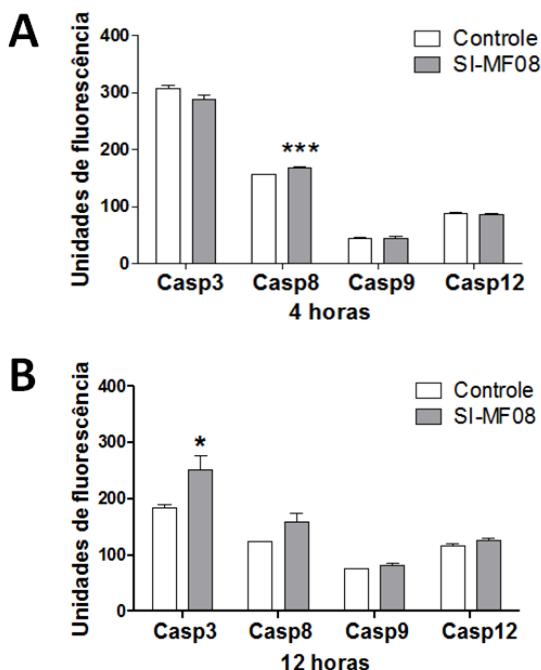
Para investigar o possível envolvimento dessas proteínas no processo de morte ativado pelo SI-MF08, substratos fluorescentes foram utilizados para quantificação das caspases -12, -9, -8 e -3 após 4 horas e 12 horas de incubação do composto com as células.

Na via extrínseca da apoptose, a ativação das caspases iniciadoras -8 e -10 ocorrem 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), a essas caspases iniciadoras. As caspases iniciadoras por sua vez ativarão as caspases executoras para culminar na morte celular (DENTON; NICOLSON; KUMAR, 2012; FERNALD; KUROKAWA, 2013; HOTCHKISS et al., 2009).

Na via intrínseca, estímulos como EROs, dano ao DNA entre outros induzem à permeabilização da membrana mitocondrial e liberação de proteínas pró-apoptóticas que ativam a caspase-9 (iniciadora). Essa por sua vez ativará as caspases efetoras -3 e -7 (DENTON; NICOLSON; KUMAR, 2012; FERNALD; KUROKAWA, 2013; HOTCHKISS et al., 2009).

A ativação da via intrínseca através da caspase-9 pode também ocorrer após a ativação da via extrínseca da apoptose, quando a ativação da caspase -8 causa perda do potencial de membrana celular, levando à liberação de fatores pró-apoptóticos que ativarão a caspase-9 (STENNICKE et al., 1998; WAJANT, 2002)

Figura 11 – Ativação de caspases em células expostas ao SI-MF08.



Células L1210 foram expostas a 3 μM do composto por 4 horas (A) e 12 horas (B) para investigar o envolvimento de caspases na cascata de sinalização de morte. Dados representam média de dois experimentos independentes \pm desvio padrão. *** $p > 0,0001$ e * $p > 0,05$

A procaspase-12 localiza-se na membrana RE e em situações prolongadas de estresse de RE pode ser ativada dando início à sinalização da via intrínseca da apoptose. Essa caspase pode também ser ativada pela translocação da caspase-7 do citoplasma para o RE, posteriormente ativando as caspases efetoras -3, -6 e -9 (FAN et al., 2005; ORRENIUS; ZHIVOTOVSKY; NICOTERA, 2003).

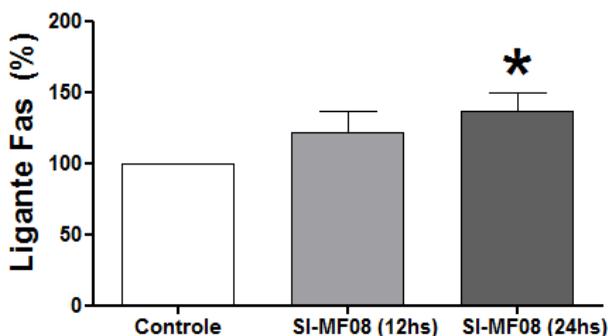
A Figura 11 apresenta o aumento dos níveis de caspase -8 após 4 horas de exposição ao SI-MF08 (Fig. 11-A), seguido da ativação da caspase-3 observada após 12 horas de exposição ao SI-MF08 (Fig. 11-B), sugerindo que a via de morte do composto seja apoptótica, por ativação da via extrínseca através de ligante de membrana. Venkatachalam e colaboradores (2007) encontraram resultados semelhantes na avaliação da morte de células de leucemia Jurkat expostas por 24 horas a moléculas do grupo das tiouréias, em que

moléculas semelhantes ao SI-MF08 levaram à ativação dessas mesmas caspases.

3.6 Ativação do receptor de membrana Fas

A iniciação da via extrínseca de sinalização da apoptose envolve a ligação ao receptor transmembrana de morte Fas, ativando a caspase-8 (caspase iniciadora) que por sua vez ativa a caspase-3 (caspase efetora de morte) (ASHKENAZI, 2008; ELMORE, 2007; STENNICKE et al., 1998). Portanto, para confirmar o envolvimento do receptor de membrana Fas no processo de morte induzido pelo SI-MF08, foi realizada a citometria de fluxo com utilização de anticorpo específico para detecção dessa proteína.

Figura 12 – Quantificação de receptores Fas em células L1210 expostas ao SI-MF08.



As células L1210 foram expostas ao SI-MF08 por 12 ou 24 horas para a quantificação de ligação anticorpo-específico com receptores de membrana Fas. Dados representam média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. * $p > 0,03$

A Figura 12 apresenta um sutil aumento na detecção da proteína receptora de membrana Fas após 12 horas de exposição a 3 μ M do composto e num segundo momento o aumento de torna mais significativo, quando as células foram expostas por 24 horas ao composto.

Sabendo que a ativação das caspases -8 e -3 sucede ao reconhecimento do composto pela proteína transmembrana e essa porém só foi detectada após 24 horas incubadas com o composto, enquanto que as caspases já puderam ser detectadas em apenas 4 horas de incubação,

sugere-se que a diferença de detecção das proteínas pode ser referente à diferença de sensibilidade das metodologias empregadas para desenvolvimento desse estudo.

3.7 Quantificação de proteínas efectoras de apoptose Bcl-2 e Bcl-x_L

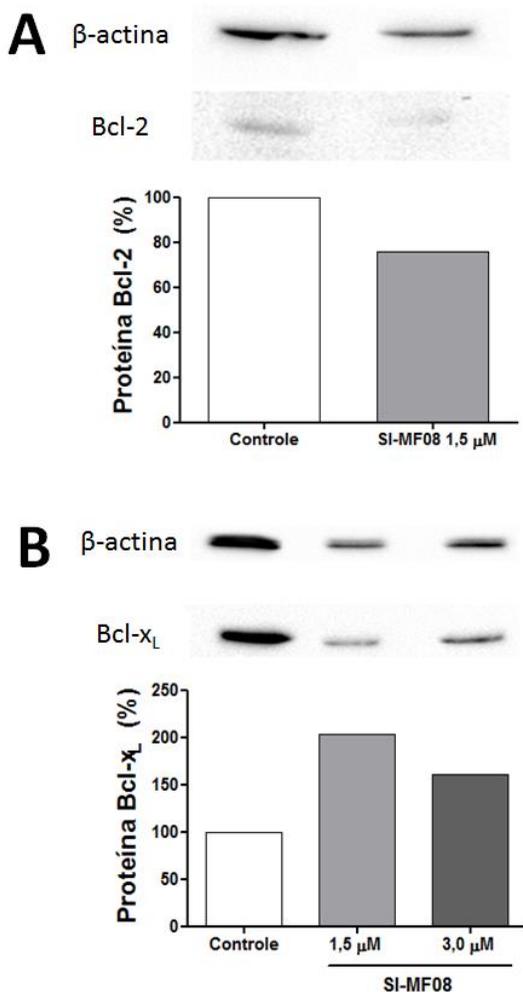
A família das proteínas Bcl-2 possuem um importante papel na regulação do processo apoptótico, atuando como efetores ou inibidores de ativação da apoptose. A molécula Bcl-2 é uma proteína transmembrana localizada majoritariamente na mitocôndria que inibe o processo apoptótico, mantendo o potencial de membrana mitocondrial estabelecido e evitando assim a liberação de moléculas efectoras do interior da organela (GROSS; MCDONNELL; KORSMEYER, 1999; JANUMYAN, 2003; TSUJIMOTO, 1998; YIP; REED, 2008). Ainda, estudos atuais sugerem que tanto a proteína Bcl-2 quanto a proteína Bcl-x_L regulam também o processo autofágico, ligando-se e inibindo a ação da proteína pró-autofágica Beclina-1, que atua na formação da membrana do vacúolo (DJAVAHERI-MERGNY; MAIURI; KROEMER, 2010; GLICK; BARTH; MACLEOD, 2010; KROEMER; MARÍÑO; LEVINE, 2010; PATTINGRE; LEVINE, 2006; SAEKI et al., 2000).

Portanto, para investigar a possível inibição da atividade da proteína Bcl-2 no processo de morte do SI-MF08, as células L1210 foram expostas por 48 horas a 1,5 µM do composto e posterior avaliação de ligação anticorpo específico. Os resultados encontrados demonstram uma diminuição na quantidade de Bcl-2 em células incubadas com o composto, que pode ser relacionada à perda de potencial de membrana mitocondrial previamente descrita e consequente ativação da apoptose (Fig. 13-A). Essa redução na quantidade de Bcl-2 também pode explicar a suspeita de ativação do processo autofágico observado pela formação das vesículas ácidas.

Em seguida foi realizada também a quantificação da proteína Bcl-x_L após as células serem expostas ao composto. Da mesma forma que a Bcl-2, essa molécula encontra-se majoritariamente na membrana mitocondrial, além de encontrar-se nas membranas do Re e núcleo, estando envolvida também tanto na inibição da apoptose quanto da autofagia (BOISE et al., 1993; TSUJIMOTO, 1998; VANDER HEIDEN et al., 1997; VOGLER et al., 2011). Curiosamente, os dados apresentados na Figura 13-B apresentaram um aumento da quantidade

de Bcl-x_L quando comparada ao grupo controle em ambas concentrações de SI-MF08 utilizadas nas células (1,5 μ M e 3,0 μ M).

Figura 13 – Proteínas relacionadas a apoptose e autofagia envolvidas na morte de células L1210 expostas ao SI-MF08.



Células L1210 expostas por 48 horas à 1,5 μ M e 3,0 μ M de SI-MF08 para quantificação das proteínas Bcl-2 (A) e Bcl-x_L (B).

Estudos recentes referem que a co-expressão da proteína efetora de apoptose Bak e a proteína inibidora Bcl-x_L induzem o aumento das cisternas do RE (CHEN et al., 2008; KLEE; PIMENTEL-MUIÑOS, 2005; SZEGEZDI et al., 2009; URRÁ; HETZ, 2012). Essa talvez seja a explicação necessária para compreender o motivo do aumento de uma proteína anti-apotótica, uma vez que o aumento das cisternas do RE visualizadas na micrografia da Figura 6-F poderia portanto justificar o aumento de Bcl-x_L.

Ainda, como o aumento da expressão de Bcl-2 e Bcl-x_L não é capaz de inibir a ativação da apoptose via receptor Fas (HUANG et al., 1999; WALCZAK; KRAMMER, 2000), o aumento de Bcl-x_L causado pelo composto não interfere na ativação da morte celular, mas induz ao aumento das cisternas do RE com extravasamento de moléculas efetoras da apoptose.

Na tentativa de melhor compreender o mecanismo de ação do Taxol®, Chen e colaboradores (2008) observaram que o fármaco causa vacuolização citoplasmática através do aumento das cisternas do RE e perda do PMM com consequente aumento da organela, independente de ativação das caspase. Os autores ainda sugerem que a vacuolização causada por altas doses de Taxol® pode ser decorrente da interação entre as moléculas Bcl-x_L e Bak, em que o aumento da Bcl-x_L ativaria a proteína Bak e levaria à vacuolização do RE seguido de morte independente da ativação de caspases.

Esses dados sugerem que os resultados obtidos com o SI-MF08 também possam significar vacuolização do RE. Contudo, as células expostas ao composto também apresentaram marcação com LysoTracker® Green que indicam a presença de vesículas ácidas, diferindo da ativação de vacuolização do RE (RAM; RAMAKRISHNA, 2014), bem como ativação das caspases -3 e -8 via receptor Fas.

A redução de proteína Bcl-2 e o desequilíbrio do metabolismo mitocondrial nas células expostas ao SI-MF08 sugerem que os níveis de caspase-8 não sejam suficientes para ativar diretamente a caspase-3, mas que a caspase-8 poderia ativar a proteína pró-apoptótica Bid, que normalmente estaria bloqueada pela Bcl-2, e a Bid ativada levaria à perda do potencial de membrana mitocondrial, causando a liberação de proteínas pró-apoptóticas do interior da mitocôndria que ativariam a caspase-3, culminando na morte celular por apoptose (ASHKENAZI, 2008; LI et al., 1998; SAYERS, 2011; WAJANT, 2002; WANG; YOULE, 2009; YOULE; STRASSER, 2008).

Além disso, estudos recentes relacionam que o atraso ou bloqueio do processo mitótico leva à morte celular por apoptose através da

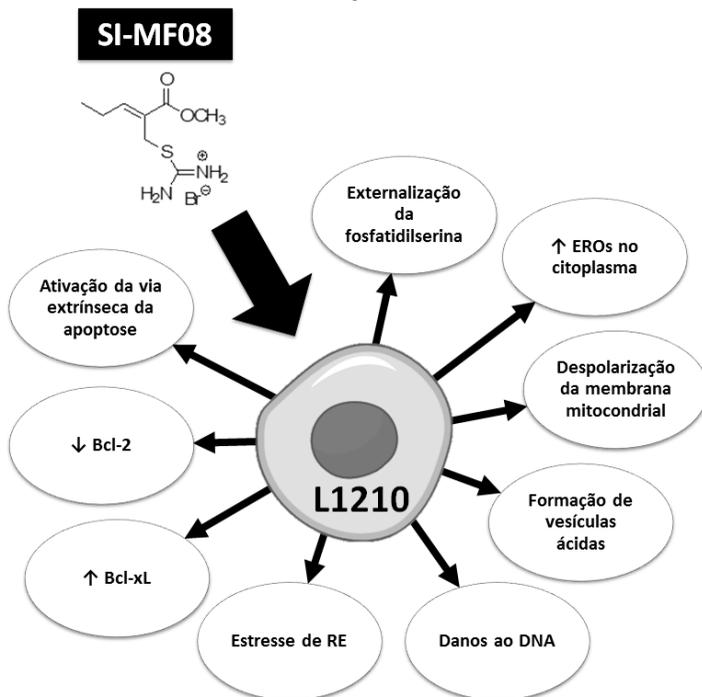
ativação de caspase-8 (CLARKE; ALLAN, 2009; COLIN et al., 2015; ORTH et al., 2012; SILVA et al., 2015), o que pode explicar o bloqueio de G2/M observado nas células após exposição ao SI-MF08 (ASSUNÇÃO, 2013; FERREIRA et al., 2017).

Apesar de amplamente empregado com quimioterápico em diversos tipos de câncer, a via de ação do Taxol® ainda não está completamente elucidada e por isso, em busca de mais respostas para o mecanismo de ação do fármaco, Guo e colaboradores (2010) afirmam em trabalho mais recente que o Taxol® pode ativar mais de uma via de morte. De forma semelhante, essa poderia ser uma alternativa para explicar as diferentes sinalizações de morte encontradas nas células tumorais expostas ao SI-MF08.

Uma possibilidade para as diferentes sinalizações encontradas seria de que o composto pode ativar mais de uma via de morte, semelhante ao que sugerem Guo e colaboradores (GUO et al., 2010) em trabalho mais recente do grupo sobre o mecanismo de morte envolvido no uso do Taxol®.

Por fim, a partir dos resultados obtidos nesse capítulo, foi criado um esquema que resume os efeitos do SI-MF08 na linhagem celular L1210, conforme apresentado na Figura 14.

Figura 14 - Efeito do SI-MF08 em linhagem celular L1210



A exposição de $3\mu\text{M}$ do SI-MF08 (IC_{50}) em linhagem celular de leucemia L1210 leva ao estresse oxidativo, com aumento de EROs no citoplasma celular, despolarização da membrana mitocondrial e estresse de retículo endoplasmático. O estresse oxidativo causa dano a elementos celulares, levando à perda de funcionalidade de organelas que são degradadas através da formação de vesículas ácidas. O composto também leva à ativação da via extrínseca da apoptose via receptor de membrana Fas e ativação das caspases -8 e -3, externalização da fosfatidilserina e dano ao DNA.

4 Conclusão

O SI-MF08 apresentou promissora atividade citotóxica ($\text{IC}_{50} = 3\mu\text{M}$) e seletividade ($\text{IS} = 24$) em estudo *in vitro* com células de leucemia. Como parte do mecanismo de ação, o composto induz ao aumento da geração de EROs, causando estresse oxidativo e dano às organelas, que são degradadas em vesículas ácidas. Essa formação de vesículas apresenta-se de maneira intensa, causando expressivo dano ao citoplasma celular. A presença de EROs no citoplasma celular parece ser também responsável pelo dano ao DNA que leva a um bloqueio

mitótico irreversível e morte da célula. Por fim, como parte do mecanismo de citotoxicidade do composto, ocorre ativação da via extrínseca da apoptose, com envolvimento do receptor de membrana Fas, redução da proteína anti-apoptótica Bcl-2 e ativação das caspases -8 e -3 (Fig. 14). Portanto, os diferentes mecanismos envolvidos no processo de morte celular pela exposição ao SI-MF08 fazem do mesmo uma molécula interessante na busca por novos compostos que possam impedir a resistência ao quimioterápico adquirida pelas células tumorais.

**CAPÍTULO 2. ATIVIDADE
ANTITUMORAL DO SI-
MF08 EM CÉLULAS DE
MELANOMA B16F10**

1 Introdução

A maioria dos quimioterápicos registrados e clinicamente utilizados são fármacos clássicos que atuam como citotóxicos preferencialmente em células tumorais, empregando como método de seleção a preferência dessas moléculas em eliminar as células tumorais (morte celular) ou reduzir a multiplicação celular (bloqueio mitótico), uma vez que apresentam alta taxa de proliferação (BAGULEY, 2002).

Instituições públicas, indústria farmacêutica e companhias de biotecnologia criam milhares de compostos com potencial atividade antitumoral, mas apenas uma pequena parcela de quimioterápicos chegam a ser avaliados clinicamente devido aos custos e considerações éticas. Portanto, faz-se importante o uso de estudos de triagem para pré-seleção de compostos que apresentem real potencial na prospecção por novos fármacos (BURGER; FIEBIG, 2004).

Os resultados previamente apresentados no Capítulo 1 deste trabalho indicam que em estudo *in vitro* com células de leucemia o SI-MF08 demonstrou, entre os diversos sais de isotiourônio previamente estudados (FERREIRA et al., 2017), interessante potencial antitumoral com ativação de diferentes mecanismos de morte celular. Esta ação multi-alvos pode vir a ser uma vantagem ao futuro fármaco no sentido de contornar a resistência ao tratamento desenvolvida por células tumorais. Para continuidade dos estudos de atividade do composto faz-se necessária a avaliação da atividade antitumoral em modelo *in vivo*.

O melanoma é um tipo de câncer extremamente agressivo, com alto poder metastático e notória resistência a agentes citotóxicos. Isso ocorre porque os melanócitos são oriundos de células com alta motilidade, que apresentam proeminentes propriedades de sobrevivência. Além disso, as células do melanoma apresentam baixo índice de apoptose espontânea comparada a outros tipos de células neoplásicas, conferindo resistência à fármacos indutores de apoptose em testes *in vitro* (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007). Portanto, para esse estudo optou-se pelo modelo de melanoma subcutâneo em camundongo, um modelo tumoral bem estabelecido e extremamente agressivo (BERKELHAMMER et al., 1982; KRUCZYNSKI; HILL, 2002; OVERWIJK; RESTIFO, 2001a; PLOWMAN et al., 1997).

Deste modo, inicialmente foi realizado uma rápida avaliação *in vitro* da atividade do SI-MF08 na linhagem celular tumoral que seria posteriormente aplicada no modelo *in vivo* pretendido. Os resultados

apresentados nesse capítulo referem-se à atividade do SI-MF08 em cultura celular de melanoma B16F10.

2 Materiais e Métodos

2.1 Reagentes

Os reagentes foram obtidos das empresas previamente citadas no capítulo 1, item 2.2. A anexina-V-FITC foi adquirida pela Millipore (Billerica, MA, EUA).

2.2 Cultura celular

A cultura das células de melanoma murino B16F10 foram cultivadas como previamente descrito no item 2.3 do capítulo 1 em meio de cultura DMEM.

2.3 Tratamento Celular

O tratamento celular foi realizado conforme previamente descrito no item 2.4 do capítulo 1.

2.4 Ensaio de Viabilidade Celular – MTT

A viabilidade das células B16F10 foi realizada através do método de MTT conforme descrito no item 2.5 do capítulo 1.

2.5 Cálculo do índice de seletividade

O índice de seletividade (IS) do composto nas células B16F10 foi definido conforme fórmula apresentada no item 2.6 do capítulo 1.

2.6 Avaliação da dispersão das células no ciclo celular por citometria de fluxo

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 ($2,5 \times 10^5$ / poço) B16F10 foram tratadas com as concentrações crescentes de 3,5 – 7,0 – 17,0 – 24,0 – 35,0 μ M de SI-MF08 em meio de cultura em

placa de 12 poços por 24 h. Após este período de incubação, as células foram tripsinizadas, centrifugadas e lavadas com PBS 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, adicionou-se PBS + BSA a 2 % seguido de centrifugação para inibir possíveis ligações inespecíficas com o iodeto de propídeo. O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspendidas em PBS contendo 0,1 % Triton X-100[®] + RNase 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para permeabilização da membrana celular e degradação do RNA, afim de evitar que o iodeto de propídeo se intercale ao ácido nucleico. Em seguida, as células foram marcadas com iodeto de propídeo (1 mg/mL) e a análise do conteúdo de DNA foi realizada por citometria de fluxo (FACS CANTO II, BD Biosciences). A população de células em cada fase do ciclo celular foi determinada usando Flowing Software 2.5.1 e a análise estatística dos dados foi feita com a utilização do programa GraphPad Prisma 5.

2.7 Investigação do tipo de morte celular por citometria de fluxo

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 (BEVERIS, et al. 1999). A anexina V é uma proteína que se liga fortemente aos fosfolipídeos de membrana, e tem alta afinidade pela fosfatidilserina, que se encontra externalizada no processo apoptótico. Quando acoplada ao fluoróforo 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. Neste contexto, as células ($2,5 \times 10^5$ células/ poço) foram incubadas por 24h em meio contendo SI-MF8 nas concentrações de 3,5

– 7,0 – 17,0 – 24,5 – 35,0 μM . Posteriormente, as células foram tripsinizadas, centrifugadas a 400 x g por 10 minutos e lavadas duas vezes com 1mL de PBS gelado. O PBS foi removido, as células foram ressuspensas em 250 μL de tampão de ligação 1 \times (Millipore) e marcadas por 15 min a 4° C com anexina V-FITC e em seguida o iodeto de propídeo foi adicionado para subsequente 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 Flowing Software 2.5.1 e a análise estatística dos dados foi feita com a utilização do programa GraphPad Prisma 5.

2.8 Avaliação morfológica por microscopia eletrônica de transmissão

As células B16F10 foram previamente plaqueadas (5×10^5 /poço) em placa de 6 poços e esperado um período de pelo menos 12 horas para sua completa aderência. Após aderência as células foram expostas à metade da IC₅₀ do SI-F08 (16,0 μM) por 24 horas. Em seguida, o meio foi removido, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e centrifugadas. Após centrifugação, as células foram lavadas com PBS e processadas conforme previamente descrito no item 2.7 do capítulo 1.

2.9 Análise estatística

Os resultados das análises foram expressos como média \pm EPM de três experimentos independentes e análise estatística foi realizada com o programa GraphPad Prisma 5 utilizando teste T de Student e valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3 Resultados e Discussão

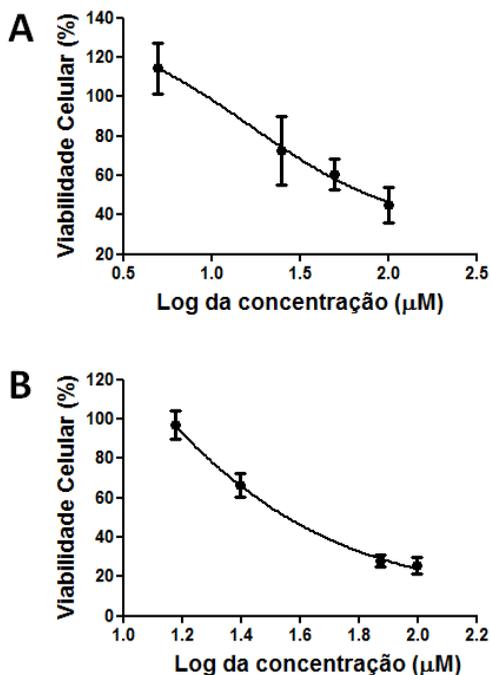
3.1 Citotoxicidade e seletividade do SI- MF08 em linhagem celular de fibroblasto e melanoma murino

O envolvimento de diferentes mecanismos que levam à morte celular, bem como a seletividade do composto para a célula tumoral, tornam o SI-MF08 um interessante candidato para continuidade dos estudos de atividade tumoral. No intuito da continuidade dos estudos com o composto e, visando a aplicação de um modelo *in vivo* de tumor

de melanoma com células, a citotoxicidade foi também testada *in vitro* nessas células.

Neste sentido, realizou-se o estudo da atividade antitumoral do SI-MF08 em linhagem de melanoma murino B16F10, para futuramente ser aplicado o modelo *in vivo* de atividade antitumoral com inoculação de células B16F10 em camundongos C57BL/6J. Para isso, doses crescentes do composto (5 μ M a 100 μ M) foram adicionadas à cultura celular de melanoma murino B16F10 por um período de 24 horas para avaliação da citotoxicidade do composto e determinação da IC₅₀ (concentração que inibe 50% a atividade das desidrogenases mitocondriais) através do método de MTT (MOSMANN, 1983). Da mesma forma, células de fibroblasto murino NIH-3T3 foram expostas ao SI-MF08 nas mesmas condições para avaliação da seletividade do composto.

Figura 15 - Curva dose- resposta da atividade citotóxica do SI-MF08.



A citotoxicidade do composto foi avaliada através do método de MTT, após as células serem expostas por 24 horas a concentrações crescentes de SI-MF08 em fibroblasto murino NIH-3T3(A) e células de melanoma murino B16F10 (B).

Valores expressos em média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

Através da interpolação das concentrações utilizadas com a resposta da atividade das desidrogenases mitocondriais, foi possível determinar através do programa estatístico GraphPad Prisma 5 uma IC_{50} de 71 μM e 35 μM de SI-MF08 nas linhagens celulares NIH-3T3 e B16F10, respectivamente (Fig. 15).

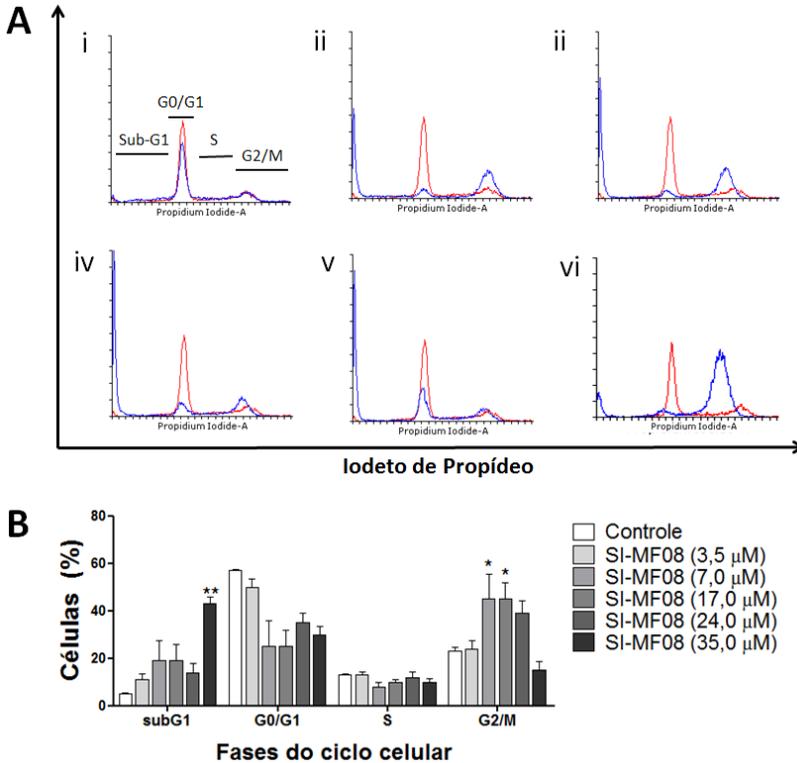
Ainda, a razão entre a IC_{50} da linhagem não tumoral e a IC_{50} da linhagem tumoral nos permitiu determinar que índice de seletividade (1) do composto para as células de melanoma é de 2,0. Um índice de seletividade maior que 1,0 significa que a toxicidade do composto nas células tumorais se sobrepõe à citotoxicidade apresentada em células não tumorais (CALLACONDO-RIVA et al., 2008).

3.2 Perfil de distribuição das células B16F10 no ciclo celular após tratamento com SI-MF08

Em seguida, o DNA das células B16F10 foi marcado com iodeto de propídeo e através da citometria de fluxo foi possível observar a distribuição celular nas diferentes fases do ciclo de replicação através da quantidade de material genético em cada uma das células.

O processo de divisão celular é controlado por pontos de checagem que tem o papel de identificar falhas no material genético replicado ou no número de cromossomos da célula. Esses pontos de checagem encontram-se na transição de fase G1/S, em que as células organizam-se para iniciar a síntese de DNA; na transição das fases G2/M, em que já ocorreu a replicação de DNA e a célula prepara-se para a divisão de célula-mãe em duas células-filhas; e durante a fase M (mitose) entre a metáfase e anáfase, para certificar-se de que o fuso mitótico foi criado corretamente e os cromossomos replicados foram divididos de maneira correta entre as duas células-filhas. Quando identificado algum defeito, ocorre a sinalização para que o processo de replicação seja interrompido até que o problema seja corrigido. Em caso de danos extensos, a divisão celular é interrompida e a célula entra em processo de morte (HARTWELL; WEINERT, 1989; KING; CIDLOWSKI, 1995; MURRAY, 1994; PIETENPOL; STEWART, 2002; RUSSELL, 1998; VERMEULEN, K., VAN BOCKSTAELE, D.R., BERNEMAN et al., 2003)

Figura 16 – Ciclo celular de células B16F10 expostas ao SI-MF08.



Histogramas representativo da quantificação do DNA de células B16F10 marcados com iodeto de propídeo para avaliação da dispersão celular nas diferentes fases do ciclo de replicação. Células B16F10 foram tratadas com 3,5 μM (i) 7,0 μM (ii) 17,0 μM (iii) 24,0 μM (iv) e 35 μM (v) de SI-MF08 respectivamente (histograma em azul) e comparadas ao grupo controle (células sem tratamento, histograma vermelho) para avaliação das diferenças nas fases do ciclo celular. Como controle positivo foi utilizado 0,1 μM de paclitaxel (vi) (A). Quantificação do material genético nas fases do ciclo celular de células B16F10 expostas a diferentes concentrações de SI-MF08 (B). G0/G1, S e G2/M representam as fases do ciclo celular e sub-G1 correspondem à fragmentação do DNA. Dados representam médias \pm desvio padrão de três experimentos independentes. * $p > 0,05$, ** $p > 0,01$

Na Figura 16 observamos a sobreposição da dispersão celular do grupo controle (vermelho) com os grupos tratados com as diferentes concentrações de SI-MF08 (azul). Como controle positivo foi utilizado paclitaxel, um agente antitumoral amplamente utilizado em tumores

sólidos que apresenta como parte do mecanismo de ação o bloqueio do ciclo celular na transição de fase G2/M (BLAGOSKLONNY; FOJO, 1999; GUO et al., 2010; WAHL et al., 1996; WANG; WANG; SOONG, 2000).

A concentração de 3,5 μM (Fig. 16-Ai) mostra apenas um leve aumento no número de eventos em sub-G1 (14%), respectivo às células com DNA fragmentado, porém a partir da concentração de 7,0 μM (Fig. 15-Aii) foi possível observar que o composto agiu de forma semelhante aos resultados previamente encontrados em linhagem de leucemia (ASSUNÇÃO, 2013), causando um bloqueio na transição de fase G2/M em 45% das células.

Esse efeito persistiu com o aumento das concentrações, como podemos perceber nas Figuras 16- Aiii e Aiv, com o acúmulo de eventos na fase G2/M (45% e 35%, respectivamente - Fig. 16-B), seguido de morte, representada pelo aumento do número de eventos em sub-G1. Observa-se ainda que conforme o número de eventos em G2/M diminui nas maiores concentrações, o número de eventos em sub-G1 aumenta, chegando a 40% da população total na maior concentração utilizada (Fig. 16-Avi e 16-B) Esses dados indicam que o composto cause um bloqueio mitótico irreversível, levando à morte da célula. Resultados semelhantes já haviam sido observados em linhagem celular de leucemia (Fig.7-B).

3.3 Avaliação do perfil de morte celular de células B16F10 expostas ao SI-MF08

Para avaliar o perfil de morte celular, foi feita a aquisição das células marcadas com anexina V-FITC e iodeto de propídeo por citometria de fluxo. A Figura 17 apresenta a dispersão das células no gráfico representativas do grupo controle (Fig. 17-A) e tratadas com 3,5 – 7,0 – 17,0 -24,0 -35,0 μM de SI-MF08 (Fig. 17-B a E).

A tabela 1 apresenta a porcentagem de células marcadas em cada um dos quadrantes da Figura 17. Observa-se que a concentração de 35 μM matou cerca de 50% das células de melanoma, nos permitindo correlacionar diretamente a atividade das desidrogenases mitocondriais com o potencial de morte causado pelo SI-MF08.

Figura 17 – Avaliação da morte de células B16F10 tratadas com SI-MF08.

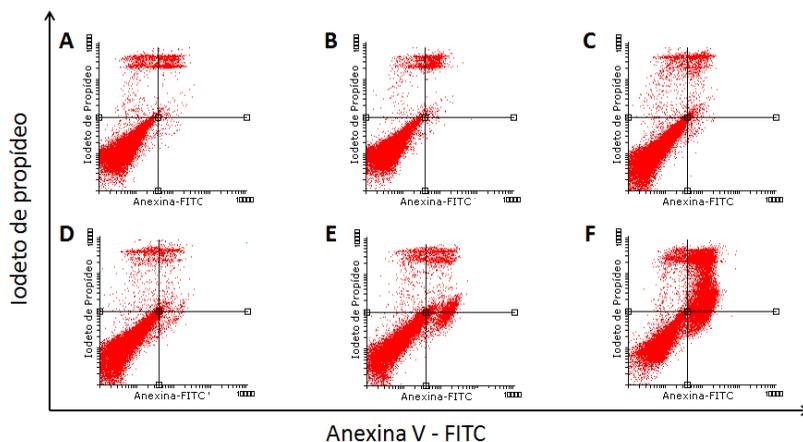


Tabela 1 – Viabilidade das células B16F10 expostas ao SI-MF08 e marcadas com anexina-V-FITC e iodeto de propídeo.

Gráfico		Células (%)			
		An-/PI-	An+/PI-	An-/PI+	An+/PI+
A	Controle ^a	94	0	3	3
B	3,5 μM ^b	95	0	2	3
C	7,0 μM ^b	93	0	3	4
D	17,0 μM ^b	94	1	3	2
E	24,0 μM ^b	87	4	3	6
F	35,0 μM ^b	49	12	5	34

Gráficos de pontos representando células B16F10 (A) sem tratamento (controle), (B) tratadas com 3,5 μM de SI-MF08, (C) 7,0 μM de SI-MF08, (D) 17,0 μM de SI-MF08, (E) 24,0 μM de SI-MF08 e (F) 35,0 μM de SI-MF08. Quadrante inferior esquerdo = células viáveis, quadrante inferior direito = células em apoptose, quadrante superior direito = células em apoptose tardia / necrose, quadrante superior esquerdo = células em necrose.

^a Células B16F10 sem exposição ao SI-MF08

^b Concentração de SI-MF08

A fosfatidilserina é uma proteína de membrana que na fase inicial da apoptose transloca-se do lado interno da membrana extracelular para a superfície externa da mesma (BEVERIS, et al. 1999). A anexina V é uma proteína com alta afinidade pela fosfatidilserina, ligando-se à mesma. A porção FITC da sonda apresenta propriedade fluorescente que pode ser quantificada pelo citômetro de fluxo. O iodeto de propídeo é uma molécula intercalante de DNA que devido ao seu tamanho não penetra livremente a membrana extracelular, porém em casos de perda da integridade dessa membrana, como na necrose ou apoptose tardia, esse corante liga-se ao DNA da célula e emite fluorescência que pode ser quantificada.

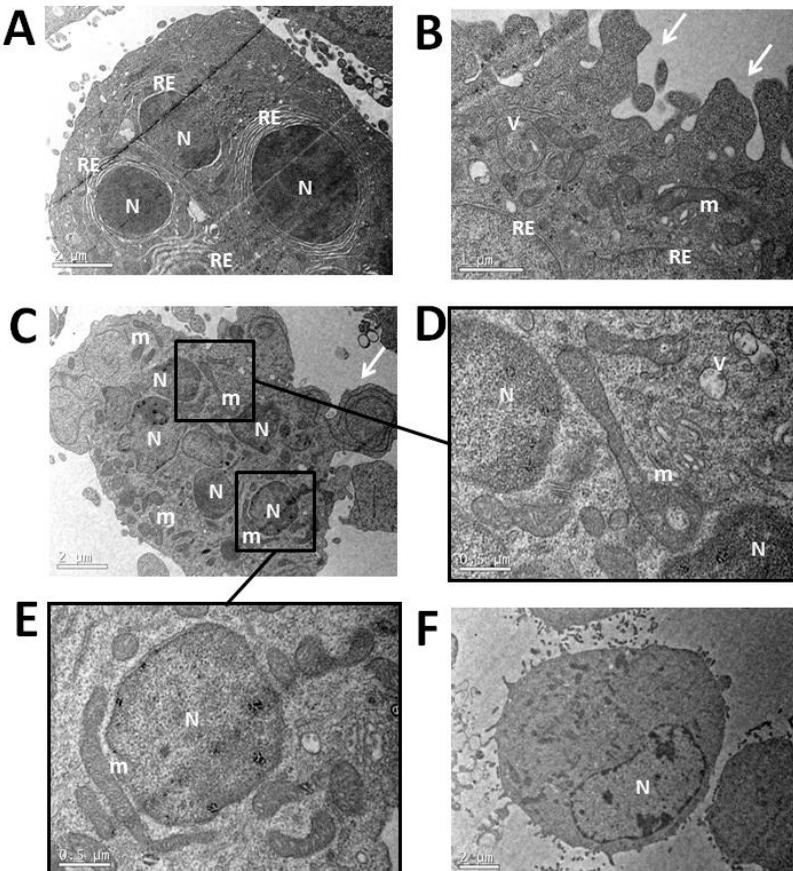
Do total de células B16F10 tratadas com a IC_{50} do SI-MF08 (35,0 μ M), 12% dos eventos foram marcados apenas com anexina V-FITC, seguido de uma maioria das células marcadas por anexina V-FITC e iodeto de propídeo (34%), o que nos leva a acreditar que o composto possa induzir majoritariamente à apoptose tardia, o que explicaria a penetração do iodeto de propídeo. Os demais experimentos com concentrações menores do SI-MF08 (Fig 17-B a E) apresentaram pouca ou nenhuma morte celular, quando comparadas ao grupo controle (sem tratamento) (Fig 17-A). Correlacionando com os resultados obtidos na avaliação do ciclo celular frente às mesmas concentrações, pode-se dizer que as concentrações inferiores à 35 μ M que foram usadas em ambos experimentos são capazes de atuar interferindo na progressão da divisão celular, mas não são suficientes para levar à uma morte de valores expressivos em um período de 24 horas de exposição.

Quando comparamos a porcentagem de células em sub-G1 do ciclo celular em concentrações inferiores a 35 μ M (IC_{50}) expressa na Figura 16-B com os resultados da porção de células mortas apresentadas na Tabela 1 nas mesmas concentrações (3,5 μ M – 17 μ M), observamos uma expressiva diferença de valores entre os experimentos. Por exemplo, observamos cerca de 20% de morte na Figura 16-B quando as células foram tratadas com a 7,0 μ M de SI-MF08, já na Tabela 1 essa mesma concentração causou 7% de morte nas células. Isso pode ser explicado possivelmente pela diferença de processamento das amostras, de qualquer forma em ambas as técnicas as concentrações inferiores à IC_{50} não induziram valores significativos de morte celular.

3.4 Alterações em micro e macroestruturas causadas pelo SI-MF08 em células B16F10

Para avaliação das alterações morfológicas em micro e macroestruturas das células B16F10 expostas ao composto, foram realizadas micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão após 24 horas de incubação com metade da IC_{50} de SI-MF08 (17,5 μ M) (Fig. 18-A a E). Células sem exposição ao SI-MF08 foram processadas para comparação das alterações ultraestruturais (Fig; 18-F).

Figura 18 – Micrografias de células B16F10 expostas ao SI-MF08.



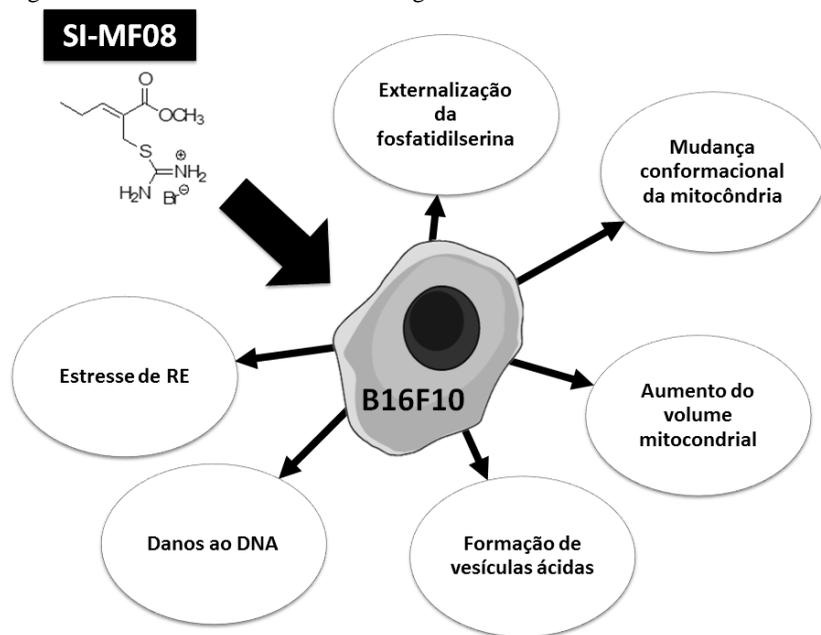
Células B16F10 foram expostas a 17,5 μ M do composto por 24 horas para avaliação de alterações morfológicas de macro e microestruturas celulares por microscopia eletrônica de transmissão. V = vacúolos autofágicos, RE = retículo endoplasmático, N = núcleo, m = mitocôndrias, setas = prolongamentos citoplasmáticos.

Na Figura 18-A é possível observar um significativo aumento das cisternas do retículo endoplasmático das células expostas ao SI-MF08. Além disso, o composto também causou fragmentação nuclear com condensação da cromatina (Fig. 18 - A e C), mudança conformacional da mitocôndria (Fig. 18 - B e E), bem como a formação de vacúolos sugestivos de autofagia para degradação de organelas disfuncionais e formação de prolongamentos citoplasmáticos característicos da formação de corpos apoptóticos (Fig. 18 - B e C).

Estes resultados corroboram as alterações previamente encontradas em células L1210 (Fig. 6), sugerindo que o composto cause nessas células estresse do RE e mitocôndria, levando à perda de função das organelas e assim ativando um processo de eliminação das mesmas através da formação de vacúolos sugestivos de um processo autofágico. Ainda, devido ao extenso dano celular, o composto ativou nas células um processo apoptótico identificado pela fragmentação nuclear com condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos.

Para compilação dos resultados encontrados nesse capítulo quanto ao efeito do SI-MF08 em linhagem celular de melanoma foi criado um esquema que se encontra representado na Figura 19 a seguir.

Figura 19 - Efeito do SI-MF08 em linhagem celular B16F10



A exposição de 35 μM do SI-MF08 (IC_{50}) em linhagem celular de melanoma B16F10 causa estresse de retículo endoplasmático e mudanças conformacionais na mitocôndria, sugerindo um estresse oxidativo ocorrendo a perda de funcionalidade de organelas que são degradadas através da formação de vesículas ácidas. O composto também leva à externalização da fosfatidilserina e dano ao DNA que sugerem ativação da via de morte da apoptose.

4 Conclusão

O efeito do sal de isotiourônio SI-MF08 em células de melanoma murino B16F10 se mostrou semelhante ao que foi previamente encontrado em células de leucemia L1210. O composto apresentou seletividade para a linhagem de melanoma, com IC_{50} de 35 μM . Como mecanismo de ação, o composto induz bloqueio em G2/M em concentrações inferiores à IC_{50} e fragmentação de DNA. Ainda, as células expostas ao SI-MF08 apresentaram aumento das cisternas do RE e mudanças na morfologia das mitocôndrias que sugerem estresse oxidativo, resultando na formação de vacúolos. Portanto, os dados apresentados nesse capítulo sugerem que o mecanismo de ação do SI-

MF08 é semelhante tanto para linhagem celular de melanoma, quanto para linhagem celular de leucemia.

**CAPÍTULO 3. ESTUDOS PRÉ-
CLÍNICOS DE TOXICIDADE
DO SI-MF08 EM MODELO
MURINO**

1 Introdução

Os estudos de toxicidade podem ser aplicados para determinar o mecanismo e grau de toxicidade de um agente químico e como esse pode causar efeito em humanos, animais ou meio ambiente. Estes testes incluem a investigação de efeitos adversos após exposição à uma única dose (toxicidade aguda) e à uma exposição contínua (doses repetidas), sendo também aplicados para avaliação de segurança no estudo de novos fármacos (NUFFIELD COUNCIL OF BIOETHICS, 2015; PARASURAMAN, 2011; TAMBA et al., 2013).

Na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, os testes de toxicidade em animais devem ser comparados com os dados de eficácia obtidos também em animais, para determinar se os efeitos benéficos se sobrepõem aos riscos inferidos pelos efeitos adversos, bem como estabelecer uma dose segura para testes clínicos e definir que potenciais efeitos adversos devem ser monitorados (CDER, 1996; LASA/NC3RS, 2009; NUFFIELD COUNCIL OF BIOETHICS, 2015).

Em testes farmacêuticos, os testes de toxicidade aguda (dose única) realizados em animais determinam a natureza e duração da resposta tóxica, incluindo efeitos tardios, auxiliam na determinação da dose máxima não letal para fornecer informações que possam ser relevantes à exposição em humanos, como em caso de overdose aguda, além de auxiliar na escolha de doses para o estudo de toxicidade de doses repetidas (FDA, 2010; NUFFIELD COUNCIL OF BIOETHICS, 2015; UNDP; WORLD BANK; WHO, 2004)

Os estudos de toxicidade de doses repetidas em animais permitem identificar os efeitos atribuídos após um determinado tempo, sob contínua exposição de um agente, bem como identificar órgãos que podem ser afetados e determinar as doses em que esses efeitos ocorrem. A partir desse estudo, identifica-se a maior dose na qual o agente químico ou farmacológico não apresenta efeitos significativos e fornece resultados que auxiliam na predição da dose para testes em humanos. O número de doses administradas nos animais é definido conforme o tempo previsto para o estudo em humanos. (EMA, 2010b; FDA, 2010; NUFFIELD COUNCIL OF BIOETHICS, 2015; UNDP; WORLD BANK; WHO, 2004).

Nos capítulos anteriores desse trabalho, foram apresentados resultados promissores quanto à potencial atividade antitumoral do SI-MF08 portanto, com o objetivo de dar continuidade à avaliação do efeito terapêutico do composto, estudos pré-clínicos de toxicidade foram

realizados em camundongos C57BL/6J/Unib para avaliação dos efeitos citotóxicos dessa molécula *in vivo*.

2 Materiais e Métodos

2.1 Reagentes

Os reagentes do contador hematológico veterinário foram obtidos da Mindray (Shenzen, China). Os kits de reação para as análises bioquímicas foram adquiridos da Labtest (Vista Alegre, MG, BR). O anestésico quetamina foi obtido da Vetnil (São Paulo, SP, BR) e xilasina foi adquirido pela Realpet (Santo Antônio, SC, BR).

2.2 Aspectos Éticos

Os experimentos aqui realizados seguiram os preceitos éticos para experimentação animal, e o protocolo experimental foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFSC sob o parecer número PP00892 (Anexo A).

2.3 Animais

Para os estudos de toxicidade foram utilizados camundongos isogênicos C57BL/6J/Unib fêmeas com aproximadamente 8 - 10 semanas de idade e peso de $20\text{g} \pm 2$, obtidos no Biotério da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP (São Paulo). Os animais foram alojados em gaiolas de plástico ($15 \times 36 \times 30$ cm) forradas com serragem, substituída a cada três dias para manutenção e higiene das gaiolas. Durante o período de permanência no biotério e durante os experimentos os animais foram mantidos em gaiolas com livre acesso à água e comida, em ambiente com temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12 horas.

Os animais foram tratados intraperitonealmente (SUCKOW; DANNEMAN; BRAYTON, 2001) com doses preconizadas para estudos toxicológicos (OECD, 2001b). As amostras de sangue foram coletadas da veia facial ou através de punção cardíaca nos animais previamente anestesiados com solução de quetamina (200 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg).

2.2 Atividade hemolítica

O ensaio da atividade hemolítica foi realizado conforme descrito por Lu e colaboradores (2009) com adaptações. Amostras de sangue de animais saudáveis foram obtidas por venopunção em tubos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) sódico 300 mmol/L na proporção de 10 µL/mL sangue. Os eritrócitos foram separados por centrifugação a 1500 rpm por 30 minutos e lavados 3× com solução fisiológica. A solução de hemácias foi preparada numa concentração de 5% e um volume de 100 µL foi adicionado à placa de 96 poços com concentrações crescentes de SI-MF08 que variaram de 1 a 500 mg/kg. Como controle positivo, utilizou-se 0,1 % de Triton X-100[®] e como controle negativo foi usado 100 µL de solução fisiológica. A placa foi incubada 60 minutos em temperatura ambiente com agitação suave em agitador orbital. Após incubação, a placa foi centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos e 75 µL do sobrenadante foram transferidos para nova placa para leitura em leitor de placa de Elisa em 540nm. A absorbância da amostra com se 0,1 % de Triton X-100[®] (controle positivo) foi considerada como 100% de hemólise e a atividade hemolítica dos demais foi calculada por regra de três simples.

2.4 Preparo das injeções

O SI-MF08 foi pesado e solubilizado em solução fisiológica nas concentrações adequadas para cada experimento. As soluções foram esterilizadas através de filtração em membrana de 0,22 µm e preparadas a cada 5 dias de experimentação. O volume administrado para cada animal foi adaptado de acordo com a dose para 4 µL / g de peso animal.

2.5 Avaliação da toxicidade do SI-MF08 *in vivo*

A avaliação da toxicidade foi realizada em camundongos do gênero feminino C57BL/6J/ Unib saudáveis, sem a indução do tumor, para avaliar o potencial efeito tóxico das doses de SI-MF08, que foram administradas de acordo com protocolos de dose fixa e dose repetida (durante 10 dias) sendo os animais eutanasiados 24 horas após o final do tratamento, ou 14 dias após a última administração do tratamento (ANVISA, 2013; OECD, 2001b). Os animais do estudo de toxicidade foram divididos em dois grandes grupos:

- 1) Dose única: as doses estabelecidas para esse grupo tinham a finalidade de obtermos a dose máxima de trabalho que poderia

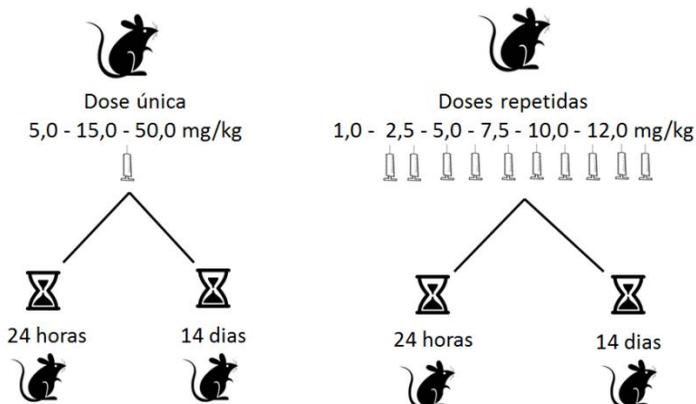
ser usada nos animais, sem causar toxicidade aguda ou mortalidade. Para isso, 3 a 7 animais por grupo receberam doses de 5 mg/kg, 15 mg/kg ou 50 mg/kg. Como grupo controle animais foram injetados com solução fisiológica. Parte dos animais foi sacrificada 24 horas após a administração das doses, para avaliação da toxicidade aguda. A segunda parte dos animais foi avaliada por 14 dias após administração das doses para observação de toxicidade tardia, ou reversão de toxicidade. Os animais foram pesados todos os dias para avaliação da variação do peso corporal.

- 2) Doses repetidas: para simular o esquema de tratamento que seria administrado nos animais com tumor, foram injetados nos animais desse grupo doses de 1,0 – 2,5 – 5,0 – 7,5 – 10,0 ou 12,0 mg/kg por um período de 10 dias. Os animais foram pesados todos os dias para avaliação da variação do peso corporal. Parte dos animais foram eutanasiados 24 horas após a última dose administrada para avaliação da toxicidade aguda e a outra parte foi eutanasiada 14 dias após a administração da última dose, a fim de avaliar possível toxicidade tardia ou reversão de toxicidade causada pelo composto.

O grupo controle foi administrado com solução fisiológica nas mesmas condições dos grupos 1 e 2.

A Figura 20 representa o esquema de administração de SI-MF08 dos grupos do estudo de dose única e doses repetidas:

Figura 20 – Esquema de administração de doses do estudo de toxicidade e parâmetros avaliados.



Para estudo de dose única, os animais receberam 1 dose de SI-MF08 nas concentrações de 5, 10, ou 50 mg/kg . Para o estudo de doses repetidas, os animais receberam doses em intervalo de 1 – 12 mg/kg de SI-MF08 durante 10 dias. Em ambos os estudos, animais foram eutanasiados 24 horas ou 14 dias após a última dose.

Os animais foram mantidos em observação para qualquer tipo de mudança sugestiva de dor ou desconforto como prostração, piloereção, perda de peso/desidratação, mudanças na pele (vermelhidão), pêlo, olhos e mucosas, no sistema motor e respiratório, além de padrões comportamentais como agressividade e isolamento do resto do grupo. Além disso, foi realizada a observação de possível surgimento de tremores, convulsões, diarreia, letargia e coma (CHORILLI, M.; MICHELIN, D.C.; SALGADO, 2007; GRIBALDO et al., 2004).

Ao final de cada período de observação (24h ou 14 dias) amostras de sangue foram coletadas para avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos.

2.6 Parâmetros hematológicos

O sangue dos animais do estudo de toxicidade foi coletado 24 horas e 14 dias após a administração das doses. A coleta foi feita pela veia facial através de punção com agulha em tubo contendo EDTA.

Para determinação dos parâmetros hematológicos, foi utilizado o analisador de hematologia veterinária BC-2800 Vet (Mindray, São Paulo, Brasil), onde foram realizadas a contagem de leucócitos totais, plaquetas e eritrócitos, além da determinação da hemoglobina e hematócrito.

2.7 Parâmetros bioquímicos

A partir do sangue coletado da veia facial dos animais e por punção cardíaca, após anestesia com quetamina (200 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg), foram obtidos o soro e plasma. O soro foi coletado em tubo seco e o plasma em tubo contendo EDTA, e ambos foram submetidos à centrifugação a 1500 rpm por 30 minutos para separação.

A partir da obtenção do soro dos animais foram realizadas as dosagens de creatinina, lactato desidrogenase (LDH), fosfatase alcalina (FAL), proteínas torais e albumina. Com o plasma dos animais foram realizadas dosagens de triglicerídeos, ureia, creatinina, bilirrubinas totais

e direta, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). A determinação dos parâmetros bioquímicos foi realizada no analisador Cobas Mira (Roche Diagnostic Systems) do Departamento de Análises Clínicas da UFSC.

2.8 Celularidade da medula

Para avaliar a celularidade da medula, as células da medula do fêmur dos animais foram coletadas para contagem total das células nucleadas. Para isso, após a eutanásia dos animais os fêmures de cada animal foram seccionados entre as articulações fêmur-ilíaca. Com o auxílio de uma agulha e seringa as cavidades femurais foram lavadas com soro fetal bovino e as células coletadas e centrifugadas. O sobrenadante foi descartado, as células foram novamente ressuspensas em soro fetal bovino e diluídas em solução de Turk para contagem em câmara de Neubauer.

2.8 Análise estatística

Os foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de comparação múltipla de Dunnet para comparação do grupo controle com grupos tratados utilizando o programa GraphPad Prisma 5. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3 Resultados e Discussão

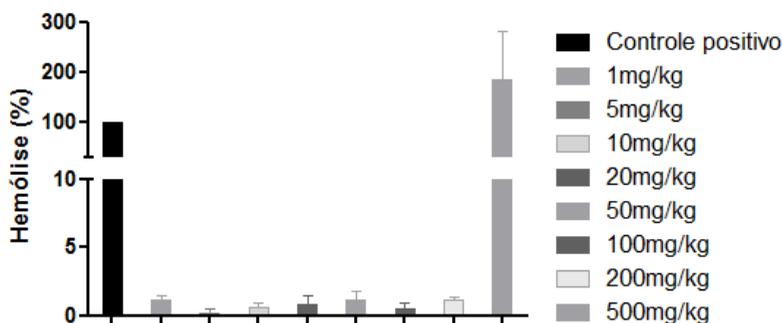
3.1 Hemocompatibilidade do SI-MF08

Soluções administradas por vias parenterais como a intraperitoneal precisam apresentar biocompatibilidade com os tecidos envolvidos para que o composto não cause toxicidade ao indivíduo. A hemólise é um efeito comum em soluções que não apresentam biocompatibilidade e a lise dos eritrócitos do sangue resulta na liberação de hemoglobina, podendo causar irritação vascular, anemia, falência renal, dor ao indivíduo e até mesmo morte. Portanto faz-se importante a avaliação *ex vivo* da hemocompatibilidade do composto previamente à administração nos animais (AMIN; DANNENFELSNER, 2006).

Dessa forma, antes de iniciarem-se os estudos *in vivo*, a hemocompatibilidade do composto foi avaliada através do ensaio de atividade hemolítica.

De maneira geral, compostos dispersos em soluções hidrofílicas não resultam em indução da hemólise, porém em alguns casos, até mesmo compostos hidrossolúveis administrados intravenosa ou intraperitonealmente podem causar irritação no local, irritação vascular, anemia, entre outros (KRZYZANIAK et al., 1997). Para tanto, concentrações equivalentes estimadas a doses de SI-MF08 para um animal de 25g foram adicionadas à uma suspensão de eritrócitos e o sobrenadante foi quantificado espectrofotometricamente (Fig. 21).

Figura 21 - Ensaio de hemocompatibilidade do SI-MF08



Composto foi adicionado nas concentrações de 1; 5; 10; 20; 50 ; 100; 200 ou 500 mg/kg em solução eritrocitária para estudo de hemocompatibilidade. Para controle positivo foi utilizado 0,1% de Triton X-100[®].

O limite aceitável de atividade hemolítica para um composto administrado por via parenteral é de até 5% de hemólise da amostra analisada (MOCAN, 2013). Deste modo, os resultados obtidos nesse estudo demonstraram que até a concentração de 200 mg/kg o composto é biocompatível para administração via parenteral, visto que a atividade hemolítica observada foi bem inferior à 5%.

3.2 Toxicidade do SI- MF08 em camundongos C57BL/6J/UNIB

- Dose única

O estudo teve como finalidade avaliar a toxicidade aguda que o SI-MF08 poderia causar nos animais e determinar a dose máxima de trabalho que não causasse toxicidade evidente. Para isso, foram utilizados, com adaptações, os protocolos internacionais de estudo de toxicidade de dose fixa oral, que preconizam doses de 300 mg/kg, 50 mg/kg e 5 mg/kg (OECD, 2001a, 2001b).

A diretriz 423 para estudos de toxicidade aguda da OECD (OECD, 2001a) preconiza que a dose inicial administrada nos animais deve ser aquela que causa morte em um dos animais. Quando não existem informações prévias sobre o composto, a dose de 300 mg/kg de peso animal deve ser a dose inicial.

Os protocolos utilizados no estudo de toxicidade consideram a administração via oral. Contudo, a via de administração utilizada para esse estudo foi a via intraperitoneal (IP), uma vez que a maioria dos agentes quimioterápicos são administrados por via sistêmica. Considerando-se que vias parenterais apresentem maior biodisponibilidade (não passam pela absorção intestinal, como na via oral), optou-se por iniciar com uma dose inferior à dose de 300 mg/kg indicada nos guias utilizados. Portanto, como dose de início para o estudo de toxicidade de dose única, administrou-se 50 mg/kg do SI-MF08.

3.2.1 Peso e sobrevida

A Tabela 2 apresenta a sobrevida e variação de peso dos animais tratados com dose única de 50 mg/kg, 15 mg/kg ou 5 mg/kg e avaliados 24 horas e 13 dias após a administração intraperitoneal da respectiva dose. Para o grupo controle foi administrado solução fisiológica nas mesmas condições.

Inicialmente, 3 animais foram administrados com uma única dose de 50 mg/kg do composto contudo, algumas horas após a administração, a dose apresentou-se letal nos 3 camundongos injetados. Com isso, a dose foi excluída dos estudos e procedeu-se para a seguinte dose do protocolo de dose fixa (5 mg/kg).

A dose de 5 mg/kg do SI-MF08 não causou morte em nenhum dos indivíduos do estudo e tampouco esses animais apresentaram perda de peso significativa. O limite de perda de peso aceitável em animais no

estudo de toxicidade é de 10% do peso corpóreo (UNDP; WORLD BANK; WHO, 2004).

Tabela 2 - Avaliação da sobrevida e variação de peso dos animais

	2º dia			14º dia		
	Sobrevida	Variação de peso (%)*		Sobrevida	Variação de peso (%)*	
		N	Média		EPM	N
Salina	6/6	1.4	1.0	6/6	3.94	1.56
50 mg/kg	0/3	x	x	x	x	x
15 mg/kg	4/5	-3.0	1.6	2/2	6.76	4.1
5 mg/kg	5/5	-1.9	1.3	2/2	1.73	1.3

Sobrevida e variação de peso dos animais foi avaliada 24 horas e 13 dias após administração única de SI-MF08 para estudo de toxicidade aguda. Animais foram administrados intraperitonealmente com as doses de 5 m/kg, 15 mg/kg ou 50 mg/kg. Animais do grupo controle foram injetados com salina.

*Variação de peso do animal foi calculado pela diferença de peso do animal no primeiro dia e do peso ao final do tempo de observação

N = número de animais

EPM = Erro Padrão da Média

Continuando, 2 animais foram administrados com a mesma dose e a observação de sinais de toxicidade foi avaliada por 14 dias para detecção de possível toxicidade tardia. Da mesma forma, esse grupo também não apresentou morte de nenhum dos animais e não houve perda de peso significativa.

Portanto, pode-se dizer que a dose de 5 mg/kg do SI-MF08 apresentou-se segura nos estudos de toxicidade de dose única. Contudo, a faixa de trabalho entre as doses de 50 mg/kg e 5 mg/kg era muito ampla e, ainda não se conhecia o limite de dose trabalho para o SI-MF08.

Conforme a diretriz 420 da OECD (OECD, 2001a), a adição de doses intermediárias pode ser feita até que se encontre sinais de toxicidade ou a morte de não mais que um animal por grupo. Deste modo, um grupo de 5 animais foram injetados com 15 mg/kg do composto. Dos 5 animais, 1 morreu e os 4 que sobreviveram apresentaram uma pequena perda de peso de 3% após 24 horas da administração do composto.

Em seguida 2 animais foram administrados com a mesma dose e avaliados por 14 dias. Nesse grupo não houve nenhuma morte e os

animais não apresentaram perda de peso em relação ao primeiro dia do estudo. Portanto, pode-se dizer que a perda de peso observada nos animais 24 horas após a administração da dose foi transitória, pois os animais que foram administrados com dose fixa de 15 mg/kg e avaliados após 13 dias da injeção ganharam peso em relação ao peso inicial.

Ainda, depois de administrado o composto, os animais apresentaram sinais de piloereção e prostração nas primeiras 24 horas. A combinação desses sinais indica que essa dose já é suficiente pra apresentar certa toxicidade aos animais. Sendo assim, a dose máxima de trabalho do composto é de 15 mg/kg, por ter apresentado sinais de toxicidade bem como causado a morte de 1 dos animais do grupo.

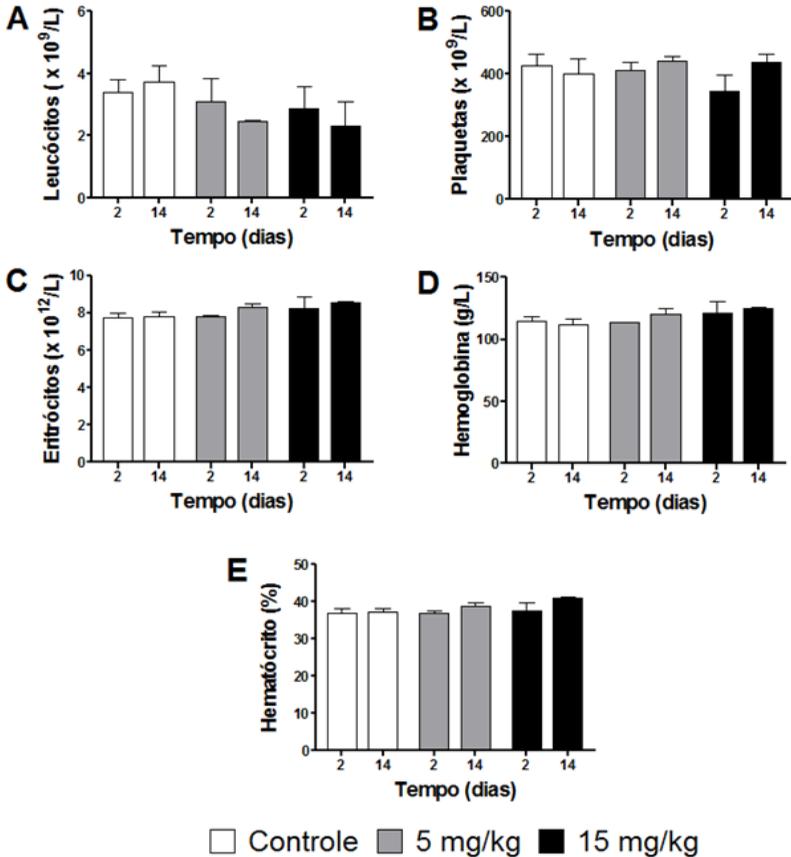
Além da avaliação de sobrevida e variação de peso, o sangue dos animais foi coletado antes de serem eutanasiados para avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos.

3.2.2 Parâmetros hematológicos

O hemograma dos animais pode nos fornecer informações quanto ao quadro hematológico dos animais frente às doses de SI-MF08. Anemia (redução na contagem de eritrócitos e na determinação de hemoglobinas), trombocitopenia (redução de plaquetas) e leucopenia (redução no número de leucócitos) podem ser evidência de toxicidade causada por agentes químicos. Ainda, em situações de anemia, hemólise, desidratação ou hemorragia pode ocorrer redução do hematócrito (proporção de células vermelhas no sangue). A Figura 22 apresenta os parâmetros hematológicos dos animais 24 horas e 14 dias após tratados com dose única de 5 mg/kg e 15 mg/kg de SI-MF08.

Apesar dos sinais observados fisicamente (prostração e vermelhidão na pele no local da aplicação logo após a administração da dose de 15 mg/kg de SI-MF08), nenhuma alteração significativa foi observada na contagem de leucócitos (Fig. 22-A), plaquetas (Fig. 22-B), eritrócitos (Fig. 22-C), bem como na determinação de hemoglobina (Fig. 10-D) e hematócrito (Fig. 22-E), seja 24 horas após a administração da dose ou 14 dias depois, sugerindo então que até uma dose de 15 mg/kg o SI-MF08 não é capaz de causar toxicidade significativa para alterar os parâmetros hematológicos dos animais, nem logo após a administração, nem em uma toxicidade tardia. Da mesma forma, a dose de 5 mg/kg de SI-MF08 não causou alterações hematológicas (Fig. 22-A a E).

Figura 22- Parâmetros hematológicos de animais tratados com dose única de SI-MF08.



Contagem de leucócitos (A), plaquetas (B), eritrócitos (C) e determinação da hemoglobina (D) e hematócrito (E) dos animais injetados intraperitonealmente com doses de 5mg/kg e 15 mg/kg de SI-MF08. Coletas de sangue foram obtidas no 2° 14° dia do estudo (24 horas e 13 dias após aplicação da dose, respectivamente). Animais do grupo controle receberam solução fisiológica. Resultados expressos em média \pm erro padrão (n = 4).

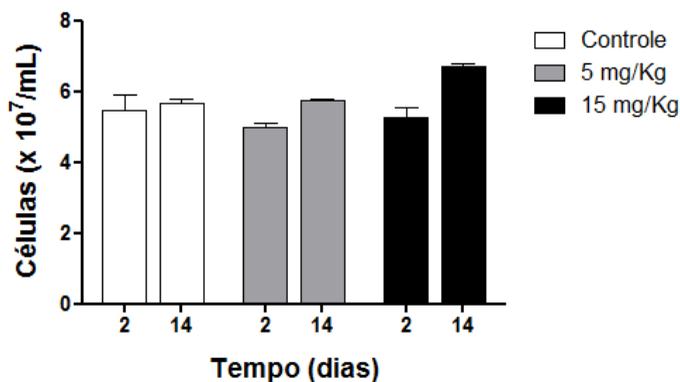
3.2.3 Celularidade da medula

As células sanguíneas têm sua origem na medula óssea e algumas substâncias, incluindo quimioterápicos, podem alterar a hemopoese das

células sanguíneas e das células progenitoras, desta forma torna-se relevante a realização da avaliação da celularidade da medula óssea. Juntamente com o hemograma, a contagem da celularidade da medula permite avaliar a extensão da toxicidade causada pelo composto, através de sinais de mielossupressão (redução de um ou mais elementos do sangue produzidos pela medula) (EMA, 2010b; KINTZEL, 2001).

A Figura 23 demonstra que a contagem do número de células nucleadas da medula óssea foi semelhante no grupo controle e no grupo dos animais tratados com SI-MF08 nas duas concentrações utilizadas. Esses dados corroboram os resultados encontrados no hemograma (Fig. 22) de que as doses de 5 mg/kg e 15 mg/kg não são mielotóxicas.

Figura 23 – Celularidade da medula dos animais tratados com dose única SI-MF08.



Contagem de células obtidas da medula femoral dos animais do estudo de toxicidade de dose única tratados intraperitonealmente com SI-MF08 nas doses de 5 mg/kg e 15 mg/kg. Grupo controle recebeu solução fisiológica nas mesmas condições. Coletas foram realizadas no 2° e 11° dia do estudo (24 horas e 13 dias após a administração, respectivamente). Resultados expressos em média \pm erro padrão ($n = 4$).

3.2.4 Parâmetros bioquímicos

A avaliação de parâmetros bioquímicos pode nos fornecer informações sobre lesões teciduais e alterações metabólicas causadas pela administração do composto, que podem posteriormente ser confirmadas através de histopatologia.

Lesões hepáticas são a maior causa de toxicidade por medicamentos, tornando-se o maior obstáculo no desenvolvimento de novos medicamentos, portanto exames envolvendo marcadores hepáticos como a dosagem de bilirrubinas, que nos possibilitam avaliar anemias hemolíticas e doenças hepáticas e das vias biliares, aspartato aminotransferase (AST), alanina amino transferase (ALT), bem como a fosfatase alcalina (FAL), utilizada para investigação de distúrbios hepáticos e ósseos se fazem necessários para avaliação do funcionamento do órgão (CULLEN; MILLER, 2006; LEE, 2003; RAMAIAH, 2007).

Da mesma forma, a disfunção e lesão renal também são muito comuns na toxicidade causada por medicamentos. A nefrotoxicidade é uma característica inerente à diversos quimioterápicos como a carmustina, cisplatina, ifosfamida, metrotexato, entre outros, que acaba por dificultar a administração contínua do tratamento antineoplásico, bem como a utilização da melhor dose terapêutica. Nesse caso, a dosagem de ureia e creatinina foram usadas para avaliação do funcionamento dos rins (CHOUHDURY; AHMED, 2006; KINTZEL, 2001; RAJAKARUNA, 2005).

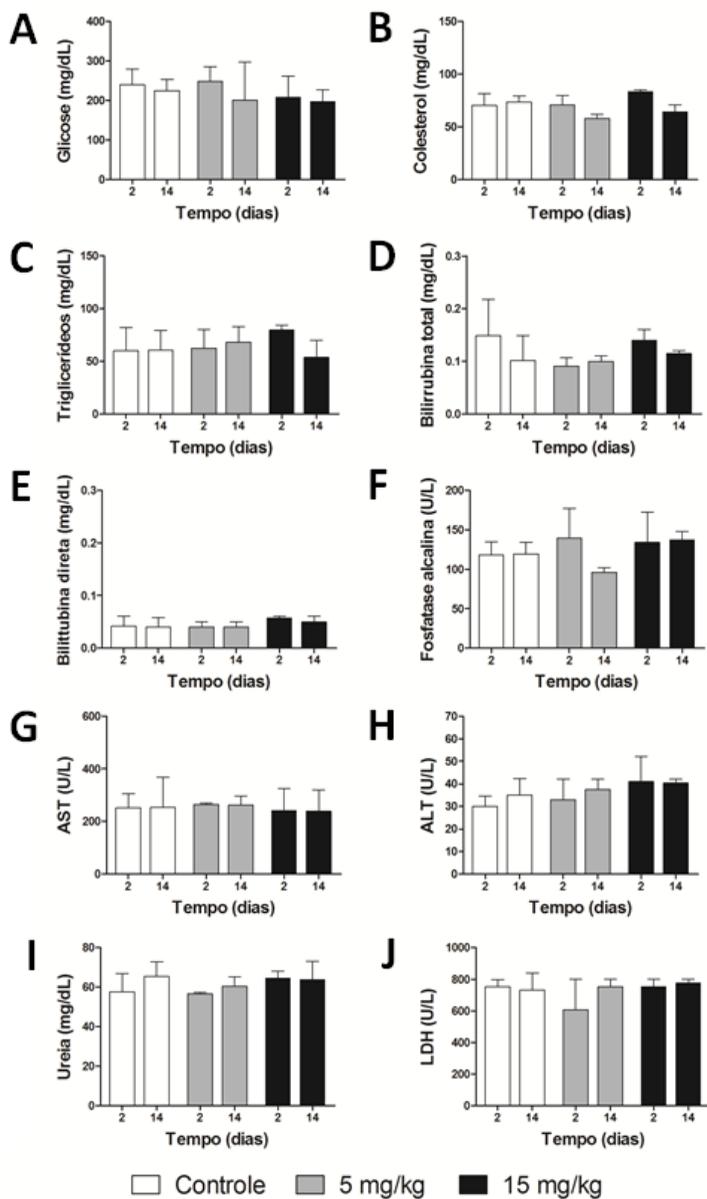
Alterações nos níveis de lactato desidrogenase (LDH), proteínas e albumina auxiliam na identificação da causa e localização do dano tecidual no corpo, além de permitirem o monitoramento da progressão da lesão. Ainda, a dosagem de glicose, colesterol e triglicerídeos fornecem uma visão geral do estado metabólico do indivíduo (QUIMBY; LUONG, 2007).

A LDH encontra-se elevada em diversas condições, refletindo ampla distribuição da enzima nos tecidos. Em camundongos, a atividade da LDH encontra-se mais expressiva no músculo esquelético, seguido do coração, fígado, rins e intestino (QUIMBY; LUONG, 2007).

O fígado está envolvido na síntese de diversas proteínas plasmáticas, incluindo a albumina, bem como na síntese de colesterol e triglicerídeos. Além disso, o fígado também atua na regulação dos níveis de glicose sanguínea.

Além de auxiliar na identificação de lesões no fígado referentes à diminuição da síntese hepática, baixos níveis de albumina podem significar uma alta perda dessa proteína através de hemorragia ou por via intestinal (enteropatias) e renal (nefropatias) (QUIMBY; LUONG, 2007).

Figura 24 – Parâmetros bioquímicos dos animais tratados com dose única de SI-MF08.



Animais foram administrados intraperitonealmente com dose única de 5 mg/kg ou 15 mg/kg de SI-M08. Grupo controle foi tratado com solução fisiológica. Amostras de sangue foram coletadas 24 horas e 14 dias após administração das injeções para dosagem de glicose (A), colesterol (B), triglicérides (C), bilirrubina total (D) e direta (E), fosfatase alcalina (F) aspartato aminotransferase (G), alanina aminotransferase (H), ureia (I), lactato desidrogenase (J), proteínas totais (K) e albumina (L). Valores de creatinina encontraram-se abaixo do limite detectável (0,2 mg/kg). Resultados expressos em média \pm erro padrão (n = 4).

No estudo de dose única, os animais administrados com 5 mg/kg e 15 mg/kg de SI-MF08 não apresentaram alterações expressivas nos parâmetros avaliados, sugerindo que uma dose de até 15 mg/kg não cause danos teciduais hepáticos ou renais até 13 dias após a administração (Fig. 24).

Com relação à creatinina, observou-se que todos os resultados foram inferiores ao valor de 0,2 g/dL (valor que representa a sensibilidade do teste utilizado). Considerando-se que os valores de referência encontrados na literatura para a dosagem de creatinina de camundongos é de $\leq 0,53 \pm 0,04$ g/dL, pode-se afirmar que todos os animais do estudo apresentaram valores normais (FERNÁNDEZ et al., 2010).

Da mesma forma, observou-se que não houve indícios de alterações envolvendo o metabolismo da glicose e metabolismo lipídico, visto que os valores encontrados são semelhantes aos do grupo controle.

Para confirmação desses resultados, exames histopatológicos dos rins e fígado, entre os outros órgãos coletados, deverão ser realizados (OECD, 2008; PARASURAMAN, 2011; RAMAIAH, 2007).

Segundo preconizado pelos guias internacionais de estudos de toxicidade aguda, a dose máxima de trabalho de um composto químico deve ser a dose que apresenta toxicidade severa ao animal ou morte, portanto, apesar da dose 15 mg/kg de SI-MF08 não ter apresentado diferença nos parâmetros hematológicos e bioquímicos avaliados, a morte de um animal foi decisiva para que essa fosse considerada a dose máxima de trabalho (OECD, 2001a).

3.3 Toxicidade do SI- MF08 em camundongos C57BL/6J/UNIB - Doses repetidas

Para avaliar possíveis danos causados pelo composto em um esquema contínuo de administração, realizou-se o estudo de doses

repetidas. A dose de 15mg/kg foi excluída dessa segunda etapa, uma vez que no estudo de dose única houve toxicidade evidente com a perda de um animal. Portanto, para uma administração prolongada a dose máxima definida foi inferior a 15 mg/kg de SI-MF08 (ANVISA, 2013; PARASURAMAN, 2011). Dessa forma, os animais foram administrados intraperitonealmente com doses de 1,0 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5,0 mg/kg, 7,5 mg/kg, 10,0 mg/kg ou 12,0 mg/kg por 10 dias consecutivos, buscando encontrar a dose máxima segura para trabalho.

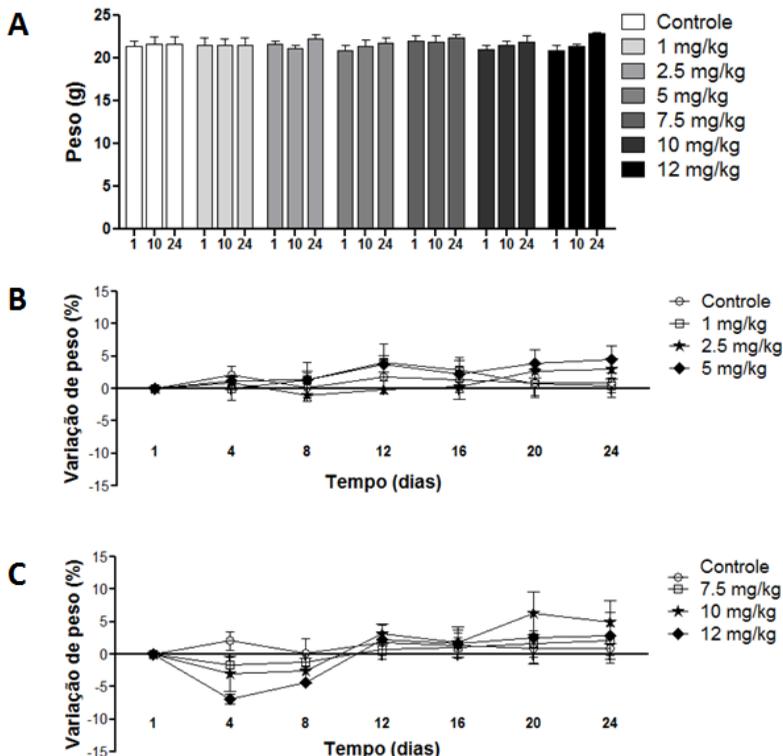
3.3.1 Peso e sobrevida

Os animais desse estudo foram pesados todos os dias, até o fim do experimento, para avaliação da variação de peso decorrente de uma possível toxicidade. Na Figura 25-A observa-se que durante o período de 24 dias, os indivíduos não apresentaram uma perda de peso significativa. Quando calculada a variação de peso desses animais (peso do dia em relação ao primeiro dia do estudo) a cada 4 dias de intervalo, observou-se que nas doses menores não houve uma variação significativa no peso corpóreo dos indivíduos administrados com as doses de 1 – 2,5 – 5 mg/kg (Fig. 25-B). Da mesma forma, a dose de 7,5 mg/kg não induziu a uma perda de peso significativa nos animais (Fig. 25-C).

Na administração das doses de 10 e 12 mg/kg foi observado perda de peso dos animais no 4º dia de administração do composto (Fig. 25-C), porém no 8º dia de estudo e administração das doses os animais já estavam recuperando o peso que possuíam no início do experimento, o que sugere que os mesmos podem ter sofrido uma reação à administração das doses, mas essa perda não ultrapassou o limite de 10% do peso corporal (LASA/NC3RS, 2009). Além disso, essa variação se mostrou transitória, uma vez que logo após o período de administração das injeções a perda foi revertida, conforme observado no 12º dia de estudo.

Quanto à sobrevida, não houve morte de nenhum animal, independentemente da concentração de SI-MF08 administrada.

Figura 25 – Peso e variação de peso dos animais tratados com doses repetidas de SI-MF08.



Média do peso dos animais nos dias 1, 10 e 24 do estudo de toxicidade de dose repetida tratados intraperitonealmente com SI-MF08 com doses em intervalo de 1 –12 mg/kg (A). Variação de peso dos animais administrados com as doses de 1 –2,5 –5 mg/kg (B) e 7,5 –10 –12 mg/kg de SI-MF08 (C) nos dias 1, 4, 8, 12, 16, 20 e 24. Animais do grupo controle foram injetados com solução fisiológica nas mesmas condições. Resultados expressos em média \pm erro padrão (n=4).

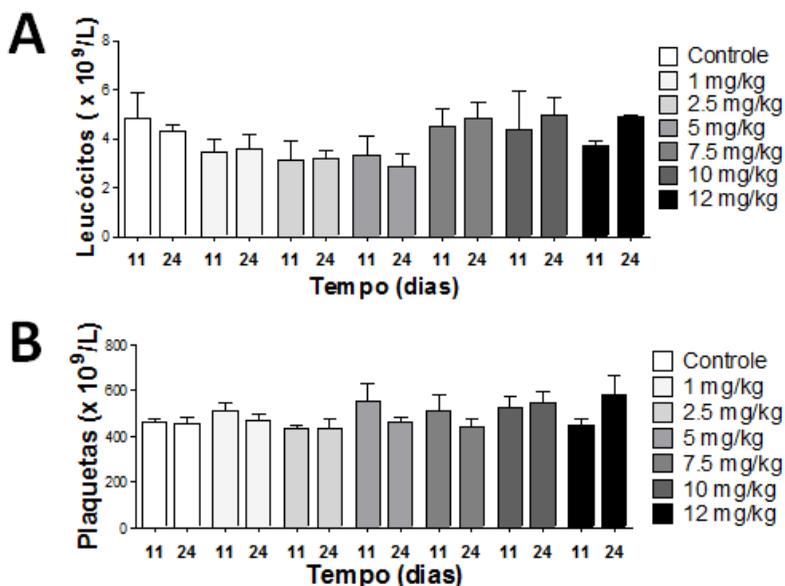
3.3.2 Parâmetros hematológicos

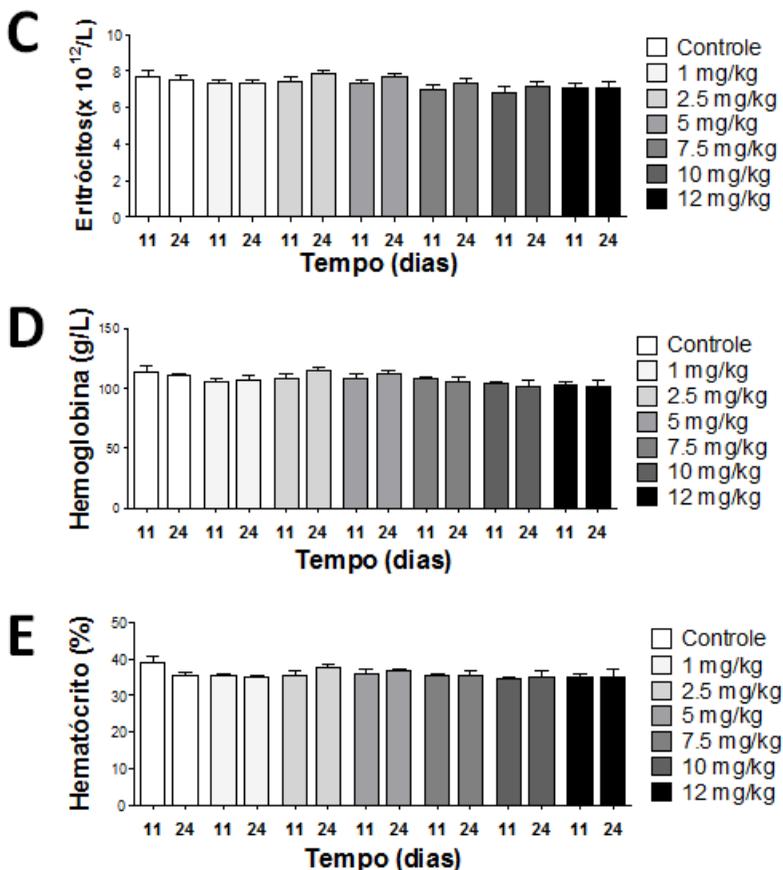
Para avaliação do perfil hematológico dos camundongos tratados com SI-MF08, o sangue dos animais foi coletado pela veia facial 24 horas e 14 dias após o final do tratamento (11° e 24° dia). A Figura 26 representa os valores da contagem de leucócitos (Fig. 26-A), plaquetas (Fig. 26-B), eritrócitos (Fig. 26-C), bem como a determinação de

hemoglobina (Fig. 26-D) e hematócrito (Fig. 26-E) dos animais tratados com as doses de 1 a 12 mg/kg de SI-MF08. Da mesma forma que no estudo de dose aguda, o tratamento com as diferentes doses de SI-MF08 não resultaram em alterações nos parâmetros hematológicos dos animais, quando comparados ao grupo controle (Fig. 26-A a E).

Com relação a contagem de leucócitos, nota-se que existe uma maior variação entre os valores encontrados nos diferentes grupos (Fig. 26-A), no entanto ressalta-se que os valores encontrados encontram-se dentro da faixa de normalidade. Em estudo apresentado por Mazzacara e colaboradores (2008) sobre intervalos de referência hematológicos, os valores de leucócitos para camundongos fêmeas C57BL/6J com idade entre 3 e 7 meses ficam entre $2,2 - 11,53 \times 10^3/\text{mm}^3$, dessa forma, a variação na contagem leucocitária dos animais em estudo encontram-se dentro da normalidade. Ainda, se observarmos os valores do grupo controle do estudo de dose única (Fig. 22-A) encontramos valores que se assemelham ao grupo de dose repetida de 5 mg/kg no 24º dia, sugerindo que essa realmente é uma variabilidade normal encontrada neste grupo.

Figura 26 – Parâmetros hematológicos dos animais tratados com doses repetidas de SI-MF08.





Contagem de leucócitos (A), plaquetas (B), eritrócitos (C) e determinação da hemoglobina (D) e hematócrito (E) dos animais injetados intraperitonealmente com doses em intervalo de 1– 12 mg/kg de SI-MF08 por 10 dias consecutivos. Coletas de sangue foram obtidas no 11° e 24° dia de estudo. Resultados expressos em média \pm erro padrão ($n=4$).

3.3.3 Celularidade da medula

Quando realizada a contagem das células nucleadas da medula femoral dos animais administrados com 1 a 12 mg/kg de SI-MF08 para investigação de potencial mielossupressão ou toxicidade às células sanguíneas (Fig. 27), os valores mostraram-se semelhantes aos encontrados no grupo controle, mais uma vez confirmando que qualquer

diferença encontrada nos hemogramas dos animais é apenas uma variabilidade normal do grupo. A mielossupressão é um fator limitante de muitos quimioterápicos utilizados, comprometendo a resposta terapêutica por exigir redução da dosagem e duração do tratamento, além de comprometer a qualidade de vida do paciente (FRIBERG et al., 2002; WANG; PROBIN; ZHOU, 2006).

Figura 27 – Celularidade da medula dos animais tratados com doses repetidas de SI-MF08.

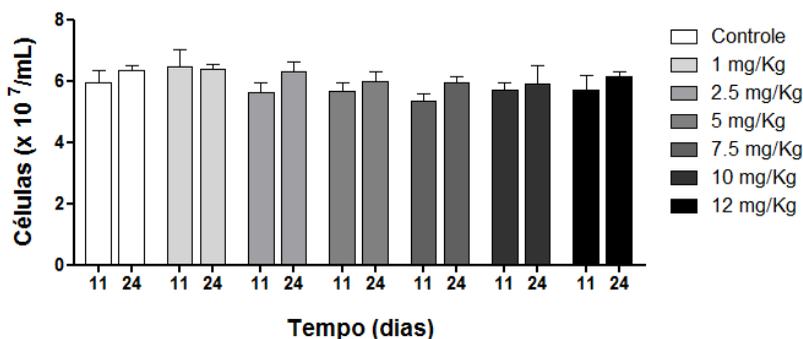


Gráfico representativo da contagem de células obtidas da medula femoral dos animais do estudo de toxicidade subaguda tratados intraperitonealmente com SI-MF08 nas doses em intervalo de 1 a 12 mg/kg. por período de 10 dias. Grupo controle recebeu solução fisiológica nas mesmas condições. Coletas foram realizadas no 11º e 24º dia do estudo. Resultados expressos em média ± erro padrão (n=4).

3.3.4 Parâmetros bioquímicos

No estudo de doses repetidas, nenhuma das doses administradas causou alterações significativas nas dosagens de colesterol e triglicerídeos em relação ao grupo controle, sugerindo que não ocorreram alterações metabólicas causadas pela administração do composto (Fig. 28-B e C).

Em relação à função renal dos animais, nenhum sinal de toxicidade foi encontrado na dosagem de marcadores específicos como creatinina (valores inferiores 0,2 mg/kg) e ureia (Fig. 28-D).

A determinação das transaminases ALT e AST são preconizadas como ensaios para avaliação de injúrias hepatocelulares em cães, ratos e

primatas não humanos, sendo a ALT considerada mais específica (BOONE et al., 2005).

A enzima ALT encontra-se no citosol dos hepatócitos e a mudança na permeabilidade da membrana celular ou a ruptura final da mesma na morte por necrose leva à liberação dessa enzima no plasma e soro sanguíneo, podendo então ser detectada como um marcador de lesão hepática (AMACHER, 2002). Deste modo, o aumento da ALT, acompanhado ou não do aumento de AST, está associado à necrose hepatocelular, injúria ou atividade de reparação/regeneração do tecido. Normalmente, a magnitude e aumento da ALT é maior que a AST no caso das duas estarem aumentadas, uma vez que a meia-vida da AST é maior e a AST encontra-se ligada às mitocôndrias, apresentado menor disponibilidade no sangue (BOONE et al., 2005).

Após dano hepatocelular agudo ocorre o aumento moderado ou acentuado dos níveis séricos de AST e ALT, contudo os níveis de AST normalizam-se rapidamente (de horas a dias). Em contrapartida, os níveis de ALT permanecem elevados por mais tempo no soro (dias) sendo esse mais confiável para detecção tanto de dano agudo como subagudo (RAMAIAH, 2007). Considerando que o aumento da ALT foi observado apenas nos animais avaliados 14 dias após o fim do tratamento com a dose de 12 mg/kg de SI-MF08, pode-se sugerir que o composto causou uma toxicidade tardia (Fig. 28-H).

Ainda, conforme critérios estabelecidos pelo National Cancer Institute para monitoramento de hepatotoxicidade, o aumento da dosagem de enzimas sorológicas pode ser classificada como leve, se os valores forem até 2,5x mais altos que os limites de normalidade; moderado, se os valores forem >2,5 a 5x acima do limite; severo, se > 5 a 20x acima do valor limite e se mais de 20x acima dos limites normais, apresenta risco de vida (GRIGORIAN; O'BRIEN, 2014). Nesse caso, os valores de ALT encontrados para os animais administrados com dose de 12 mg/kg de SI-MF08 sugerem leve toxicidade hepática.

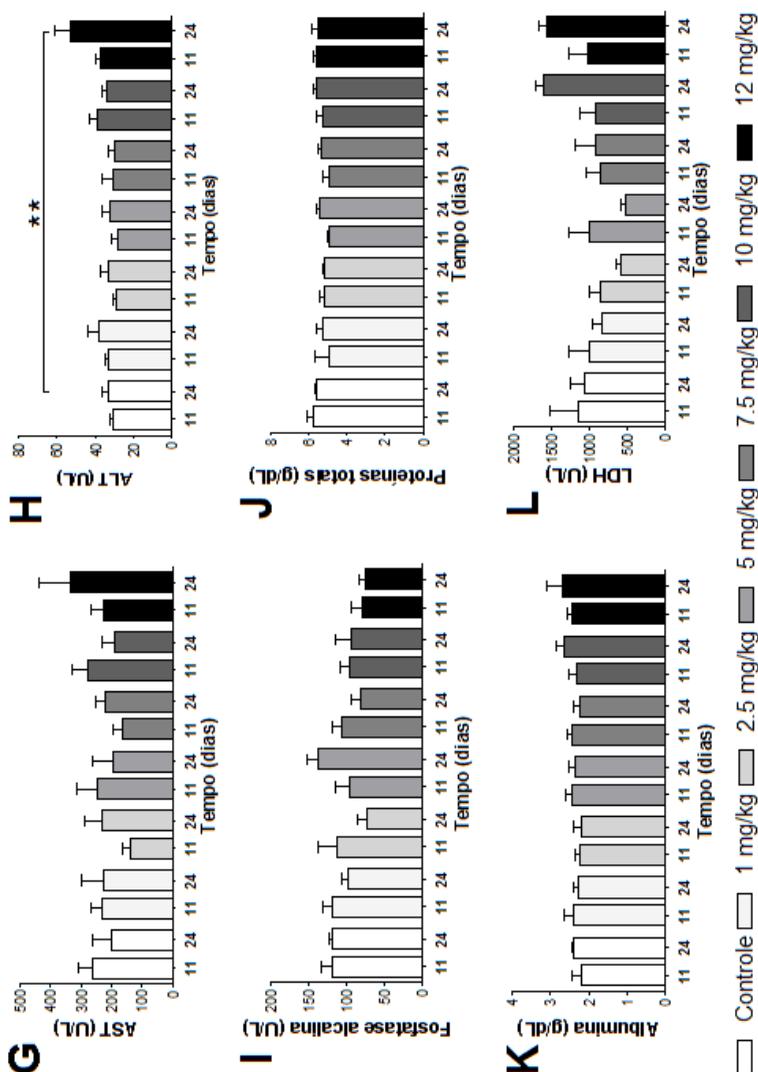
Juntamente com os resultados da dosagem de transaminases, a dosagem de glicose, albumina e fatores de coagulação também podem auxiliar na determinação da função hepática. Alterações nos parâmetros previamente mencionados indicam perda significativa da função hepática (>70 - 80%), uma vez que o fígado apresenta capacidade de sintetizar esses analitos. Adicionalmente, esses parâmetros podem também estar associados à causas não hepática, como no caso da redução dos níveis séricos de albumina, que podem significar uma inflamação relacionada à uma resposta de fase aguda, ou desnutrição (RAMAIAH, 2007).

Nos animais tratados com as doses de 7,5, 10 e 12 mg/kg os níveis de glicose apresentaram-se elevados 14 dias após o fim da administração das doses (Fig. 28-A). Contudo, a dosagem de albumina dos animais não apresentou nenhuma variação indicativa de toxicidade (Fig. 28-K).

Os animais avaliados 14 dias após o fim da dose de 12 mg/kg apresentaram ALT elevada, no entanto até mesmo os animais que receberam doses inferiores (7,5 e 10 mg/kg) apresentaram níveis elevados de glicose.

É importante destacar que um período muito curto de jejum pode interferir na dosagem correta dos níveis de glicose e, considerando a tendência ao canibalismo inerente da espécie de camundongo utilizada no estudo, o tempo de jejum dos animais precisou ser ajustado.

Portanto, pela falta de dados que confirmem a toxicidade hepática nos animais administrados com doses de 7,5 e 10 mg/kg no que se refere aos níveis de glicose, é possível que esses dados estejam apenas refletindo um aumento de glicose decorrente da ingestão de ração previamente à coleta de sangue.



Foram realizadas avaliações de colesterol (A), triglicerídeos (B), glicose (C), ureia (D), bilirrubina total (E), bilirrubina direta (F), aspartato aminotransferase (G), aspartato aminotransferase (H), fosfatase alcalina (I), lactato desidrogenase (J), proteínas totais (K) e albumina (L). Animais foram administrados intraperitonealmente por 10 dias com doses em intervalo de 1 – 12 mg/kg de SI-M08. Grupo controle foi injetado com solução fisiológica nas mesmas condições. O sangue dos animais foi coletado no 11° e 24° dia de estudo (24

horas e 13 dias após a última dose, respectivamente), para avaliação do metabolismo renal e hepático. Resultados expressos em média \pm erro padrão ($n = \pm 7$), $**p < 0,01$.

A dosagem de fosfatase alcalina e bilirrubinas totais auxilia na investigação de danos hepatobiliares em roedores, cães e primatas não humanos utilizados em estudos pré-clínicos. O aumento de FAL nessas espécies normalmente indicam dano hepático ou problemas no desenvolvimento ósseo. Adicionalmente, o aumento de FAL é seguido do aumento dos níveis de bilirrubina total (BOONE et al., 2005).

Apesar dos níveis de fosfatase alcalina dos animais administrados com dose de 5 mg/kg apresentarem discreto aumento, nenhum outro grupo apresentou as mesmas alterações, inclusive animais administrados com doses mais altas do composto (Fig. 28-I).

A variabilidade nos valores encontrados entre os grupos do estudo para a dosagem de fosfatase alcalina, podem ter sido ocasionada por uma interferência analítica relacionada a vestígios de hemólise na amostra (LIPPI et al., 2006). Segundo Quimby e Luong (2007), os valores de referência para camundongos C57BL/6 fêmeas adultas são de $118 \pm 15,9$ U/L, portanto, de maneira geral, os animais tratados com todas as doses de SI-MF08 não apresentaram alterações significativas.

As bilirrubinas também são dosadas como marcadores para dano hepático. A bilirrubina é o produto da quebra da fração da heme da hemoglobina e sua eliminação é feita através do fígado, onde são absorvidas pelos hepatócitos e conjugadas (bilirrubina direta) para excreção. O aumento de bilirrubina direta indicaria um problema de excreção, e o aumento de bilirrubinas totais poderia indicar um problema de conjugação por parte do fígado ou aumento na degradação da fração heme. No estudo de doses repetidas, nenhuma das doses administradas induziu a uma variação nos valores de bilirrubina total e direta (Fig. 28-E e 28-F).

A dosagem de proteínas totais e também auxilia na avaliação do funcionamento do fígado e, conforme observado na Figura 28-L os animais tratados com o composto não apresentaram alterações significativas quando comparados ao grupo controle.

Para confirmação da extensão do dano causado ao tecido hepático sugestivo do aumento dos níveis de ALT nos animais administrados com a maior dose de SI-MF08 e elucidação das dúvidas quanto aos demais resultados bioquímicos obtidos, avaliações histopatológicas do fígado devem ser posteriormente adicionadas ao estudo.

4 Conclusão

O estudo de toxicidade de dose única, realizado em camundongos saudáveis C56BL/6J/Unib para avaliação da segurança do composto, demonstrou que a dose limite para administração nos animais é de 15 mg/kg de SI-MF08. O estudo de toxicidade de doses repetidas por sua vez não apresentou aparente toxicidade que refletisse nos parâmetros hematológicos ou celularidade de medula, porém revelou indícios de que a dose de 12 mg/kg de peso corporal o SI-MF08 possa apresentar leve toxicidade hepática após a administração contínua do composto.

Efeitos hepatotóxicos são comuns em agentes quimioterápicos, porém os efeitos terapêuticos acabam por sobrepor os efeitos adversos, sendo esses efeitos tóxicos muitas vezes reversíveis (GRIGORIAN; O'BRIEN, 2014; KING, 2001; MAOR; MALNICK, 2013; SHARMA et al., 2014). Contudo, os dados encontrados não são conclusivos, e uma futura avaliação histopatológica dos órgãos dos animais se faz necessária para melhor compreensão e elucidação do possível efeito tóxico do SI-MF08.

**CAPÍTULO 4. ATIVIDADE
ANTITUMORAL *IN VIVO*
DO SI-MF08 EM MODELO
DE MELANOMA**

1 Introdução

O uso de modelos animais em estudos pré-clínicos se faz importante na investigação de novos produtos com atividade antitumoral, destacando-se os modelos em roedores (GOLDIN et al., 1981; KRUCZYNSKI; HILL, 2002; PANTALEÃO; LUCHS, 2010; VENDITTI, 2016).

Entre os modelos utilizados, pode-se realizar o implante de células neoplásicas da mesma espécie que o hospedeiro do estudo (exemplo: células tumorais murinas implantadas em camundongos), como também podem se utilizadas células de outras espécies (JUNG, 2014; KUZU et al., 2015; TALMADGE et al., 2007). No primeiro caso, podemos citar o modelo de melanoma em camundongos C57BL/6, em que células da linhagem B16 utilizadas são oriundas de um surgimento espontâneo na pele da orelha de camundongos, que foram isoladas para posterior utilização em estudos de atividade antitumoral *in vivo*, com indução de melanoma em animais saudáveis dessa espécie. (GERAN et al., 1972; MCKINNEY; HOLMEN, 2011)

O segundo modelo utiliza o implante de células tumorais de outra espécie (normalmente humana) em animais e é utilizado para avaliação de parâmetros farmacológicos e toxicológicos, porém exige a utilização de animais imuno-deficientes para evitar a rejeição do implante.

Quanto ao local do implante, os tumores podem ser ectópicos ou ortotópicos. Os tumores ectópicos implantados em um local diferente da origem das células são amplamente utilizados para facilitar o monitoramento do tumor e avaliar a eficácia do tratamento antitumoral. Inversamente, os tumores ortotópicos são implantados no mesmo órgão de origem das células tumorais apresentando maior semelhança na resposta terapêutica frente ao crescimento tumoral e poder metastático (JUNG, 2014; KUZU et al., 2015; TALMADGE et al., 2007).

Neste contexto, o modelo subcutâneo de melanoma B16 em camundongos C57BL/6 é um modelo clássico, bem estabelecido e ainda usado nos dias de hoje, por ser de rápida progressão tumoral, altamente agressivo e, diferente de outros modelos, por ser também um modelo ortotópico, fornecendo informações precisas quanto à ação do composto no órgão de origem do tumor (BERKELHAMMER et al., 1982; KRUCZYNSKI; HILL, 2002; OVERWIJK; RESTIFO, 2001a; PLOWMAN et al., 1997).

No caso de agentes antitumorais com princípio de citotoxicidade à célula neoplásica, assume-se que quanto maior a dose, igualmente maior será a eficácia, uma vez que esses agentes apresentam uma

relação dose-toxicidade (EISENHAUER et al., 2000). Portanto, a maior dose segura observada nos estudos de toxicidade *in vivo* foi escolhida como a dose com maior chance de apresentar eficácia, de forma que apresenta significante, porém reversível, toxicidade.

Nos capítulos anteriores, foi demonstrado o poder citotóxico do SI-MF08 em linhagem celular de leucemia e melanoma, apresentando promissora atividade antitumoral. Ainda, o estudo de toxicidade em camundongos C57BL/6J/Unib sugere que até a dose de 12 mg/kg o composto possa ser administrado intraperitonealmente por um período de 10 dias sem apresentar comprometedor toxicidade aos animais. Dessa forma, a última parte desse trabalho teve como objetivo a avaliação da atividade antitumoral de animais C57BL/6J/ Unib portadores de melanoma.

2 Materiais e Métodos

2.1 Reagentes

Os reagentes foram obtidos conforme previamente descritos no item 2.1 do capítulo 3. Ainda, a parafina TissuePrep Embedding Media foi adquirida da Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA).

2.2 Aspectos Éticos

Os experimentos aqui realizados seguiram os preceitos éticos para experimentação animal, e o protocolo experimental foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFSC sob o parecer número PP00892 (Anexo A).

2.3 Animais

Para os estudos atividade antitumoral foram utilizados camundongos isogênicos C57BL/6J/Unib fêmeas conforme descrito no item 2.3 do capítulo 3.

Os animais foram tratados intraperitonealmente e as amostras de sangue foram coletadas da veia facial. Os animais foram também anestesiados com solução de quetamina (200 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) antes da eutanásia para posterior remoção do tumor.

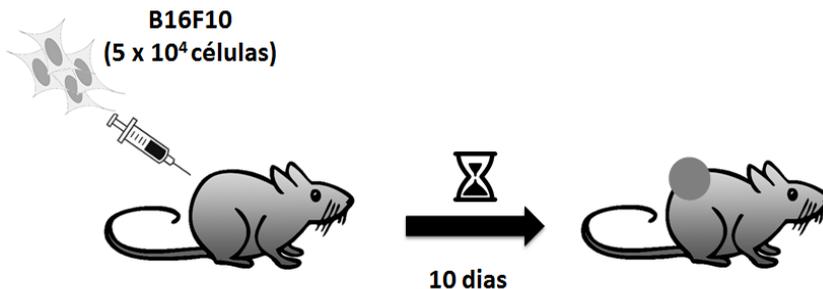
2.4 Cultura de células

A cultura das células de melanoma murino B16F10 para implante nos animais foi realizada conforme previamente descrito no item 2.3 do capítulo 1 em meio de cultura DMEM.

2.5 Implante de células de melanoma murino B16F10 em camundongos C57BL/6J/ Unib

As células B16F10 foram mantidas em cultura até a 4^a passagem. Em seguida, foram tripsinizadas, lavadas 3× com PBS e as culturas que apresentaram mais de 95% de viabilidade pelo método de Azul de Trypan (item 2.3 do capítulo 1) foram injetadas por via subcutânea na densidade de 5×10^4 em um volume de aproximadamente 100 μ L de PBS no dorso previamente depilado dos animais, em condições estéreis (CONTENTE et al., 2014; OVERWIJK; RESTIFO, 2001b). Durante 10 dias os tumores foram maturados e monitorados a cada 48 horas até crescimento no espaço subcutâneo (Fig. 29).

Figura 29 – Esquema representativo de inoculação subcutânea de células B16F10 no dorso de camundongos C57BL/6J/Unib.



2.2 Tratamento dos animais portadores de tumor com SI-MF08

Após o desenvolvimento dos tumores de melanoma, camundongos portadores de tumores de volume similar foram distribuídos homogeneamente em três grupos:

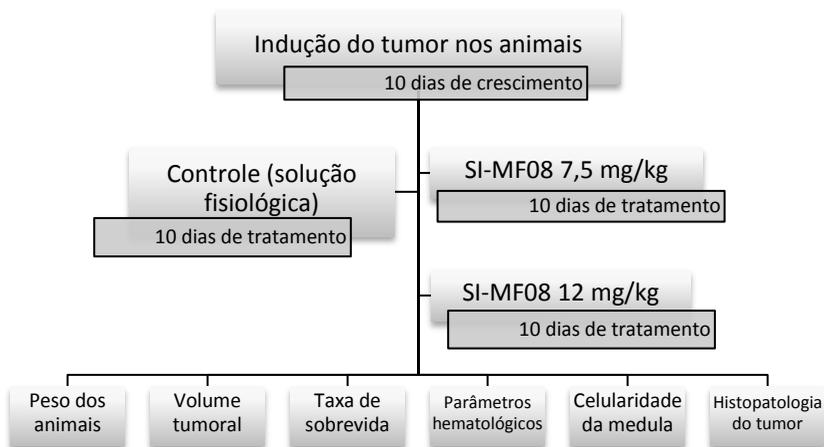
- Controle
- SI-MF08 na dose de 7,5 mg/kg;
- SI-MF08 na dose de 12 mg/kg;

A escolha das doses foi feita a partir dos resultados obtidos no estudo de toxicidade. Considerando-se a agressividade da doença, a maior dose do estudo de toxicidade com doses repetidas (SI-MF08 12 mg/kg) foi utilizada no tratamento dos camundongos portadores de tumor. Adicionalmente, uma dose inferior utilizada no estudo de toxicidade de doses repetidas foi eleita para o estudo (SI-MF08 7,5 mg/kg) na busca por efeitos antitumorais com menor possibilidade de toxicidade aos animais debilitados em decorrência da doença.

Os animais foram tratados intraperitonealmente com SI-MF08 ou solução salina (controle) durante um período de 10 dias, com início no 11º dia após implante do tumor. As injeções foram administradas sempre no mesmo horário do dia.

Para avaliação do efeito antitumoral foram monitorados peso, volume tumoral e sobrevida dos animais, além da avaliação de parâmetros hematológicos, celularidade da medula e histopatologia do tumor (Fig. 30).

Figura 30 – Fluxograma representativo do estudo de atividade antitumoral do SI-MF08.



2.3 Volume tumoral e peso dos animais

A avaliação do crescimento tumoral e peso dos animais foi realizada por 45 dias, 3 dias por semana. O monitoramento do tamanho

tumoral foi realizado através da medida do diâmetro transversal e longitudinal, com auxílio de paquímetro. Os volumes dos tumores dos animais foram determinados conforme equação abaixo (SANCÉAU et al., 2002):

$$\text{Volume tumoral (mm}^3\text{)} = \frac{\text{comprimento (mm)} \times [\text{largura (mm)}]^2}{2} \quad (2)$$

O peso dos animais foi monitorado com o auxílio de balança apropriada e a variação de peso foi calculada pela razão da média do peso final dos animais e média do peso inicial dos animais, subtraindo o peso do tumor. Conforme descrito por Plowman (1997), o peso do tumor pode ser calculado por equação semelhante ao volume tumoral, portanto considerou-se que 1 mm³ equivale a 1 g para determinação da massa tumoral.

2.4 Parâmetros hematológicos

A coleta do sangue dos animais do estudo de atividade antitumoral foi realizada antes da indução do tumor (controle basal), antes do início do tratamento (10° dia do implante do tumor) e 7 dias após o final do tratamento (27° dia após o implante do tumor) para acompanhamento do perfil hematológico dos animais pós-tratamento com SI-MF08. A coleta e parâmetros avaliados foram realizados conforme previamente descritos (Capítulo 3, item 2.5).

2.5 Celularidade da medula

A avaliação da celularidade da medula dos animais foi realizada conforme descrito no capítulo 3 (item 2.7).

2.6 Análise histológica do tumor

Para a avaliação histológica, contou-se com a colaboração da Profa. Dra. Evelise Maria Nazari, do Dep. de Biologia Celular, Embriologia e Genética da UFSC.

Após eutanásia dos animais, os tumores foram coletados, fixados em paraformaldeído 4% por 48 horas e guardados em álcool 70%. Após, foram desidratados em uma sequência crescente de banhos de álcool (80% < 90% < 100%) e xilol, seguidos de inclusão em parafina. Após

solidificada a parafina, as peças foram cortadas em micrótomo com espessura de 6 μm e as lâminas previamente recobertas com gelatina foram confeccionadas com as dos tumores.

A coloração das lâminas para a visualização das estruturas dos tecidos foi feita com hematoxilina e eosina. Brevemente, as lâminas foram desparafinizadas em banhos com xilol e decrescentes concentrações de álcool (100% > 90% > 80% > 70%), coradas em banho de hematoxilina e eosina e, após removido o excesso de corante, o excesso de água das amostras foi retirado com banhos crescentes de álcool e xilol novamente.

2.7 Análise estatística

A probabilidade de sobrevida foi analisada com curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier associado ao teste de significância de Mantel-Cox. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prisma 5 e os níveis críticos de significância foram de $p < 0,05$.

Os demais experimentos foram expressos conforme descrito no item 2.8 do capítulo 3.

3 Resultados e Discussão

Para a investigação do efeito antitumoral do SI-MF08 em modelo murino de melanoma, camundongos fêmeas foram inoculadas por via subcutânea com células B16F10 no dorso e o crescimento do tumor foi observado por 10 dias antes do início da administração dos tratamentos.

Duas doses foram escolhidas para o tratamento dos animais:

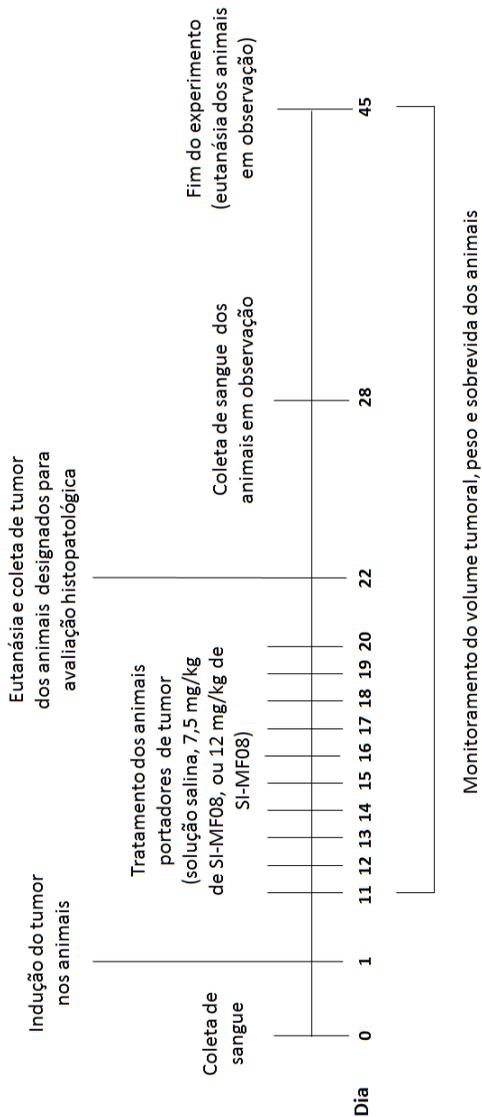
1) dose de 12 mg/kg de peso corporal - maior dose utilizada no estudo de doses repetidas que não apresentou toxicidade grave, com o objetivo de obter a maior resposta possível na inibição da progressão tumoral;

2) dose de 7,5 mg/kg de peso corporal – dose que também não induziu toxicidade grave, para avaliar se uma dosagem menor também consegue atuar interferindo na progressão do tumor e reduzir as possíveis toxicidades causadas pelo composto em animais com uma condição mais frágil devido à doença.

O tratamento dos animais foi feito por 10 dias consecutivos. Um terceiro grupo foi administrado com solução fisiológica para grupo controle. A Figura 31 representa uma linha do tempo do estudo

realizado para a avaliação da atividade antitumoral do SI-MF08 nos animais portadores de tumor de melanoma B16F10.

Figura 31 – Linha do tempo do estudo de atividade antitumoral *in vivo*.



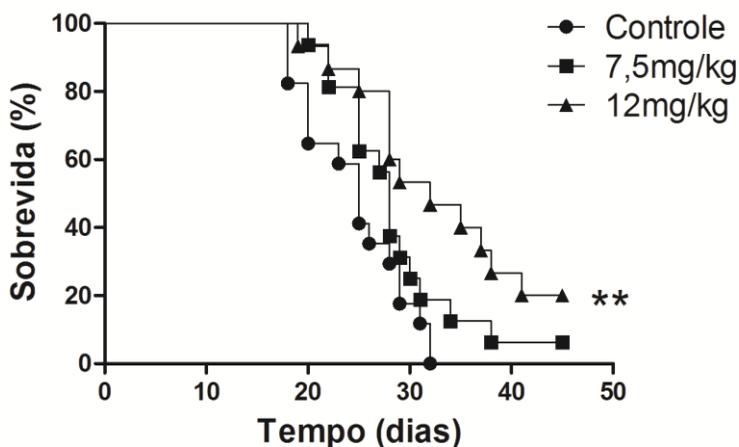
O final do experimento foi considerado 45 dias após indução do tumor ou até animais atingirem volume tumoral de 6 cm^3 .

3.1 Probabilidade de sobrevida

A probabilidade de sobrevida dos animais com tumor de melanoma subcutâneo induzido pelo implante de células B16F10 foi avaliada por 45 dias ou até que os tumores atingissem volume de 6 cm^3 , conforme representado na Figura 32 e Tabela 3 por meio das curvas de Kaplan-Meier.

Através da mediana de sobrevivência dos animais é possível determinar o tempo estimado em que a sobrevida de cada grupo atingiu 50%. Conforme descrito na Tabela 3, o tempo estimado para o grupo controle foi de 25 dias e para os animais tratados com a menor dose do composto foi de 28 dias. Em contraste, o tratamento com a maior dose do composto resultou em aumento da sobrevida em relação ao grupo controle ($p < 0,0016$). Neste caso, destaca-se a dose mais alta de SIMF08, que apresentou uma estimativa de 32 dias para atingir 50% de sobrevida (Fig. 32).

Figura 32 - Taxa de sobrevida dos animais portadores de tumor tratados com SIMF08.



Animais foram tratados com as doses de 7,5 mg/kg e 12 mg/kg. Grupo controle tratado com solução fisiológica. Animais foram observados diariamente por 45 dias. ($n = \pm 10$, $**p < 0,0016$).

Tabela 3 – Mortalidade dos camundongos C57BL/6J/Unib com tumor subcutâneo de melanoma B16F10.

	Mortalidade 32° dia (%)[▲]	Tempo (dias)[■]
Controle	100%	25
SI-MF08 7,5 mg/kg	81%	28
SI-MF08 12 mg/kg	53%	32

Animais foram tratados intraperitonealmente com doses de 7,5 mg/kg e 12 mg/kg por 10 dias consecutivos.

[▲]Taxa de mortalidade dos animais no 32° dia de experimento, 12 dias após o implante do tumor.

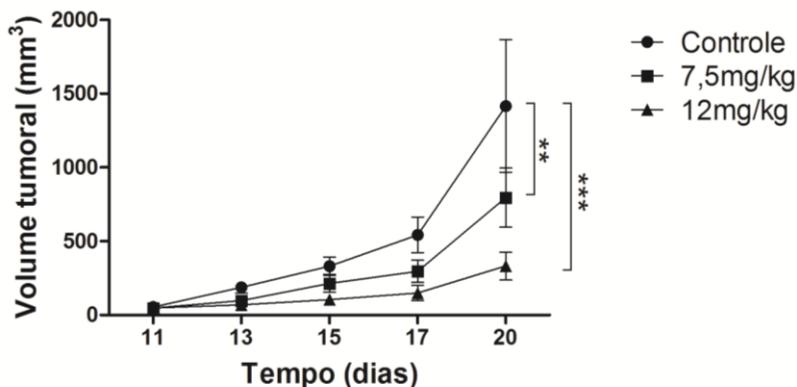
[■]Tempo estimado para a morte de 50% dos animais do grupo

No presente estudo, todos os animais do grupo controle morreram até o 32° dia do experimento. Esses dados estão de acordo com o estudo de Entin e colaboradores (2003), que demonstrou que camundongos portadores de melanoma B16 morrem entre o 35° e 40° dia depois de implantados os tumores. Em contraste, nota-se nesta mesma data, que o grupo de animais tratados com a maior dose de SI-MF08 apresentava uma sobrevida de 47%. Deste modo, os dados obtidos no experimento sugerem que o composto na dose de 12 mg/kg aumente a probabilidade de sobrevida desses indivíduos.

3.2 Crescimento tumoral

O volume do tumor dos animais foi medido três vezes por semana e, ao final do tratamento (20° dia de experimento) observou-se que as curvas de crescimento tumoral dos animais tratados com as doses de 7,5 mg/kg e 12 mg/kg de SI-MF08 apresentaram-se expressivamente menores que a do grupo controle, visto que para os animais tratados com solução fisiológica, a média de volume tumoral (2) foi de 1,4 cm³, enquanto que os animais tratados com a dose mais baixa e mais alta do composto apresentaram uma média de 0,9 cm³ e 0,3 cm³, respectivamente. Isso nos leva à compreensão de que mesmo a dose mais baixa do composto teria capacidade de retardar o crescimento do tumor, enquanto os animais estavam em tratamento (Fig. 33).

Figura 33 – Volume tumoral dos animais tratados com SI-MF08.



Animais foram tratados por 10 dias com as doses de 7,5 mg/kg e 12 mg/kg de SI-MF08. Grupo controle recebeu solução fisiológica pelo mesmo período. Gráfico representativo do volume dos animais (2) até o último dia de tratamento ($n = \pm 10$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Foi possível observar que os animais tratados com a dose de 12 mg/kg de SI-FM08 apresentaram uma taxa de inibição do crescimento tumoral de 76% em relação aos animais não tratados (Tabela 4).

Tabela 4 - Atividade antitumoral de SI-MF08 em animais C57BL/6J/Unib com tumor subcutâneo de melanoma B16F10.

Grupos	%T/C [▲] 20° dia	% ICT [■] 20° dia
SI-MF08 7,5 mg/kg	56	44
SI-MF08 12 mg/kg	24	76

Animais foram tratados intraperitonealmente com doses de 7,5 mg/kg e 12 mg/kg por 10 dias consecutivos.

▲%T/C = (mediana da massa tumoral dos animais tratados/média da massa tumoral dos animais controles) x 100.

■%ICT (inibição do crescimento tumoral) = 100 – (%T/C)

Foi também avaliada a razão entre a massa tumoral dos animais tratados e a massa dos animais controle (solução fisiológica) para obtenção do valor de %T/C.

Conforme padrões estabelecidos pela divisão de tratamento do câncer do National Cancer Institute (NCI- EUA), quando a relação entre a massa tumoral do grupo tratado e grupo controle (T/C) forem menores ou iguais a 42%, a atividade tumoral é significativa (PLOWMAN et al., 1997), portanto podemos dizer que a dose de 12 mg/kg de SI-MF08 apresentou expressiva capacidade de redução do crescimento tumoral com valores de T/C de 24% ao final do tratamento (Tabela 4).

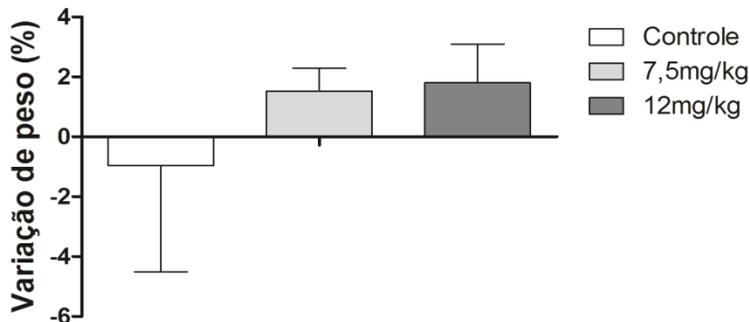
3.3 Peso dos animais

Para o crescimento do tumor, uma alta quantidade energética é exigida. Dessa forma, tecidos adjacentes são recrutados para prover energia necessária para o crescimento do tumor. Contudo, não ocorre um ajuste calórico no organismo do hospedeiro para manutenção da homeostasia, levando à perda de peso em pacientes com câncer. Essa perda de peso reduz a taxa de sobrevivência dos pacientes, bem como prejudica a resposta ao tratamento quimioterápico (DEWYS et al., 1980; FEARON et al., 2011).

Na avaliação da variação de peso dos animais em estudo, a razão entre o peso dos animais no início e fim do tratamento foi considerada descontando-se a estimativa do peso do tumor de cada animal. O peso dos tumores foi calculado conforme descrito por Geran (1972).

Na Figura 34 é possível observar que os animais do grupo controle apresentaram perda de peso em relação ao início do experimento.

Figura 34 – Variação de peso dos animais portadores de tumor tratados com SI-MF08.



Média da variação de peso dos animais com tumor tratados com 7,5 mg/kg e 12 mg/kg de SI-MF08 em esquema de 10 dias. Grupo controle foi tratado com solução fisiológica no mesmo período ($n = \pm 10$).

A perda de peso observada nos animais do grupo controle pode ser relacionada com os efeitos de caquexia (perda de peso, perda de massa muscular, inflamação, anemia) inerentes à doença. (EVANS et al., 2008). Por outro lado, os animais tratados com ambas as doses de SI-MF08 apresentaram ganho de peso, o que indica que o composto pode reduzir os efeitos causados pela doença.

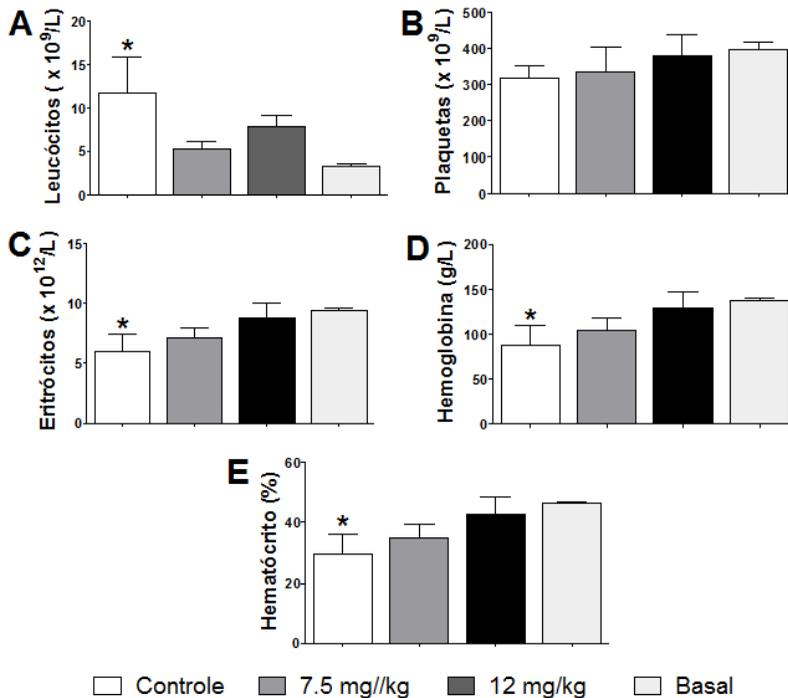
3.4 Parâmetros hematológicos

A avaliação do perfil hematológico dos animais inoculados com melanoma B16F10 é uma ferramenta útil para avaliação das alterações inerentes ao tumor. A Figura 35 apresenta os valores da contagem de leucócitos, plaquetas, eritrócitos, hemoglobina e hematócrito dos animais tratados com solução fisiológica (controle) e com as doses de 7,5 mg/kg e 12 mg/kg de SI-MF08 coletado no 28º do experimento. Foi também realizada uma coleta de sangue previamente à indução do tumor nos animais, para comparação de valores basais de animais saudáveis.

Refletindo o estado de anemia inerente à doença, os animais do grupo controle apresentaram redução significativa ($p < 0,01$) na contagem de eritrócitos, e determinação da hemoglobina e hematócrito (Fig. 35- C a E), bem como observou-se um expressivo aumento nos valores de leucócitos (Fig. 35-A) quando comparados aos parâmetros hematológicos dos animais saudáveis (basal). Entretanto, os animais tratados com SI-MF08 em ambas as doses apresentaram valores de

eritrócitos, hemoglobina e hematócrito mais próximos aos animais saudáveis (basal).

Figura 35 – Perfil hematológico dos animais portadores de tumor tratados com SI-MF08.



Contagem de leucócitos (A), plaquetas (B) e eritrócitos (C), e determinação de hemoglobina (D) e hematócrito (E) dos animais com tumor tratados 7,5 mg/kg e 12 mg/kg de SI-MF08 por 10 dias. Grupo controle foi tratado com solução fisiológica no mesmo período e hemograma dos animais obtido previamente à indução tumoral representam grupo basal. (n= ±10, *controle vs. basal, p<0,01)

Em pacientes com câncer, a leucocitose ocorre em diversos tipos de tumores sólidos, sendo associada a um pior prognóstico pelo aumento de mortalidade, dessa forma, a reversão da leucocitose está relacionada a uma melhor resposta terapêutica. (KASUGA et al., 2001; RUKA et al., 2001; TANAKA et al., 1996). Como observado na Figura 35-A os animais tratados com ambas a doses de SI-MF08 não apresentaram leucocitose quando comparados com os animais saudáveis no grupo basal.

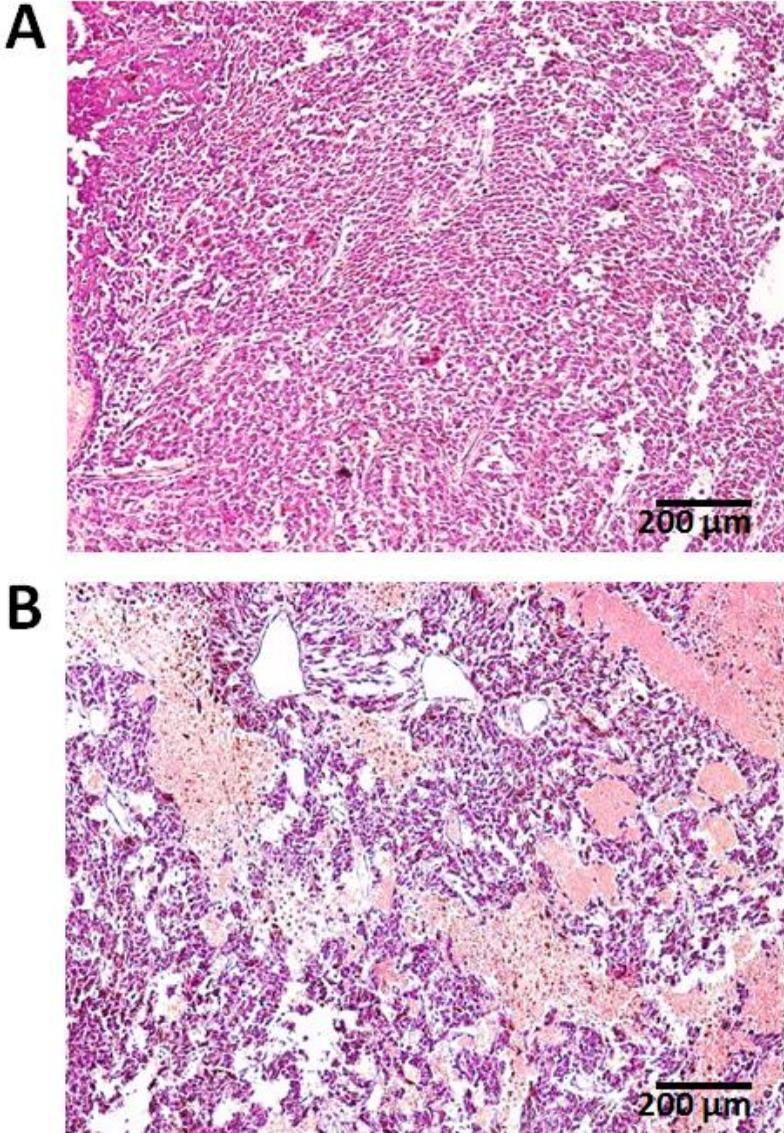
3.5 Análise histológica dos tumores

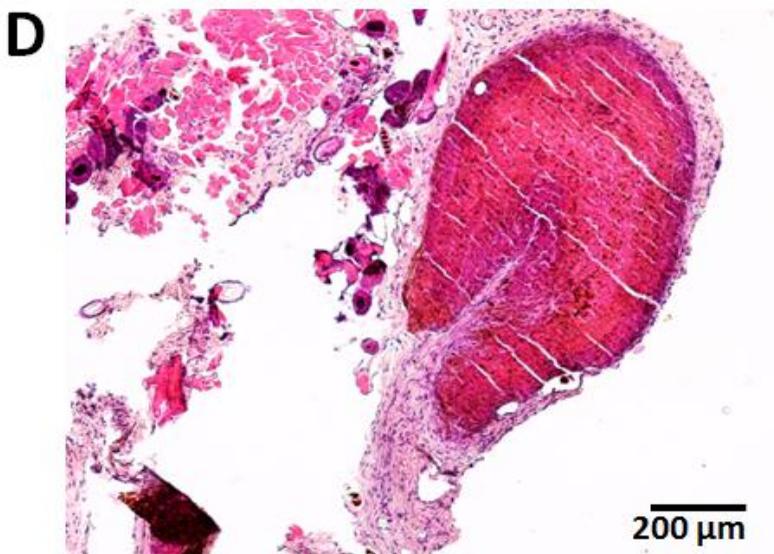
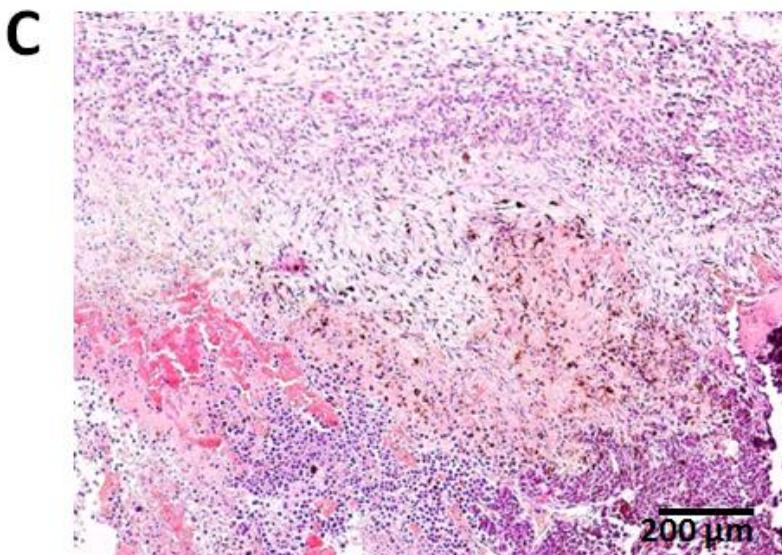
As fotomicrografias apresentadas na Figura 36 representam os cortes histológicos do estudo preliminar de avaliação histológica dos tumores dos animais coletados 48 horas após o fim dos tratamentos.

O corte histológico do tumor do grupo controle apresentou um tecido com grande número de células neoplásicas (Fig. 36-A), enquanto que no tecido tumoral obtido de um animal tratado com a dose de 7,5 mg/kg de SI-MF08 observou-se áreas de necrose e fibrose sugestivas de morte celular induzida pelo composto (Fig. 36-B).

No tecido tumoral do animal tratado com a dose de 12 mg/kg do composto notou-se um tecido com uma densidade celular reduzida, além da presença de necrose e algumas áreas com sugestiva deposição de fibras de colágeno (Fig. 36-C). Em outro animal também tratado com a maior dose de SI-MF08, observa-se um encapsulamento do tumor com a presença de fibras circundando a massa tumoral (Fig. 36-D).

Figura 36 – Fotomicrografias representativas do aspecto histológico dos tumores.





Os tumores de melanoma de animais C57BL /6J/Unib foram obtidos 24 dias após inoculação com células de melanoma B16F10. Os cortes de tumores dos animais tratados com solução fisiológica (volume = 5 cm³) (A), 7,5 mg/kg de SI-MF08 (volume = 2 cm³) (B) e 12 mg/kg de SI-MF08 (volume = 2 cm³ e

0,02 cm³) (C e D) foram corados com hematoxilina-eosina e observados em magnificação de 100x.

4 Conclusão

O SI-MF08 na dose de 12 mg/kg apresentou atividade antitumoral em camundongos portadores de melanoma, demonstrado pelo aumento da taxa de sobrevivência dos animais, inibição de crescimento tumoral, além de atenuar os efeitos deletérios inerentes à doença.

CONCLUSÕES GERAIS

Nos estudos *in vitro* observou-se que SI-MF08 atua por diferentes vias para ativação do processo de morte celular, caracterizando-o como um potencial agente antitumoral multialvo, o que pode favorecer a transposição de mecanismos de resistência aos tratamentos antitumorais. Adicionalmente, os estudos *in vivo* em animais portadores de melanoma demonstram que o composto apresenta atividade antitumoral significativa, com baixa toxicidade encorajando a continuidade da pesquisa deste composto como um candidato a fármaco para o tratamento do câncer.

PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho indicam algumas perspectivas para o futuro:

- Avaliação histológica dos órgãos (fígado, rins, baço, coração, pulmão e cérebro) dos animais do estudo de toxicidade do SI-MF08;
- Avaliação histológica dos tumores dos animais do estudo de atividade antitumoral do SI-MF08;
- Realizar estudo de toxicidade *in vivo* com quimioterápico disponível no mercado para fins de comparação com resultados obtidos no estudo do SI-MF08;

REFERÊNCIAS

- ABBASI, N. R. et al. Early diagnosis of cutaneous melanoma: revisiting the ABCD criteria. **JAMA**, v. 292, n. 22, p. 2771–2776, 8 dez. 2004.
- AGUIRRE-GHISO, J. A. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 11, p. 834–846, nov. 2007.
- AHMAD, T. et al. Computational classification of mitochondrial shapes reflects stress and redox state. **Cell Death and Disease**, v. 4, n. 1, p. e461, 17 jan. 2013.
- ALLAN, R. D. et al. Structural analogues of ZAPA as GABA(A) agonists. **Neurochemistry International**, v. 30, n. 6, p. 583–591, jun. 1997.
- AMACHER, D. E. A toxicologist's guide to biomarkers of hepatic response. **Human & experimental toxicology**, v. 21, n. 5, p. 253–262, mai. 2002.
- AMIN, K.; DANNENFELSER, R. In vitro hemolysis: guidance for the pharmaceutical scientist. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 95, n. 6, p. 1173–1176, jun. 2006.
- ANVISA (Org.). **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=/asset_publisher/view_content&_101_assetEntryId=3274317&_101_type=document>. Acesso em: 05 mai. 2016.
- APPERLEY, J. F. Chronic myeloid leukaemia. **Lancet**, v. 385, n. 9976, p. 1447–59, 11 abr. 2015.

ARBER, D. A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2391–2406, mai. 2016.

ARRANGOIZ, R. Melanoma Review: Epidemiology, Risk Factors, Diagnosis and Staging. **Journal of Cancer Treatment and Research**, v. 4, n. 1, p. 1–15, abr. 2016.

ASHKENAZI, A. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 19, n. 3–4, p. 325–331, jun-ago. 2008.

ASSUNÇÃO, L. S. **Avaliação da citotoxicidade de derivados de sais de isotiourônio e tiazinodionas para estudo de leucemia *in vitro***. 2013. 107 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

BADAWI, A. M.; AZZAM, E. M. S.; MORSY, S. M. I. Surface and biocidal activity of some synthesized metallo azobenzene isothiuronium salts. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 24, p. 8661–8665, dez. 2006.

BAGULEY, Bruce C.. A brief history of cancer chemotherapy. In: BAGULEY, Bruce C.; KERR, David J. **Anticancer Drug Development**. San Diego: Elsevier, 2002. p. 1-9.

BANDARCHI, B. et al. From melanocyte to metastatic malignant melanoma. **Dermatology research and practice**, v. 2010, n. 1, p. 1–8, ago. 2010.

BARTOSH, T. J. et al. Cancer cells enter dormancy after cannibalizing mesenchymal stem/stromal cells (MSCs). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 42, p. e6447–e6456, out. 2016.

BELLA, M. DI; TAIT, A.; PARENTI, C. S-Aryl (tetramethyl) isothiuronium salts as possible antimicrobial agents, I. **Archiv der Pharmazie**, v. 456, p. 451–456, mai. 1986.

BENARD, G. et al. Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. **Journal of Cell Science**, v. 120, n. 5, p. 838–848, mar. 2007.

BERKELHAMMER, J. et al. Development of a new melanoma model in C57BL/6 mice. **Cancer Research**, v. 42, n. 8, p. 3157–3163, ago. 1982.

BERTRAM, J. S. The molecular biology of cancer. **Molecular aspects of medicine**, v. 21, n. 6, p. 167–223, dez. 2000.

BLAGOSKLONNY, M. V.; FOJO, T. Molecular effects of paclitaxel: Myths and reality (a critical review). **International Journal of Cancer**, v. 83, n. 2, p. 151–156, out. 1999.

BOELENS, J. et al. Chronic lymphocytic leukaemia. **Anticancer Research**, v. 29, n. 2, p. 605–615, fev. 2009.

BOISE, L. H. et al. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. **Cell**, v. 74, n. 4, p. 597–608, ago. 1993.

BOONE, L. et al. Selection and interpretation of clinical pathology indicators of hepatic injury in preclinical studies. **Veterinary clinical pathology**, v. 34, n. 3, p. 182–8, set. 2005.

BURGER, A. M.; FIEBIG, H.-H. **Preclinical Screening for New Anticancer Agents**. In: RUDEK, M. A. et al. (Eds.). Handbook of Anticancer Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. New York, NY: Springer, 2004. v. 38p. 23–38.

BURKE, V. P.; STARTZELL, J. M. The leukemias. **Oral and maxillofacial surgery clinics of North America**, v. 20, n. 4, p. 597–608, nov. 2008.

CALLACONDO-RIVA, D. et al. Actividad citotóxica del extracto etanólico de *Gnaphalium spicatum* “KETO KETO” en cultivos de líneas celulares Tumorales humanas. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v. 25, n. 4, p. 380–385, 2008.

CDER. Food And Drug Administration (Org.). **Guidance for Industry: Single Dose Acute Toxicity Testing**. 1996. Disponível em:

<<https://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm079270.pdf>>. Acesso em: 07 jun. 2016.

CHEN, T. et al. Taxol induces caspase-independent cytoplasmic vacuolization and cell death through endoplasmic reticulum (ER) swelling in ASTC-a-1 cells. **Cancer Letters**, v. 270, n. 1, p. 164–72, 18 out. 2008.

CHHIKARA, B. S. et al. Fatty acyl amide derivatives of doxorubicin: Synthesis and in vitro anticancer activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 6, p. 2037–2042, mar. 2011.

CHIKTE, S.; PANCHAL, N.; WARNES, G. Use of LysoTracker dyes: A flow cytometric study of autophagy. **Cytometry Part A**, v. 85, n. 2, p. 169–178, fev. 2014.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D.C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório : o camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 11–23, jun. 2007.

CHOUDHURY, D.; AHMED, Z. Drug-associated renal dysfunction and injury. **Nature clinical practice nephrology**, v. 2, n. 2, p. 80–91, fev. 2006.

CISILOTTO, J. et al. Isothiouonium salts reduce NRAS expression, induce apoptosis and decrease invasion of melanoma cells. **Anticancer Agents and Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 353–362, 2015.

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, mar. 2009.

COLIN, D. J. et al. Cellular responses to a prolonged delay in mitosis are determined by a DNA damage response controlled by Bcl-2 family proteins. **Open biology**, v. 5, n. 3, p. 140156, mar. 2015.

CONTENTE, T. C. et al. Association of daunorubicin to a lipid nanoemulsion that binds to low-density lipoprotein receptors enhances the antitumour action and decreases the toxicity of the drug in melanoma-bearing mice. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 66, n. 12, p. 1698–1709, ago. 2014.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860–867, dez. 2002.

CULLEN, J. M.; MILLER, R. T. The role of pathology in the identification of drug-induced hepatic toxicity. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 2, n. 2, p. 241–247, abr. 2006.

CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Caspase activation pathways: some recent progress. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, n. 7, p. 935–938, jul. 2009.

DEGTYAREV, M.; REICHEL, M.; LIN, K. Novel Quantitative Autophagy Analysis by Organelle Flow Cytometry after Cell Sonication. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e87707, 29 jan. 2014.

DENARDO, D. G.; ANDREU, P.; COUSSENS, L. M. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro-versus anti-tumor immunity. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 29, n. 2, p. 309–316, jun. 2010.

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

DEWYS, W. D. et al. Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. **The American Journal of Medicine**, v. 69, n. 4, p. 491–497, out. 1980.

DEXTER, D. L.; LEITH, J. T. Tumor heterogeneity , single-cell sequencing , and drug resistance. **Journal of Clinical Oncology**, v. 4, n. 2, p. 244–257, fev. 1986.

DJAVAHERI-MERGNY, M.; MAIURI, M. C.; KROEMER, G. Cross talk between apoptosis and autophagy by caspase-mediated cleavage of Beclin 1. **Oncogene**, v. 29, n. 12, p. 1717–1719, mar. 2010.

EICHHORST, B. et al. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 26, n. suppl 5, p. v78–v84, set. 2015.

EISENHAUER, E. et al. Phase I clinical trial design in cancer drug development. **Journal of clinical oncology**, v. 18, n. 3, p. 684–692, fev. 2000.

EL-HENAWY, A. A. et al. In vivo anti-leukemia, quantum chemical calculations and ADMET investigations of some quaternary and isothiuronium surfactants. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 5, p. 634–649, abr. 2013.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, jun. 2007.

EMA. **Guideline on repeated dose toxicity**. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/03/WC500079536.pdf>. Acesso em: 04 jul. 2016.

ENTIN, I. et al. Tumor growth retardation, cure, and induction of antitumor immunity in B16 melanoma-bearing mice by low electric field-enhanced chemotherapy. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 8, p. 3190–3197, ago. 2003.

ESTEY, E.; DÖHNER, H. Acute myeloid leukaemia. **The Lancet**, v. 368, n. 9550, p. 1894–1907, nov. 2006.

EVANS, W. J. et al. Cachexia: a new definition. **Clinical Nutrition**, v. 27, n. 6, p. 793–799, ago. 2008.

FAN, T. J. et al. Caspase family proteases and apoptosis. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 37, n. 11, p. 719–727, nov. 2005.

FDA. **Guidance for Industry: M3(R2) Nonclinical Safety Studies for the Conduct of human Clinical Trials and Marketig Authorization of Pharmaceuticals**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm073246.pdf>>. Acesso em: 25 jan. 2017.

FEARON, K. et al. Definition and classification of cancer cachexia: An international consensus. **The Lancet Oncology**, v. 12, n. 5, p. 489–495, fev. 2011.

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

FERNÁNDEZ, I. et al. Clinical biochemistry parameters in C57BL/6J mice after blood collection from the submandibular vein and retroorbital plexus. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 49, n. 2, mar. 2010.

FERRARA, F.; SCHIFFER, C. A. Acute myeloid leukaemia in adults. **The lancet**, v. 381, n. 9865, p. 484–95, 9 fev. 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, dez. 2013.

FERREIRA, M. et al. Allylic isothiuronium salts: The discovery of a novel class of thiourea analogues with antitumor activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, fev. 2017.

FIDLER, I. J. Tumor Heterogeneity and the Biology of Cancer Invasion and Metastasis. **Cancer**, v. 38, p. 2651–2660, 1978.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique**. Nova Iorque: Wiley-Blackwell, 1987.

FRIBERG, L. E. et al. Model of chemotherapy-induced myelosuppression with parameter consistency across drugs. **Journal of Clinical Oncology**, v. 20, n. 24, p. 4713–4721, dez. 2002.

FRIEDL, P.; ALEXANDER, S. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. **Cell**, v. 147, n. 5, p. 992–1009, 23 nov. 2011.

FRIEDMAN, R. J.; RIGEL, D. S.; KOPF, A. W. Early detection of malignant melanoma: the role of physician examination and self-examination of the skin. **CA**, v. 35, n. 3, p. 130–51, 1 mai-jun. 1985.

FULDA, S.; DEBATIN, K.-M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**, v. 25, n. 34, p. 4798–811, 7 ago. 2006.

GANELLI, C. R. et al. Imetit and N-methyl derivatives. The transition from potent agonist to antagonist at histamine H3 receptors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 2, n. 10, p. 1231–1234, out. 1992.

GERAN, R. I. et al. **Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems**. 3. ed. Bethesda: National Institute of Health, 1972.

GHIA, P.; FERRERI, A. J. M.; CALIGARIS-CAPPIO, F. Chronic lymphocytic leukemia. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 64, n. 3, p. 234–246, dez. 2007.

GLICK, D.; BARTH, S.; MACLEOD, K. F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. **The Journal of pathology**, v. 221, n. 1, p. 3–12, mai. 2010.

GOLDIN, A. et al. Current results of the screening program at the division of cancer treatment, National Cancer Institute. **European Journal of Cancer**, v. 17, p. 129–142, fev. 1981.

GOTTLIEB, E. et al. Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, v. 10, p. 709–717, jun. 2003.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 851–857, fev. 2007.

GREGORCZYK, K. P. et al. Changes in the mitochondrial network during ectromelia virus infection of permissive L929 cells. **Acta Biochimica Polonica**, v. 61, n. 1, p. 171–7, mar. 2014.

GRIBALDO, L. et al. **Acute toxicity**. Disponível em: <http://ec.europa.eu/geninfo/query/index.do?queryText=13101&summary=summary&more_options_source=global&more_options_date=* &more_options_date_from=&more_options_date_to=&more_options_language=en&more_options_f_formats=* &swlang=en>. Acesso em: 3 ago. 2016.

GRIGORIAN, A.; O'BRIEN, C. B. Hepatotoxicity secondary to chemotherapy. **Journal of Clinical Translational Hepatology**, v. 2, p. 95–102, jun. 2014.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883–899, mar. 2010.

GROSS, A.; MCDONNELL, J. M.; KORSMEYER, S. J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. **Genes & Development**, v. 13, n. 15, p. 1899–1911, 1 ago. 1999.

GUO, W. J. et al. Taxol induces concentration-dependent apoptotic and paraptosis-like cell death in human lung adenocarcinoma (ASTC-a-1) cells. **Journal of X-ray science and technology**, v. 18, n. 3, p. 293–308, 2010.

HAIJHASSAN, Z.; RABBANI-CHADEGANI, A. Studies on the binding affinity of anticancer drug mitoxantrone to chromatin, DNA and histone proteins. **Journal of Biomedical Science**, v. 16, n. 31, p. 1–7, mar. 2009.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, mar. 2011.

HARHAJI-TRAJKOVIC, L. et al. AMPK-mediated autophagy inhibits apoptosis in cisplatin-treated tumour cells. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 13, p. 3644–3654, set. 2009.

HARTWELL, L. H.; WEINERT, T. A. Checkpoints : control that ensure the order of cell cycles events. **Science**, v. 246, p. 629–633, nov. 1989.

HEEREMA-MCKENNEY, A.; ARBER, D. A. Acute myeloid leukemia. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 23, n. 4, p. 633–654, ago. 2009.

HEGDE, G. V. et al. Residual tumor cells that drive disease relapse after chemotherapy do not have enhanced tumor initiating capacity. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, out. 2012.

HEHLMANN, R.; HOCHHAUS, A.; BACCARANI, M. Chronic myeloid leukaemia. **The lancet**, v. 370, n. 1, p. 342–350, jul. 2007.

HOLLINGSHEAD, M. G. Antitumor efficacy testing in rodents. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 100, n. 21, p. 1500–1510, nov. 2008.

HOTCHKISS, R. S. et al. Cell death in disease: mechanisms and emerging therapeutic concepts. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 16, p. 1570–1583, out. 2009.

HUANG, D. C. S. et al. Activation of Fas by FasL induces apoptosis by a mechanism that cannot be blocked by Bcl-2 or Bcl-xL. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 26, p. 14871–14876, dez. 1999.

IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. **Nature reviews Cancer**, v. 2, n. 4, p. 277–88, abr. 2002.

INABA, H.; GREAVES, M.; MULLIGHAN, C. G. Acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet**, v. 381, n. 9881, p. 1943–1955, mar. 2013.

INCA. **Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>>. Acesso em: 03 fev. 2017.

IWAI, N. et al. Structure-Activity Relationship Study of the Bacterial Actin-Like Protein MreB Inhibitors: Effects of Substitution of Benzyl Group in S²-Benzylisothiourea. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 71, n. 1, p. 246–248, jan. 2007.

JANUMYAN, Y. M. Bcl-xL/Bcl-2 coordinately regulates apoptosis, cell cycle arrest and cell cycle entry. *The EMBO Journal*, v. 22, n. 20, p. 5459–5470, out. 2003.

JOHANSSON, B.; HARRISON, C. J. **Acute Myeloid Leukemia**. In: HEIM, S.; MITELMAN, F. (Eds.). *Cancer Cytogenetics: Chromosomal and Molecular Genetic Aberrations of Tumor Cells*. 4. ed. New Jersey: Wiley, 2015. p. 62–125.

JUNG, J. Human tumor xenograft models for preclinical assessment of anticancer drug development. **Toxicological Research**, v. 30, n. 1, p. 1–5, mar. 2014.

KANZAWA, T. et al. Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. **Cell Death and Differentiation**, v. 11, n. 4, p. 448–457, abr. 2004.

KASUGA, I. et al. Tumor-related leukocytosis is linked with poor prognosis in patients with lung carcinoma. **Cancer**, v. 92, n. 9, p. 2399–2405, nov. 2001.

KAUFMANN, S. H.; EARNSHAW, W. C. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. **Experimental cell research**, v. 256, n. 1, p. 42–9, 10 abr. 2000.

KING, K. L.; CIDLOWSKI, J. A. Cell Cycle and Apoptosis: Common Pathways to Life and Death. **Journal of cellular biochemistry**, v. 180, p. 175–180, jun. 1995.

KING, P. D. Hepatotoxicity of Chemotherapy. **The Oncologist**, v. 6, n. 2, p. 162–176, abr. 2001.

KINTZEL, P. E. Anticancer Drug – Induced Kidney Disorders Incidence, Prevention and Management. **Drug Safety**, v. 24, n. 1, p. 19–38, fev. 2001.

KLEE, M.; PIMENTEL-MUIÑOS, F. X. Bcl-X L specifically activates Bak to induce swelling and restructuring of the endoplasmic reticulum. **The Journal of Cell Biology**, v. 168, n. 5, p. 723–734, fev. 2005.

KOMESHIMA, N.; TSURUO, T.; UMEZAWA, H. Antitumor activity of new morpholino anthracyclines. **The Journal of antibiotics**, v. 41, n. 4, p. 548–553, abr. 1988.

KORONKIEWICZ, M. et al. Proapoptotic effects of new pentabromobenzyliothiuronium salts in a human prostate adenocarcinoma cell line. **Acta poloniae pharmaceutica**, v. 69, n. 6, p. 1325–1333, nov-dez. 2012.

KORONKIEWICZ, M. et al. New benzimidazole-derived isothiourreas as potential antileukemic agents - studies in vitro. **Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 4, p. 364–372, 29 abr. 2015.

KORONKIEWICZ, M.; CHILMONCZYK, Z.; KAZIMIERCZUK, Z. Proapoptotic effects of novel pentabromobenzylisothiouras in human leukemia cell lines. **Medicinal chemistry research**, v. 21, n. 10, p. 3111–3118, out. 2012.

KOTTKE, T. et al. Detecting and targeting tumor relapse by its resistance to innate effectors at early recurrence. **Nature medicine**, v. 19, n. 12, p. 1625–31, jul. 2013.

KRAKHMAL, N. V et al. Cancer invasion: patterns and mechanisms. **Acta naturae**, v. 7, n. 2, p. 17–28, abr-jun. 2015.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological reviews*, v. 87, n. 1, p. 99–163, jan. 2007.

KROEMER, G.; MARIÑO, G.; LEVINE, B. Autophagy and the Integrated Stress Response. **Molecular Cell**, v. 40, n. 2, p. 280–293, out. 2010.

KRUCZYNSKI, A.; HILL, B. T. Classic in vivo cancer models: three examples of mouse models used in experimental therapeutics. **Current protocols in pharmacology**, p. 5.24.1-5.24.16, fev. 2002.

KRZYZANIAK, J. F. et al. Lysis of human red blood cells. 4. Comparison of in vitro and in vivo hemolysis data. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, n. 11, p. 1215–1217, nov. 1997.

KUMAR, A. et al. Abstract 4470: KevetrinTM, a novel small molecule, activates p53, enhances expression of p21, induces cell cycle arrest and apoptosis in a human cancer cell line. **Cancer Research**, v. 71, s. 8, p. 4470–4470, abr. 2011.

KUZU, O. F. et al. Current State of Animal (Mouse) Modeling in Melanoma Research. **Cancer growth and metastasis**, v. 8, s.1, p. 81–94, out. 2015.

LASA/NC3RS, 2009, Londres. **Guidance on dose level selection for regulatory general toxicology studies for pharmaceuticals**. Londres: LASA/NC3RS, 2009. 36 p. Disponível em:

<<http://www.lasa.co.uk/pdf/lasa-nc3rsdoselevelselection.pdf>>. Acesso em: 10 jul. 2016.

LEE, W. M. Acute liver failure in the United States. **Seminars in Liver Disease**, v. 23, n. 3, p. 217–226, ago. 2003.

LEVINE, B.; KROEMER, G. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. **Cell**, v. 132, n. 1, p. 27–42, jan. 2008.

LI, H. et al. Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. **Cell**, v. 94, n. 4, p. 491–501, ago. 1998.

LI, Y. et al. Suppression of cancer relapse and metastasis by inhibiting cancer stemness. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 6, p. 1839–1844, fev. 2015.

LIPPI, G. et al. Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 44, n. 3, p. 311–316, mar. 2006.

LIU, X.; HAJNÓCZKY, G. Altered fusion dynamics underlie unique morphological changes in mitochondria during hypoxia-reoxygenation stress. **Cell death and differentiation**, v. 18, n. 10, p. 1561–72, out. 2011.

LÓPEZ-LÁZARO, M. A simple and reliable approach for assessing anticancer activity in vitro. **Current Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 11, p. 1324–1334, 2015.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, nov. 1951.

LU, S. et al. Efficacy of simple short-term in vitro assays for predicting the potential of metal oxide nanoparticles to cause pulmonary inflammation. **Environmental Health Perspectives**, v. 117, n. 2, p. 241–247, fev. 2009.

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

MACKIE, R. M. Clinical recognition of early invasive malignant melanoma. **BMJ**, v. 301, n. 6759, p. 1005–1006, nov. 1990.

MAOR, Y.; MALNICK, S. Liver injury induced by anticancer chemotherapy and radiation therapy. **International journal of hepatology**, v. 2013, p. 1–8, mai. 2013.

MARQUEZ, Rebeca T. et al. Drug resistance and molecular cancer therapy: apoptosis versus autophagy. In: RUDNER, Justine. **Apoptosis**. Rijeka: Intech, 2013. p. 155-196. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/apoptosis/drug-resistance-and-molecular-cancer-therapy-apoptosis-versus-autophagy>>. Acesso em: 25 jun. 2016.

MARTIN, T. et al. **Madame Curie Bioscience Database**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK164700/>>. Acesso em: 27 fev. 2017.

MARUSYK, A.; POLYAK, K. Tumor heterogeneity: causes and consequences. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1805, n. 1, p. 105–117, jan. 2010.

MAVERAKIS, E. et al. Metastatic melanoma – a review of current and future treatment options. **Acta dermato-venereologica**, v. 95, n. 5, p. 516–524, mai. 2015.

MAZZACCARA, C. et al. Age-related reference intervals of the main biochemical and hematological parameters in C57BL/6J, 129SV/EV and C3H/HeJ mouse strains. **PLoS ONE**, v. 3, n. 11, p. 10–15, nov. 2008.

MCKINNEY, A. J.; HOLMEN, S. L. Animal models of melanoma: a somatic cell gene delivery mouse model allows rapid evaluation of genes implicated in human melanoma. **Chinese Journal of Cancer**, v. 30, n. 3, p. 153–162, mar. 2011.

MELO, J. V.; HUGHES, T. P.; APPERLEY, J. F. Chronic myeloid leukemia. **Hematology**, v. 2003, n. 1, p. 132–152, jan. 2003.

MIZUSHIMA, N. Autophagy: process and function. **Genes & Development**, v. 21, n. 22, p. 2861–2873, 15 nov. 2007.

MOCAN, T. Hemolysis as expression of nanoparticles-induced cytotoxicity in red blood cells. **Biotechnology, molecular biology and nanomedicine**, v. 1, n. 1, p. 7–12, out. 2013.

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, dez. 1983.

MURRAY, A. Cell cycle checkpoints. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 6, p. 872–876, dez. 1994.

NCI. NCI dictionary of cancer terms. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=306510>>. Acesso em: 28 fev. 2017a.

NCI. Types of treatment. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>>. Acesso em: 15 fev. 2017b.

NOBILI, S. et al. Pharmacological strategies for overcoming multidrug resistance. **Current drug targets**, v. 7, n. 7, p. 861–879, jul. 2006.

NODA, N. N.; INAGAKI, F. Mechanisms of autophagy. **Annual Review of Biophysics**, v. 44, n. 1, p. 101–122, fev. 2015.

NUFFIELD COUNCIL OF BIOETHICS. **Animal use in toxicity studies**. In: The Ethics of Research Involving Animals. Nuffield C ed. London: Nuffield Council on Bioethics, 2015.

O'DONNELL, M. R. et al. NCCN clinical practice guidelines: acute myeloid leukemia. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 10, n. 8, p. 984–1021, ago. 2012.

O'NEILL, J.; HOCKENBERY, D. Bcl-2-related proteins as drug targets. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 16, p. 1553–1562, ago. 2003.

OECD, 2001a, França. **OECD Guideline for Testing on Chemicals: Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure (420)**. França: Organisation For

Economic Co-operation And Development, 2001. 14 p. Disponível em: <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/fedddocs/oced/oced_gl420.pdf>. Acesso em: 05 jun. 2016.

OECD, 2001b, França. **OECD Guideline for Testing on Chemicals: . Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method (423)**. França: Organisation For Economic Co-operation And Development, 2001. 14 p. Disponível em: <<http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948370.pdf>>. Acesso em: 05 jun. 2016.

OECD, 2008, França. **OECD Guideline for Testing on Chemicals: Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents (407)**. França: Organisation For Economic Co-operation And Development, 2008. 13 p. Disponível em: <<https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/fedddocs/oced/ocedtg407-2008.pdf>>. Acesso em: 05 jun. 2016.

ONCIU, M. Acute Lymphoblastic Leukemia. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 23, n. 4, p. 655–674, ago. 2009.

ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B.; NICOTERA, P. Regulation of cell death: the calcium–apoptosis link. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 7, p. 552–565, jul. 2003.

ORTH, J. D. et al. Prolonged mitotic arrest triggers partial activation of apoptosis, resulting in DNA damage and p53 induction. **Molecular Biology of the Cell**, v. 23, n. 4, p. 567–576, fev. 2012.

OVERWIJK, W. W.; RESTIFO, N. P. B16 as a Mouse Model for Human Melanoma. **Current protocols in immunology**, s. 39, p. 20.1.1-20.1.29, mai. 2000.

PANTALEÃO, C.; LUCHS, A. Câncer e modelos experimentais de tumores murinos. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 4, p. 439–445, out. 2010.

PARASURAMAN, S. Toxicological screening. **Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics**, v. 2, n. 2, p. 74–79, abr. 2011.

PARKER, C. et al. Effect of mitoxantrone on outcome of children with first relapse of acute lymphoblastic leukaemia (ALL R3): an open-label randomised trial. **The Lancet**, v. 376, n. 9757, p. 2009–2017, dez. 2010.

PATEL, K. J.; TRÉDAN, O.; TANNOCK, I. F. Distribution of the anticancer drugs doxorubicin, mitoxantrone and topotecan in tumors and normal tissues. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 72, n. 1, p. 127–138, mai. 2013.

PATTINGRE, S.; LEVINE, B. Bcl-2 Inhibition of autophagy: a new route to cancer? **Cancer Research**, v. 66, n. 6, p. 2885–2888, mar. 2006.

PIERZYŃSKA-MACH, A.; JANOWSKI, P. A.; DOBRUCKI, J. W. Evaluation of acridine orange, LysoTracker Red, and quinacrine as fluorescent probes for long-term tracking of acidic vesicles. **Cytometry Part A**, v. 85, n. 8, p. 729–737, ago. 2014.

PIETENPOL, J. A.; STEWART, Z. A. Cell cycle checkpoint signaling : cell cycle arrest versus apoptosis. **Toxicology**, v. 181–182, p. 475–481, dez. 2002.

PLOWMAN, J. et al. **Human Tumor Xenograft Models in NCI Drug Development**. In: TEICHER, B. A. (Ed.). *Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval*. Totowa, NJ: Humana Press, 1997. p. 101–125.

POMMIER, Y. et al. Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks. **Oncogene**, v. 23, n. 16, p. 2934–2949, abr. 2004.

PORTT, L. et al. Anti-apoptosis and cell survival: a review. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1813, n. 1, p. 238–259, jan. 2011.

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

QUIMBY, F. W.; LUONG, R. H. **Chapter 6 - Clinical Chemistry of the Laboratory Mouse**. In: FOX, J. G. et al. (Eds.) . *The Mouse in Biomedical Research (Second Edition)*. Burlington: Academic Press, 2007. p. 171–216.

RAJAKARUNA, G. K. Drug-induced acute kidney injury. **Adverse Drug Reaction Bulletin**, v. 11, n. 6, p. 939–942, ago. 2007.

RAM, B. M.; RAMAKRISHNA, G. Endoplasmic reticulum vacuolation and unfolded protein response leading to paraptosis like cell death in cyclosporine A treated cancer cervix cells is mediated by cyclophilin B inhibition. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1843, n. 11, p. 2497–2512, nov. 2014.

RAMAIAH, S. K. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 9, p. 1551–1557, jun. 2007.

REED, J. C. Apoptosis-based Therapies. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 2, p. 111–121, fev. 2002.

REED, J. C.; PELLECCCHIA, M. Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies. **Blood**, v. 106, n. 2, p. 408–418, jul. 2005.

REGAN, B.; GALYSH, F. T.; MORRIS, R. N. The 2-Thiopseudourea Moiety, a New Local Anesthesiophore. **Journal of medicinal chemistry**, v. 396, n. 4, p. 1965–1968, jul. 1967.

RIEDL, S. J.; SHI, Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 11, p. 897–907, nov. 2004.

RUKA, W. et al. Alterations of routine blood tests in adult patients with soft tissue sarcomas: relationships to cytokine serum levels and prognostic significance. **Annals of Oncology**, v. 12, n. 10, p. 1423–1432, out. 2001.

RUSSELL, P. Checkpoints on the road to mitosis. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 23, n. 10, p. 399–402, out. 1998.

SÁ, M. M. et al. Exploring the reaction of multifunctional allylic bromides with N,S-dinucleophiles: isothiuronium salts and analogs as useful motifs to assemble the 1,3-thiazine core. **Arkivoc**, p. 303–321, 2010.

SAEKI, K. et al. Bcl-2 down-regulation causes autophagy in a caspase-independent manner in human leukemic HL60 cells. **Cell death and differentiation**, v. 7, n. 12, p. 1263–1269, dez. 2000.

SALAMA, M. A. et al. Original Research Article S-Benzyl Isothiouonium salts of some Sulfonylureas as potential herbicides. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, n. 12, p. 337–342, 2015.

SANCÉAU, J. et al. Strong inhibition of Ewing tumor xenograft growth by combination of human interferon-alpha or interferon-beta with ifosfamide. **Oncogene**, v. 21, n. 50, p. 7700–7709, out. 2002.

SAWYERS, C. L. Chronic myeloid leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 17, p. 1330–1340, abr. 1999.

SAYERS, T. J. Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v. 60, n. 8, p. 1173–1180, ago. 2011.

SCHADENDORF, D. et al. Melanoma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. 1, p. 1–20, abr. 2015.

SHAIN, A. H.; BASTIAN, B. C. From melanocytes to melanomas. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 6, p. 345–358, jun. 2016.

SHAPIRO, G. et al. A phase 1, dose-escalation, safety, pharmacokinetic, pharmacodynamic study of thioureidobutyronitrile, a novel p53 targeted therapy, in patients with advanced solid tumors. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 15, 2015.

SHARMA, A. et al. Chemotherapy induced liver abnormalities: an imaging perspective. **Clinical and molecular hepatology**, v. 20, n. 3, p. 317–326, set. 2014.

SILVA, V. C. et al. A delay prior to mitotic entry triggers caspase 8-dependent cell death in p53-deficient HeLa and HCT-116 cells. **Cell Cycle**, v. 14, n. 7, p. 1070–1081, abr. 2015.

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

STENNICKE, H. R. et al. Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 42, p. 27084–27090, out. 1998.

SUCKOW, M.; DANNEMAN, P.; BRAYTON, C. **The laboratory mouse**. Washington: CRC, 2001.

SUI, X. et al. Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. **Cell Death and Disease**, v. 4, n. 10, p. e838, out. 2013.

SZEGEZDI, E. et al. Bcl-2 family on guard at the ER. **Cell Physiology**, v. 296, n. 5, p. C941-C953, mai. 2009.

TALMADGE, J. E. et al. Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. **The American journal of pathology**, v. 170, n. 3, p. 793–804, mar. 2007.

TAMBA, B. et al. Determination of drug toxicity in animals. In: DIMOFTE, G.; RADU, I. **Experimental models in rodents: from concept to troubleshooting**. România: Univerity Of Medicine and Pharmacy Iași, 2013. Cap. 15. p. 231-260. Disponível em: <[http://webmail.umfiasi.ro/Cercetare/CentreDeCercetare/Documents/Carte Experimental models in rodents/15.pdf](http://webmail.umfiasi.ro/Cercetare/CentreDeCercetare/Documents/Carte%20Experimental%20models%20in%20rodents/15.pdf)>. Acesso em: 25 maio 2016.

TANAKA, R. et al. Triple paraneoplastic syndrome of hypercalcemia, leukocytosis and cachexia in two human tumor xenografts in nude mice. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 2, abr. 1996.

TRANI, A. et al. Thioureas and isothioronium salts of the aglycone of teicoplanin. **Journal of Microbiology**, v. 62, n. 8, p. 1268-1275, ago. 1989.

TSUJIMOTO, Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? **Genes to cells**, v. 3, n. 11, p. 697–707, nov. 1998.

TSUJIMOTO, Y.; SHIMIZU, S. Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. **Apoptosis**, v. 12, n. 5, p. 835–840, 2007.

TURKSON, J. **Cancer Drug Discovery and Anticancer Drug Development**. In: COLEMAN, W. B.; TSONGALIS, G. J. (Eds.). *The Molecular Basis of Human Cancer*. New York: Springer, 2017. p. 695–707.

URRA, H.; HETZ, C. The ER in 4D: a novel stress pathway controlling endoplasmic reticulum membrane remodeling. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, n. 12, p. 1893–1895, dez. 2012.

VANDER HEIDEN, M. G. et al. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. **Cell**, v. 91, n. 5, p. 627–637, nov. 1997.

VARDIMAN JW, THIELE J, A. D. E. A. The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood**, v. 114, n. 5, p. 937–952, jul. 2009.

VENDITTI, J. M. Preclinical drug development: rationale and methods. **Seminars in Oncology**, v. 8, n. 4, p. 349–361, ago. 2016.

VENKATACHALAM, T. et al. Stereochemistry as a determinant of the anti-leukemic potency of halopyridyl and thiazolyl thiourea compounds. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 4, n. 5, p. 318–326, jul. 2007.

VENKATACHALAM, T. K.; MAO, C.; UCKUN, F. M. Effect of stereochemistry on the anti-HIV activity of chiral thiourea compounds. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 15, p. 4275–4284, ago. 2004.

VERMEULEN, K., VAN BOCKSTAELE, D. R., BERNEMAN, Z. N. et al. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, v. 36, n. 3, p. 131–149, jun. 2003.

VITALE, I. et al. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 6, p. 385–392, jun. 2011.

VOGLER, M. et al. BCL2/BCL-XL inhibition induces apoptosis, disrupts cellular calcium homeostasis, and prevents platelet activation. **Blood**, v. 117, n. 26, p. 7145–7154, jun. 2011.

VON BUBNOFF, N.; DUYSER, J. Chronic myelogenous leukemia: treatment and monitoring. **Deutsches Arzteblatt international**, v. 107, n. 7, p. 114–121, fev. 2010.

WAHL, A. F. et al. Loss of normal p53 function confers sensitization to Taxol by increasing G2/M arrest and apoptosis. **Nature Medicine**, v. 2, n. 1, p. 72–79, an. 1996.

WAJANT, H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. **Science**, v. 296, n. 5573, p. 1635–1636, mai. 2002.

WALCZAK, H.; KRAMMER, P. H. The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. **Experimental Cell Research**, v. 256, n. 1, p. 58–66, abr. 2000.

WANG, C.; YOULE, R. J. The role of mitochondria in apoptosis. **Annual Review of Genetics**, v. 43, n. 1, p. 95–118, dez. 2009.

WANG, T. H.; WANG, H. S.; SOONG, Y. K. Paclitaxel-induced cell death: where the cell cycle and apoptosis come together. **Cancer**, v. 88, n. 11, p. 2619–2628, jun. 2000.

WANG, Y.; PROBIN, V.; ZHOU, D. Cancer therapy-induced residual bone marrow injury-Mechanisms of induction and implication for therapy. **Current cancer therapy reviews**, v. 2, n. 3, p. 271–279, ago. 2006.

WHITEMAN, D. C.; PAVAN, W. J.; BASTIAN, B. C. The melanomas: a synthesis of epidemiological, clinical, histopathological, genetic, and biological aspects, supporting distinct subtypes, causal pathways, and cells of origin. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 24, n. 5, p. 879–897, out. 2011.

UNDP; WORLD BANK; WHO. **Non-clinical safety testing handbook**. Genebra: TDR/WHO, 2004. 125 p. Disponível em:

<http://www.who.int/tdr/publications/documents/safety_handbook.pdf>.
Acesso em: 18 jun. 2016.

WHO. **World Cancer Report 2014**. Lyon: IARC, 2014. Disponível em:
<<https://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2003/WorldCancerReport.pdf>>. Acesso em: 18 out. 2016. WHO.
Cancer. Disponível em:
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 5 mar.
2017.

XU, J.; MAO, W. Overview of Research and Development for Anticancer Drugs. **Journal of Cancer Therapy**, v. 7, n. 10, p. 762–772, out. 2016.

YIP, K. W.; REED, J. C. Bcl-2 family proteins and cancer. **Oncogene**, v. 27, n. 50, p. 6398–6406, 27 out. 2008.

YOULE, R. J.; STRASSER, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 1, p. 47–59, jan. 2008.

ZEESHAN, H. et al. Endoplasmic Reticulum Stress and Associated ROS. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 327, mar. 2016.

ZELLMER, V. R. et al. Evolving concepts of tumor heterogeneity. **Cell & Bioscience**, v. 4, n. 1, p. 69, nov. 2014.

ZHAO, J. Cancer stem cells and chemoresistance: The smartest survives the raid. **Pharmacology & therapeutics**, v. 160, p. 145–58, abr. 2016.

APÊNDICE A – Artigo publicado na revista **European Journal of Medicinal Chemistry**



European Journal of Medicinal Chemistry

Volume 129, 31 March 2017, Pages 151–158



Short communication

Allylic isothiuronium salts: The discovery of a novel class of thiourea analogues with antitumor activity

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

 **Show more**

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.02.013>

[Get rights and content](#)

APÊNDICE B – Artigos a serem submetidos

Planilha 1 – Artigos em desenvolvimento para submissão

Revista	Título do artigo e autores
<i>Chemico-Biological Interactions</i>	<p>Antitumor activity of methyl (Z)-2-(isothioureidomethyl)-2-pentenoate hydrobromide through mitotic arrest and extrinsic apoptotic pathway in leukemia cell lines</p> <p>Laura Sartori Assunção, Iara Kretzer, Jelver Alexander Sierra Restrepo, Misael Ferreira, Macus Mandolesi Sá, Tânia Beatriz Creczynski-Pasa</p>
<i>Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry</i>	<p>Methyl (Z)-2-(isothioureidomethyl)-3-(4-methoxyphenyl)-2-propenoate hydrobromide induces ROS stress leading to autophagy and cell death in cancer cell lines</p> <p>Laura Sartori Assunção, Iara Kretzer, Jelver Alexander Sierra Restrepo, Leônidas João de Mello Junior , Misael Ferreira, Macus Mandolesi Sá, Tânia Beatriz Creczynski- Pasa</p>
<i>Journal of Pharmacy and Pharmacology</i>	<p>The antitumor effect of methyl (Z)-2-(isothioureidomethyl)-2-pentenoate hydrobromide in preclinical study</p> <p>Laura Sartori Assunção, Iara Kretzer, Anne Nathalie Prigol, Marjorie Marin, Evelize Maria Nazari, Claudia Albuquerque, Misael Ferreira, Macus Mandolesi Sá, Tânia Beatriz Creczynski- Pasa</p>

Fonte: desenvolvido pelo autor

ANEXO A – Parecer do comitê de ética no uso de animais.

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo

PP0892

Título

Avaliação das propriedades antitumorais e antiadipogênicas de compostos sintéticos, semisintéticos e nanoestruturados: estudos agudos e subagudos

Data de Entrada

17/10/2013

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

01/11/2013

Considerações

Ofício nº 121/CEUA/PROPESQ/2013

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Tânia Beatriz Creczynki Pasa, Departamento de Farmácia - CCS

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por quatro anos, para a utilização de um mil e seiscentos camundongos (*Mus musculus*).

- Procedência do animal: Biotério Central da UFSC e laboratórios de modelos biológicos.

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 13/02/2018

Data 13/11/2013

Parecer(es):

Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE