

Universidade Federal de Pernambuco

Centro de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica/PPGIT

Jeyce Kelle Ferreira de Andrade

Avaliação da atividade anticâncer da nitrofurantoína e de seus novos
derivados

UFPE – Recife

2013

Jeyce Kelle Ferreira de Andrade

**Avaliação da atividade anticâncer da nitrofurantoina e de seus novos
derivados**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Desenvolvimento Pré-clínico de Produtos Bioativos.

ORIENTADORA

Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva

CO-ORIENTADORES

Prof^a Dr^a Gardênia Carmem Gadelha Militão

Prof. Dr. Manoel Adrião Gomes Filho

UFPE – Recife

2013

Catálogo na Fonte:

Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

A553a Andrade, Jeyce Kelle Ferreira de

Avaliação da atividade anticâncer da nitrofurantoína e de seus novos derivados / Jeyce Kelle Ferreira de Andrade. – Recife: O Autor, 2013.

77 f. : il., fig., tab.

Orientadora: Teresinha Gonçalves da Silva

Coorientadores: Gardênia Carmem Gadelha Militão; Manoel Adrião Gomes Filho

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Inovação Terapêutica, 2013.

Inclui bibliografia

1. Farmacologia 2. Câncer – Tratamento 3. Toxicologia I. Silva, Teresinha Gonçalves da (orientadora) II. Militão, Gardênia Carmem Gadelha (coorientadora) III. Gomes Filho, Manoel Adrião IV. Título.

615.1

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2013-194

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Souza Ramos

DIRETORIA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profª Drª Maria Eduarda Lazarrábal

VICE-DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profª Drª Oliane Maria Correia Magalhães

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO
TERAPÊUTICA**

Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO
TERAPÊUTICA**

Prof. Dr. Luiz Alberto de Lira Soares

DEDICATÓRIA

*A minha filha Maria Flor que veio ao mundo durante
esse período tão atribulado que é o mestrado,
para dá a minha vida um novo sentido.
Um amor sem medida, arrebatador!!*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar a vida e todas as experiências maravilhosas que passei, por me iluminar e abençoar minhas escolhas e por me dar força através da minha fé para sempre seguir em frente e obter sucesso.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a Teresinha Gonçalves da Silva, pela oportunidade que me foi dada, pela dedicação, orientação e amizade. Seus valiosos conhecimentos contribuem para minha formação e futuro.

Aos meus pais, Jairo e Janeide, pelo amor, carinho e educação que me prestaram. Obrigada pelo incentivo e palavras de consolo. Por vocês eu cheguei até aqui e para vocês que continuarei a seguir.

Aos meus irmãos lindos, que por muitas vezes pude recorrer e sempre tive amparo. Muito obrigada Jaira, Joyce e Jefferson, pelo carinho e companhia.

Aos meus familiares por apoiarem, por falarem de mim com orgulho e carinho. Vocês também são responsáveis por minhas conquistas.

Ao meu amigo, amor e companheiro Junior, por sempre demonstrar interesse pelos meus planos, acompanhar minhas conquistas e alimentar meus sonhos.

Aos meus amigos da graduação Diógenes, Ludmylla, Mariana, Luana e Cínthis por fazerem parte da minha história e pelo carinho e amizade. Vocês fazem parte do meu alicerce.

Ao meu amigo, orientador de iniciação científica e co-orientador Manoel Adrião, pelas horas de dedicação e carinho, por me transmitir conhecimentos valiosos e por me indicar a professora Teresinha.

A minha co-orientadora professora Gardênia pela paciência e dedicação para a realização deste trabalho.

A Técnica em Laboratório Suzete Mendonça, pelo seu carinho, companheirismo, por está sempre disposta a ajudar.

A minha amiga e companheira de Laboratório Maria Rodrigues, por ser solícita, por dividir experimentos, material de estudo, por me ajudar na execução das minhas tarefas no laboratório e, por estar presente nos momentos de descontração, sorrir comigo e me passar conhecimento valiosos.

Aos doutorandos do LBPF André, Jailson, Aline, Eduardo, Tonny, Tatiane e Iane pela paciência, amizade, colaboração nos experimentos, consultoria de informática e horas de muitas risadas.

Aos Mestrandos do LBPF, em especial Larissa, Anne, Fernanda, Temístocles, Sandrine e Jamilka pela amizade, colaboração.

Aos alunos de iniciação científica do LBPF, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho, pela amizade, apoio e incentivo, pelos almoços, jantares, lanches, horas e horas de convívio.

Ao amigo do FAMA, Diogo pela colaboração no trabalho amizade e companheirismo.

Ao professor Dalci Brondani, do Laboratório de Síntese de Fármacos (LABSINFA), Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, por fornecer as moléculas de estudo deste trabalho.

A todos que fazem parte do Departamento de Antibióticos, por ceder o espaço para minha pesquisa.

Aos meus colegas PPGITEanos, pelo convívio agradável, por compartilhar conhecimentos e por fazerem parte da minha formação acadêmica.

A todos que fazem parte do Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica pelo convívio e disponibilidade em atender minhas solicitações.

À coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível (CAPES), pelo incentivo e apoio financeiro.

A todos, muito obrigada!

RESUMO

Atualmente o câncer é considerado uma doença genética, pois durante seu desenvolvimento as células passam por diversas instabilidades genômicas sendo considerada a segunda causa de morte no mundo. A nitrofurantoína é um derivado nitrofurano hindantoínico amplamente utilizado no tratamento de infecções do trato urinário, cujo mecanismo de ação ainda não está muito bem definido. Neste trabalho foram realizados testes citotóxicos da nitrofurantoína e quatro novos derivados n-alquilados em linhagens de células cancerígenas. O ensaio de citotoxicidade foi feito através do teste do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium) e as ferramentas utilizadas para avaliação do mecanismo de ação incluíram o teste de exclusão do azul de tripan, análise morfológica por coloração May-Grunwald-Giemsa, microscopia de fluorescência através da marcação com anexina V/Iodeto de propídeo, análise da fragmentação do DNA pelo teste do DNA *Ladder* e análise da expressão de genes anti-apoptótico BCLxL e pró-apoptótico Bax. Os resultados mostraram que a nitrofurantoína e todos os derivados testados apresentaram atividade citotóxica frente a quatro linhagens de células tumorais MCF-7 (Adenocarcinoma de mama), NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão), HT-29 (Adenocarcinoma de colon) e HL-60 (Leucemia promielocítica). O derivado N-pentil nitrofurantoína (M8A) foi o composto selecionado e a linhagem HL-60 foi escolhida para os estudos de avaliação do mecanismo de ação. No teste do azul de tripan o M8A diminuiu a viabilidade celular nas duas concentrações testadas (6,0 e 12,0 µg/mL). A análise morfológica indicou que o M8A induziu as células à apoptose, pois os núcleos apresentaram condensação da cromatina, fragmentação do DNA e picnose. A análise de fragmentação do DNA mostrou que as células sofreram apoptose no padrão de 180-200 pares de bases. O teste de microscopia de fluorescência confirmou os resultados do DNA *ladder*, mostrando que o derivado está induzindo as células a sofrerem apoptose pela externalização da fosfatidilserina marcadas com anexina V nas duas concentrações testadas. Na análise de RT-PCR pôde-se verificar o aumento da expressão da proteína pró-apoptótica Bax, confirmando assim o processo de apoptose e indicando o envolvimento da via intrínseca. Os resultados mostram que o derivado M8A é um agente anticâncer promissor e esses dados são inéditos para esta classe de moléculas.

Palavras chave: Nitrofurantoína, apoptose, citotoxicidade, análise morfológica, fragmentação do DNA.

ABSTRACT

Currently cancer is considered a genetic disease, because during development cells undergo several genomic instability is considered the second leading cause of death worldwide. Nitrofurantoin is a nitrofuran derivative hindantoinico widely used to treat urinary tract infections, whose mechanism of action is not yet well defined. In this work we performed tests of cytotoxic nitrofurantoin and four new n-alkylated derivatives in cancer cell lines. The cytotoxicity assay was done by testing MTT (3 - (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-difeniltetrazolium) and the tools used to assess mechanism of action included in the exclusion test trypan blue, morphology analysis by staining May-Grunwald-Giemsa staining, fluorescent microscopy by labeling with annexin V \ propidium iodide, DNA fragmentation analysis by DNA Ladder test and analysis of expression of anti-apoptotic genes, pro BCLxL -apoptotic Bax. The results showed that nitrofurantoin and all derivatives tested showed cytotoxic activity against four tumor cell lines MCF-7 (breast adenocarcinoma), NCI-H292 (pulmonary mucoepidermoid carcinoma), HT-29 (colon adenocarcinoma) and HL -60 (promyelocytic leukemia). The derived N-pentyl nitrofurantoin (M8A) was selected compound lineage and HL-60 was chosen for the evaluation studies of the mechanism of action. In the trypan blue test M8A decreased the cell viability at the concentrations tested (6.0 and 12.0 mg \ ml). Morphological analysis indicated that the compound induced the cells to apoptosis since the nuclei show chromatin condensation, DNA fragmentation and pyknosis. The DNA fragmentation analysis showed that the cells underwent apoptosis at the standard 180-200 base pairs. The test fluorescence microscopy confirmed the results of the DNA ladder, showing that the derivative is inducing cells to undergo apoptosis by the externalization of phosphatidylserine stained with Annexin V at the concentrations tested. In the analysis of RT-PCR could observe increased expression of pro-apoptotic protein Bax, thus confirming the process of apoptosis, indicating the involvement of the intrinsic pathway. The results show that the M8A derivative is a promising anticancer agent and these data are new to this class of molecules.

Keywords: nitrofurantoin, apoptosis, cytotoxicity, morphological analysis, DNA fragmentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Características adquiridas pelo câncer	21
Figura 2: Marcos emergentes e novas características ativadas pelo câncer.	22
Figura 3: Estágios da Carcinogênese Química	23
Figura 4: Estimativas para o ano de 2012 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e de número de casos novos por câncer, segundo sexo e localização primária	24
Figura 5: Principais Características e Características comuns entre autofagia, apoptose e necrose	29
Figura 6: Via extrínseca da apoptose	31
Figura 7: Via intrínseca da apoptose	33
Figura 8: Estruturas da daunorrubicina e doxorrubicina	36
Figura 9: Estrutura da Mitomicina C	36
Figura 10: Estrutura da Dactinomicina	37
Figura 11: Estrutura da Plicamicina	38
Figura 12: Estrutura da Bleomicina	38
Figura 13: Estruturas da nitrofurazona, furazolidona e nitrofurantoina	39
Figura 14: Estrutura da Nitrofurantoína	40

Figura 15: Estruturas da nitrofurantoína de seus derivados n-alquilados.	46
Figura 16: Determinação da viabilidade celular	57
Figura 17: Análise morfológica pela coloração (May-Grunwald-Giemsa).	58
Figura 18: Análise da Morfologia (Microscopia de Fluorescência).	60
Figura 19: Análise morfológica da fluorescência Anexina V/Iodeto de propídeo.	61
Figura 20: Análise da fragmentação do DNA, teste do DNA Ladder.	62
Figura 21: Análise da RT-PCR dos genes Bax e BCL2	63
Figura 22: Análise da RT-PCR do gene controle GADPH.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: As principais características morfológicas e bioquímicas envolvidas nos processos de apoptose, necrose e autofagia. **28**

Tabela 2: Análise da citotoxicidade dos compostos em células tumorais. **54**

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AIF	Fator indutor de apoptose
BE	Brometo de etídio
CCS	Ciclo celular específica
DISC	Complexo de sinalização indutor de morte
DMEN	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido dextrorribonucleico
DR	Receptor de morte
EROS	Espécies reativas de Oxigênio
FADD	Domínio de morte associado ao Fas
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administração de alimentos e medicamentos)
HL-60	Leucemia promielocítica
HMGB1	Proteína de alta mobilidade grupo Box 1
HT-29	Adenocarcinoma de cólon
IC50	Concentração que produz 50 % de inibição no crescimento celular
INCA	Instituto nacional do câncer
LC3	Proteína associada ao microtúbulo (cadeia leve 3)
LMP	Permeabilização da membrana lipossomal
MCF-7	Linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano
Mg	Magnésio
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NCI-292	Carcinoma mucoepidermóide de pulmão
PARP	Poli ADP ribose polimerase
PBS	Solução tampão fosfato
PS	Fosfatidilserina
RIP-1,	Receptor de interação proteica

RT-PCR	Transcriptase Reversa- Reação em Cadeia da Polimerase
TE	Tris-EDTA
TG	Transglutaminase
TLR	Receptores <i>Toll Like</i>
TNFr	Receptor do fator de necrose tumoral
TPM	Transição da permeabilidade mitocondrial
TRADD	Domínio de morte associado ao TNF
TRAIL-R	Receptor de sobrevivência celular
WHO	Organização mundial de saúde
$\Delta\psi$	Potencial de membrana

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Aspectos gerais do câncer	21
2.2 Epidemiologia	25
2.3 Formas de Tratamento	26
2.4 Tipos de Morte celular	28
2.5 Antibióticos antitumorais	35
2.6 Nitrocompostos	38
2.7 Nitrofurantóina	40
3. JUSTIFICATIVA	44
4. OBJETIVOS	46
4.1. Gerais	46
4.2. Específicos	46
5. MATERIAL E MÉTODOS	48
5.1. Material Biológico	48
5.2. Substâncias Químicas	48
5.3. Cultivo das células tumorais	49
5.4. Citotoxicidade pelo método do MTT	49
5.5. Citotoxicidade em linfócitos humanos	50
5.6. Determinação da viabilidade celular – teste do azul de tripan	51
5.7. Análise Morfológica – coloração por may-grunwald-giemsa	51
5.8. Análise Morfológica – Anexina V/Iodeto de propídeo	52

5.9. Análise da fragmentação do DNA – Teste do DNA Ladder	53
5.10. Análise da expressão gênica de proteínas pró-apoptóticas (Bax) e antiapoptóticas (BCL-2 e BCLxL) – RT-PCR	54
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
6.1. Ensaio de citotoxicidade em células tumorais- teste do MTT	59
6.2. Ensaio de citotoxicidade em linfócitos humanos	60
6.3. Determinação da viabilidade celular do M8A pelo azul de tripan	60
6.4. Avaliação da morfologia	62
6.5. Análise Morfológica – marcação com anexina e iodeto de propídeo	63
6.6. Análise da fragmentação do DNA – Teste do DNA Ladder	66
6.7. Análise da expressão gênica de proteínas pró-apoptótica (Bax) e antiapoptótica (BCLxL) – utilizando a RT-PCR	67
7. CONCLUSÃO	71
8. PERSPECTIVAS	73
9. REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um conjunto complexo de doenças genéticas distintas, unidas por características comuns, como potencial proliferativo ilimitado, autossuficiência nos sinais de crescimento e resistência aos sinais antiproliferativos e apoptóticos (LUO, SOLIMINI, ELLEDGE, 2009). Atualmente as abordagens terapêuticas mais usadas nos pacientes com câncer são: cirurgia, quimioterapia, radiação ionizante, imunoterapia e a terapia gênica (GRODSTEIN; MANSON; STAMPFER, 2006; SHERWACH; KUCHTA, 2009; WALDMANN, 2003).

Considerado como a segunda causa de morte no mundo, o câncer ganha relevância pelo perfil epidemiológico que vem apresentando. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou para o ano de 2030 a ocorrência de 27 milhões de novos casos, com 17 milhões de mortes. No entanto, atualmente são registrados 75 milhões de pessoas vivas com câncer, onde os países mais afetados são os de baixa e média renda (INCA, 2012).

As células tumorais são definidas por múltiplas características estruturais, comportamentais e moleculares. Algumas alterações são citadas como essenciais na fisiopatologia do câncer que coletivamente determinam o crescimento maligno, sendo descritos como características, a saber: auto-suficiência na regulação de sinais de crescimento celular, a insensibilidade aos sinais que inibem esse crescimento, evasão da morte celular programada (apoptose), potencial replicativo ilimitado, indução da angiogênese, invasão tecidual e metástase, estresse metabólico, proteotóxico, mitótico e oxidativo, e danos no DNA (LUO, SOLIMINI, ELLEDGE, 2009).

O combate ao câncer envolve a descoberta dos processos bioquímicos que levam a célula a se modificar e se tornar neoplásica, assim como as formas de induzir esta célula a sofrer morte celular. O processo de morte celular tem um papel fundamental no tratamento de várias doenças, pois é através da modulação das vias de morte que vários fármacos promissores estão sendo desenvolvidos para doenças como o câncer, doença isquêmica e doença neurodegenerativas. Os mecanismos complexos que controlam a morte celular estão sendo melhor compreendidos, o que torna cada vez mais evidente que diferentes vias de morte celular têm um papel crítico em múltiplas doenças, inclusive o câncer (KEPP, 2011).

Outro passo importante no combate ao câncer é a descoberta de novos fármacos, já que atualmente os disponíveis na quimioterapia apresentam toxicidade elevada também

nas células normais, o que causam vários efeitos adversos como mielossupressão, alopecia e alterações gastrointestinais (náuseas, vômito e diarreia). Dentre os principais agentes antineoplásicos utilizados na quimioterapia estão os alquilantes polifuncionais, os antimetabólitos, os inibidores mitóticos, os antibióticos antitumorais entre outros (INCA, 2012). A ineficiência destas drogas ou resistência ao tratamento do câncer impulsionam as pesquisas para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. Portanto alguns nitrocompostos são candidatos potenciais a agentes terapêuticos antitumorais. A nitrofurantoína é um derivado nitrofurano hindantoínico amplamente utilizado no tratamento de infecções do trato urinário e bacteriúria assintomática não havendo casos descritos na literatura de resistência bacteriana ao composto. No entanto, a nitrofurantoína apresenta toxicidade elevada quando utilizada em tratamentos prolongados.

Diante dos efeitos adversos apresentados pelos nitroderivados, surgiu a necessidade de modificações moleculares desta classe de compostos através da introdução de novos substituintes, tendo como *scaffold* a nitrofurantoína, com o intuito de diminuir os efeitos indesejáveis. Os derivados utilizados neste estudo foram obtidos através de modificações moleculares por n-alkilação da nitrofurantoína. Estes derivados foram submetidos aos testes citotóxicos *in vitro* com a nitrofurantoína e quatro derivados n-alkilados e posteriormente foram realizados ensaios de mecanismo de ação com o derivado que apresentou melhores resultados citotóxicos em linhagens de células tumorais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos gerais do câncer

Em nossa sociedade, o câncer é uma patologia que há muito tempo acompanha o ser humano. Vários trabalhos mostram a presença de tumores malignos encontrados em fósseis de esqueleto humanos que viveram em algumas sociedades antigas como Chile, Egito e Grécia. As primeiras descrições de tumores foram encontradas em papiros do Egito e datam 1.600 anos a.C. (DAVID; ZIMMERMAN, 2010).

Hipócrates, pai da medicina foi quem pela primeira vez usou o termo câncer (palavra de origem grega que significa caranguejo), comparando o crescimento infiltrante do tumor maligno de mama com as patas do caranguejo. Atualmente o termo câncer é usado para designar um grupo de mais de 100 doenças com a característica de crescimento desordenado e invasão de tecidos e órgãos podendo se espalhar para outras partes do corpo (BROWN; ATTARDI, 2005).

O câncer é uma das doenças que mais causam temor na sociedade por ter se tornado um estigma de mortalidade e dor. Atualmente, a definição científica de câncer refere-se ao termo neoplasia, especificamente aos tumores malignos, como sendo uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado de células transformadas. Existem quase 200 tipos de câncer que correspondem aos vários sistemas de células do corpo, os quais se diferenciam pela capacidade de invadir tecidos e órgãos, vizinhos ou distantes (ALMEIDA et al., 2005).

A multiplicação das células em organismos multicelulares saudáveis é cuidadosamente regulada com o propósito de atender às necessidades específicas de cada indivíduo. As células cancerosas diferem das células normais pelo fato de continuarem a crescer e se dividir, não obedecendo ao controle biológico natural do organismo. Dividindo-se rapidamente, estas células adquirem novas características genéticas que as tornam mais agressivas, determinando o desenvolvimento do câncer. Algumas alterações na fisiologia das células caracterizam o câncer: autossuficiência na sinalização de fatores de crescimento, insensibilidade aos inibidores de crescimento, evasão da apoptose,

potencial replicativo ilimitado, angiogênese, invasão tecidual e metástase (Figura 1) (HANAHAAN; WEINBERG, 2000).

Figura 1: Características adquiridas pelo câncer (Adaptado de HANAHAAN; WEINBERG, 2000).



Essas características do câncer constitui um princípio de organização para que se possa compreender melhor a complexidade dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento das neoplasias. Já que essa patologia é considerada de origem multifatorial, é de extrema importância que os processos envolvidos no desenvolvimento dos tumores sejam melhor elucidados (HANAHAAN; WEINBERG, 2000).

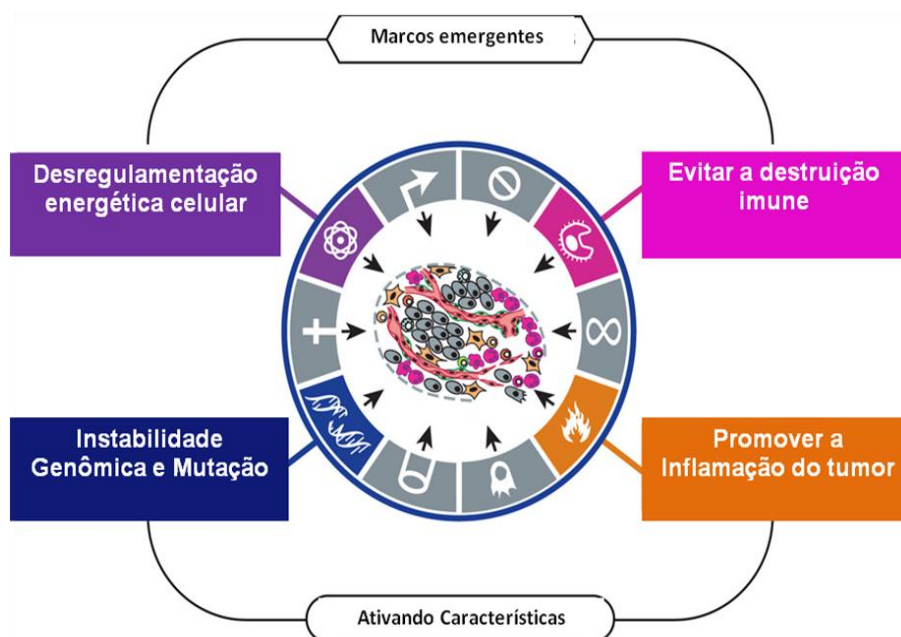
Atualmente o câncer é dito como uma doença genética, pois durante seu desenvolvimento passa por diversas instabilidades genômicas que resultam na acumulação de mutações pontuais, deleções, rearranjos cromossômicos complexos e aneuploidias extensas (HARTWELL; KASTAN, 1994). Estas mutações estão associadas ao descontrole de programas essenciais como proliferação, morte e diferenciação celular. Por possuírem um genoma transformado, as células tumorais se tornam instáveis e desta instabilidade resulta a soma acumulativa de mutações que propiciaram a transformação de células normais em células cancerosas (CHAMMAS; BRENTANI, 2002).

Através da análise de fenótipos celulares foram observadas outras alterações no metabolismo celular que estão associadas ao desenvolvimento do câncer como, estresse metabólico, proteotóxico, mitótico, oxidativo e danos no DNA. Além disso, essas células tumorais necessitam evoluir para que possam garantir apoio das células do

estroma, atrair novos vasos sanguíneos e desenvolver estratégias para escapar da detecção imunológica (LUO, SOLIMINI, ELLEDGE, 2009).

Hanahan e Weinberg (2011) adicionaram duas características envolvidas na patogênese de alguns e talvez todos os cânceres. A primeira envolve a capacidade de modificar ou reprogramar o metabolismo celular para poder apoiar de uma forma mais eficaz a proliferação neoplásica. A segunda permite que as células cancerosas possam se evadir da destruição imunológica, em especial por linfócitos T e B e macrófagos. Por essas características ainda não terem sido totalmente validadas, são consideradas ainda como características emergentes. De forma adicional duas características que os autores consideram consequentes ao câncer também estão sendo muito investigadas: a primeira é a instabilidade genômica que permite as células tumorais se dotar de mutabilidade levando a progressão tumoral; e a segunda é a inflamação, onde células da imunidade inata e adaptativa contribuem para a progressão tumoral, fornecendo várias moléculas bioativas para o microambiente tumoral como, fatores de crescimento e sobrevivência e modificando enzimas que facilitam a angiogênese, invasão e metástase.

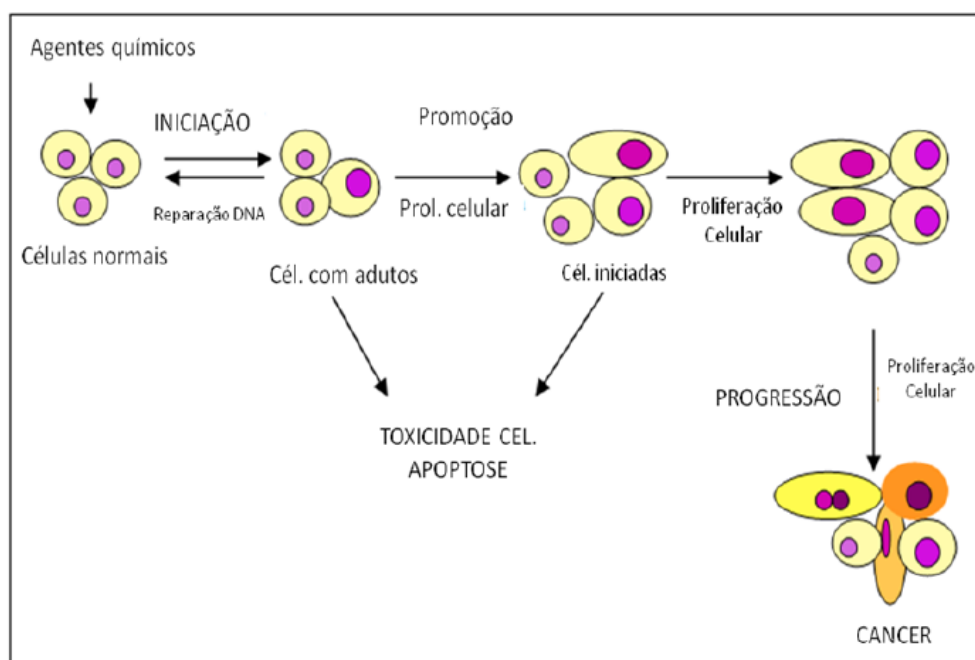
Figura 2. Marcos emergentes e novas características ativadas pelo câncer (Adaptado de HANAHAN; WEINBERG 2011).



A formação e progressão do câncer conhecido como carcinogênese é um processo complexo que se desenvolve em três principais etapas: iniciação, promoção e progressão. Danos no DNA têm sido associados como o evento que desencadeia a carcinogênese química (SANTELLA et al., 2005).

A iniciação é causada por alterações genéticas irreversíveis predispondo células normais susceptíveis à evolução maligna e imortalidade, sendo considerado um processo aditivo (SHACTER; WEITZMAN, 2002; TROSKO, 2003). A iniciação também pode começar por mutações espontâneas, como por exemplo, erro na replicação do DNA, embora seja menos comum (OLIVEIRA, 2007). A promoção ocorre através de agentes que aumentam a proliferação celular em tecidos sensíveis, contribuindo para o aumento de alterações genéticas e interfere no controle do crescimento celular (GOMES-CARNEIRO et al., 1997). A principal atividade dos promotores é a mitogênese, sendo uma fase reversível, após o desaparecimento de um promotor pode ocorrer uma regressão na proliferação celular, provavelmente por apoptose. É uma fase que pode ser moldada por fatores fisiológicos e, portanto, limitar a extensão da carcinogênese experimental, pois sua eficácia depende de sua concentração e tempo de exposição no tecido (OLIVEIRA, 2007). A progressão é um processo irreversível caracterizado pela instabilidade genética, aceleração no crescimento, invasão, metástase e mudanças nas características bioquímicas e morfológicas das células (Figura 3) (OLIVEIRA, 2007).

Figura 3. Estágios da Carcinogênese (Adaptado de OLIVEIRA, 2007).



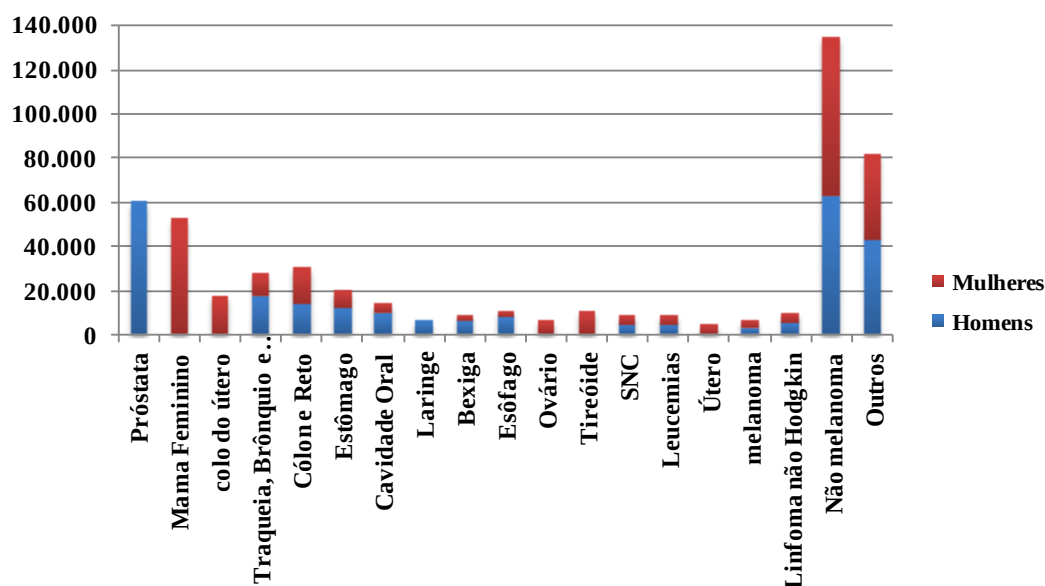
2.2 Epidemiologia do câncer

O aumento no número de casos de câncer em todo mundo principalmente a partir do século passado, configura essa doença na atualidade como um dos mais importantes problemas de saúde pública no mundo tanto em países desenvolvidos como os em desenvolvimento, sendo responsável por mais de seis milhões de mortes por ano, representando cerca de 12% de todas as causas de morte no mundo (WHO, 2012).

Considerado como a 2ª causa de morte no mundo, o problema do câncer ganha relevância pelo perfil epidemiológico que vem apresentando. Assim a Organização Mundial de Saúde (WHO) estimou para o ano de 2030, 27 milhões de novos casos, com 17 milhões de mortes. No entanto anualmente existem 75 milhões de pessoas portadoras de câncer, onde o impacto maior desse aumento será incidido em países de baixa e média renda (INCA, 2012).

No Brasil, as estimativas de 2012 também serão válidas para 2013 apontam para a ocorrência de aproximadamente 518.510 mil novos casos de câncer, incluindo os casos de câncer não melanoma (Figura 4). Espera-se um total de 257.870 mil novos casos para o sexo masculino e 260.640 mil para o sexo feminino, onde o tipo de câncer mais incidente é o câncer de pele não melanoma (134 mil), seguido do tumor de próstata (60 mil), mama feminina (53 mil), cólon e reto (30 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (18 mil) (INCA, 2012).

Figura 4. Estimativas para o ano de 2012 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e de número de casos novos por câncer, segundo sexo e localização primária. (Número de casos para cada tipo de câncer) (INCA,2012).



Diante deste cenário é importante que as ações para o combate ao câncer incluam educação em saúde, promoção e prevenção orientadas aos indivíduos, geração de opinião pública, aumento e melhoria da formação de recursos humanos, na assistência aos pacientes e no incentivo à pesquisa (INCA, 2012.)

2.3 Formas de Tratamento do câncer

O tratamento do câncer tem como principais metas a cura, o prolongamento da sobrevida e a melhoria da qualidade de vida. Dentre as principais formas de tratamento estão a cirurgia, a radioterapia, a quimioterapia e a terapia gênica. A cirurgia e a radioterapia são apropriadas para tratamento da doença localizada e regional e pode curar nos estágios iniciais do câncer, mais em geral possuem um papel limitado em cânceres mais avançados (INCA, 2012).

O tratamento cirúrgico pode ser subdividido em três tipos: cirurgia curativa, indicada para os tumores iniciais e sólidos; cirurgia preventiva, utilizada como primeiro passo na redução da população cancerígena quando está já está disseminada tem por finalidade impedir que a célula maligna se propague (INCA, 2012).

A radioterapia se utiliza da radiação ionizante para o tratamento de certos tumores e tem como ponto positivo maior rapidez e eficiência em “matar” as células cancerígenas, sendo importante na eliminação parcial ou total dos tumores. Entretanto, a radioterapia pode causar mutações em células saudáveis transformando-as em células com instabilidade genética, podendo assim ocasionar um novo tumor. É subdivida em dois tipos: radioterapia externa, conhecida como teleterapia, onde feixes de radiação são apontados para a região alvo penetrando através da pele; e a radioterapia interna chamada de braquiterapia que utiliza fontes radioativas para implantes ou moldagens em regiões próximas ao leito tumoral (INCA, 2012).

A quimioterapia surgiu na década de 40 com a utilização das mostardas de nitrogênio que são poderosos agentes alquilantes e antimetabólitos. Após o sucesso inicial do uso desses compostos, várias outras drogas antitumorais foram desenvolvidas. No entanto apesar de existir um grande arsenal de drogas utilizadas no tratamento do câncer, em muitos casos o sucesso terapêutico não é alcançado por falhas nos esquemas terapêuticos, altos índices de recidivas, redução na sobrevida do paciente e aparecimento

de vários efeitos adversos, o que leva a busca contínua de novos fármacos (SALGALLER; LODGER, 1998).

Existem vários tipos de quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer como, por exemplo: os agentes alquilantes polifuncionais: - são compostos capazes de substituir em outra molécula um átomo de hidrogênio por um radical alquil; os antimetabólitos: - afetam as células inibindo a biossíntese dos componentes essenciais do DNA e do RNA; os antibióticos antitumorais: - são um grupo de substâncias com estrutura química variada que, embora interajam com o DNA e inibam a síntese desta macromolécula ou de proteínas, não atuam especificamente sobre uma determinada fase do ciclo celular; os inibidores mitóticos: - estes agentes podem paralisar a mitose na metáfase, devido à sua ação sobre a proteína tubulina, formadora dos microtúbulos que constituem o fuso espiralar, pelo qual migram os cromossomos; outros agentes: - algumas drogas não podem ser agrupadas em uma determinada classe de ação farmacológica, entre elas, destacam-se a dacarbazina, indicada no tratamento do melanoma avançado, sarcomas de partes moles e linfomas; a procarbazina, cujo mecanismo de ação não foi ainda completamente elucidado, e que é utilizada no tratamento da doença de Hodgkin; a L-asparaginase, que hidrolisa a L-asparagina e impede a síntese protéica, utilizada no tratamento da leucemia linfocítica aguda (INCA, 2012).

A terapia gênica se utiliza da introdução de material genético em células para algum fim terapêutico. Inicialmente a terapia gênica tratava de corrigir doenças genéticas herdadas, fornecendo uma cópia funcional do gene deficiente na célula responsável pela doença. Atualmente a terapia gênica está sendo aplicada também no tratamento de doenças adquiridas e em alguns tipos de câncer em particular, como tumores gastrointestinais, de cólon, fígado e pâncreas (TOUCHEFEU et al., 2010).

Através dos ensaios clínicos que vem sendo desenvolvidos com resultados promissores, a terapia gênica pode se tornar uma boa candidata em todos os contextos terapêuticos, provavelmente em terapias de combinação. Combinando a terapia gênica com a quimioterapia ou radioterapia pode ter resultados interessantes, onde a terapia gênica pode atuar como um quimio ou radio-sensibilizador, ou a quimioterapia e a radioterapia podem melhorar a transferência e a eficácia do gene (HARRINGTON et al., 2008; ZHANG et al., 2003).

2.4 Tipos de Morte celular

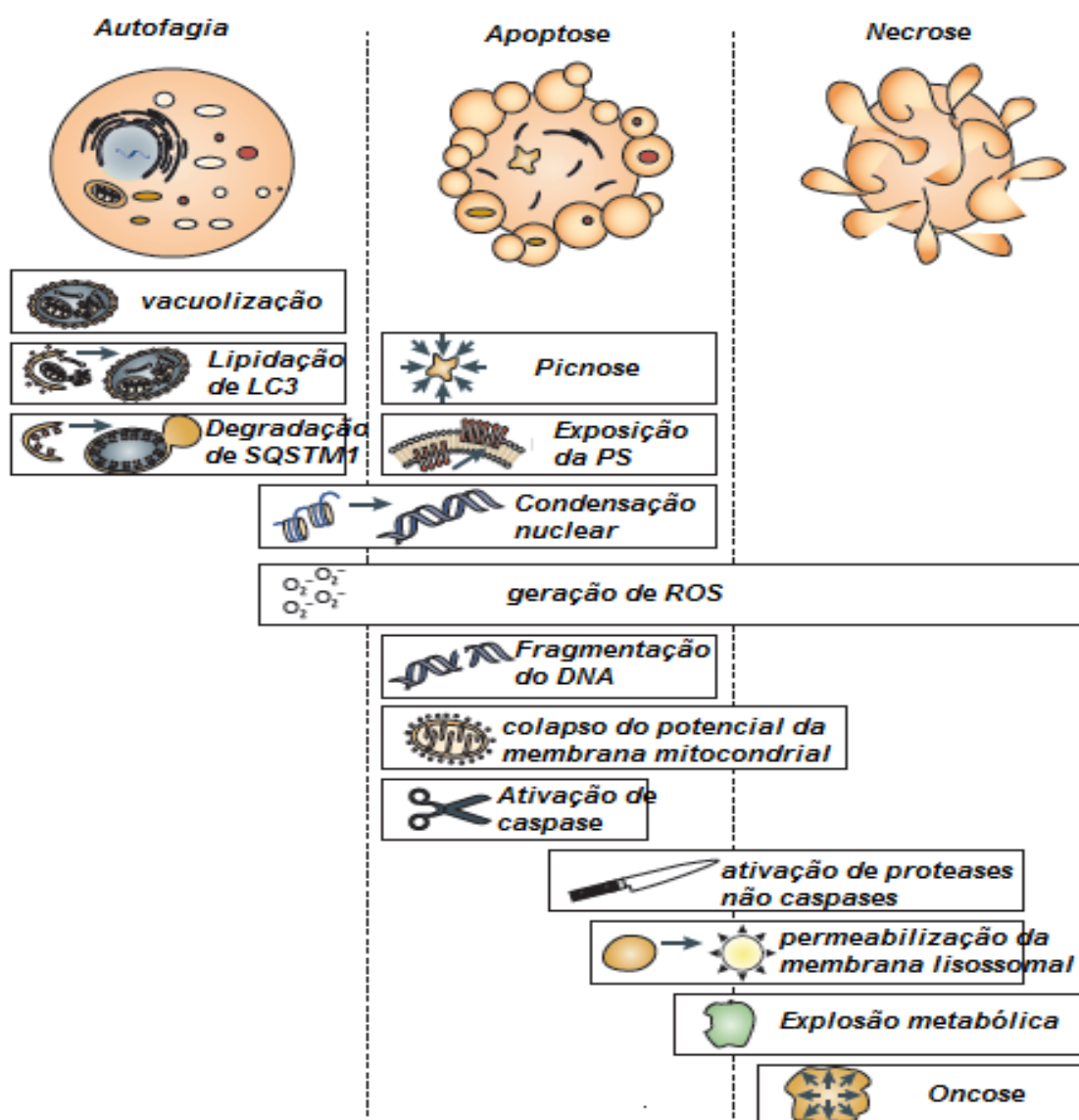
O processo de morte celular tem um papel fundamental no tratamento de várias doenças, pois é através da modulação das vias de morte que vários fármacos promissores estão sendo desenvolvidos para doenças como o câncer, doença isquêmica e doença neurodegenerativas. Os mecanismos complexos que controlam a morte celular estão sendo melhor compreendidos, o que torna cada vez mais evidente que diferentes vias de morte celular têm um papel crítico em múltiplas doenças, inclusive o câncer (KEPP, 2011).

A morte celular pode ser classificada de acordo com sua aparência morfológica, em: autofágica, necrótica, apoptótica ou associada à mitose. As principais características de uma célula que sofreu processo de morte celular são: perda da integridade da membrana plasmática, fragmentação celular ou a célula foi englobada pelas células vizinhas. Além disso, quando uma célula morre, perde todas as suas funções, ocorrendo uma diminuição no metabolismo celular (Tabela 1 e Figura 5) (KROEMER, 2009).

Tabela 1. Principais características morfológicas e bioquímicas envolvidas nos processos de apoptose, necrose e autofagia.

Tipo de morte celular	Características morfológicas	Características Bioquímicas
Apoptose	Células arredondadas	Ativação de proteína pró-apoptóticas como as da família Bcl-2 (ex: Bax, Bad, Bid, etc).
	Retração de pseudópodes	
	Redução do volume celular e nuclear (picnose).	Ativação de caspase.
	Fragmentação nuclear	Dissipação do potencial transmembrana da mitocôndria.
	Pequena modificação de organelas citoplasmáticas	Fragmentação Oligonucleossomal do DNA.
	Absorção dos corpos apoptóticos pelas células vizinhas.	Ruptura da membrana plasmática. Exposição de resíduos de fosfatidilserina. Excesso na produção do EROS. Acúmulo de DNAs
Necrose	Inchaço citoplasmático (oncoses).	Ativação de calpaínas e catepsinas.
	Ruptura da membrana plasmática.	Colapso nos níveis de ATP.
	Inchaço das organelas citoplasmáticas.	HMGB-1 libera LMP.
	Moderada condensação da cromatina.	Fosforilação de RIP-1. Aumento na geração de EROs. Padrão específico na clivagem do PARP-1.
Autofagia	Ausência de condensação da cromatina.	Dissociação da Bedina-1 da Bcl/XL.
	Vacuolização do citoplasma.	Dependência dos produtos gênicos do <i>atg</i> .
	Acumulação de (duplo membranosos) vacúolos autofágicos.	Conversão do LC3-I em LC3-II.
	Pouca ou nenhuma absorção pelas células fagocíticas, in vivo.	Degradação de P62.

Figura 5. Principais características e características comuns entre autofagia, apoptose e necrose. Adaptado de Kepp et al., 2011.



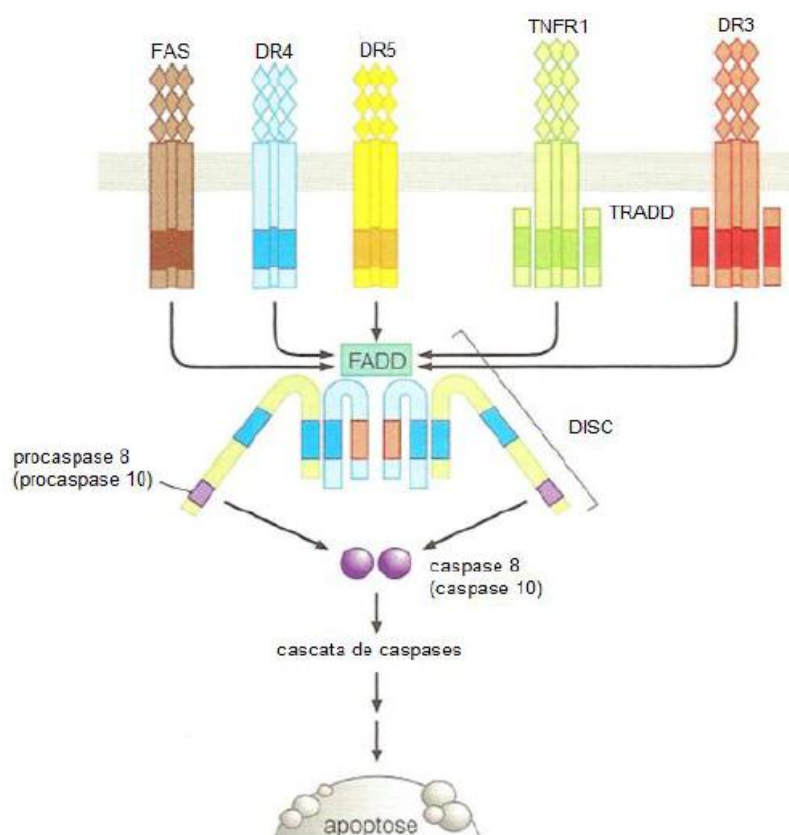
A apoptose durante certo tempo era caracterizada como morte celular programada, no entanto trabalhos recentes mostram que existem várias outras formas de mortes programadas e nesse grupo pode se incluir a necrose, a autofagia e a catástrofe mitótica. A morte por apoptose apresenta características morfológicas bem definidas, além da formação dos corpos apoptóticos que são posteriormente fagocitados por macrófagos, evitando assim o extravasamento do material celular, e consequente formação de um foco

inflamatório (DANIAL; KORSMEYER, 2004; KERR et al., 1972). A apoptose apresenta algumas mudanças bioquímicas características como, a clivagem proteolítica por caspase (RICCI; SONG, 2006), externalização da fosfatidilserina (PS) (FADOK et al., 1992; DENECKER et al., 2001), mudanças na permeabilidade da membrana mitocondrial com perda do potencial de membrana (KROEMER; REED, 2000; RICCI; ZONG, 2006), liberação de proteínas presentes no espaço intermembranar da mitocôndria (VAN LOO et al., 2002), dentre outras.

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

A via extrínseca é induzida por receptores de morte que se localizam na superfície da célula (VAN CRUCHTEN; VANDENBROECK, 2002). Estes receptores fazem parte do grupo de receptores do fator de necrose tumoral (TNFr), que incluem o Fas, o TNFr1, DR3, DR4 e DR5, e estão envolvidos na transdução de sinais que resultam na morte celular (MARTELLI et al., 2001; ZIMMERMANN et al., 2001). Quando os receptores de morte celular conseguem reconhecer um ligante específico, os seus domínios de morte interagem com moléculas conhecidas como FADD (domínio de morte associado ao Fas), e o TRADD (domínio de morte associado ao TNF), resultando num complexo conhecido como DISC (complexo de sinalização indutor de morte); este por sua vez atua na conversão de procaspases iniciadoras (8 e/ou 10) em caspases ativas por clivagem autoproteolítica e essas por sua vez convergem na cascata apoptótica intrínseca clivando e ativando as caspases executoras (3, 6 e 7), culminado assim na morte celular por apoptose (Figura 5) (GUIMARÃES; LINDEN, 2004; ASHKENAZI, 2002).

Figura 6. Via extrínseca da apoptose (Adaptado de WEINBERG, 2008).



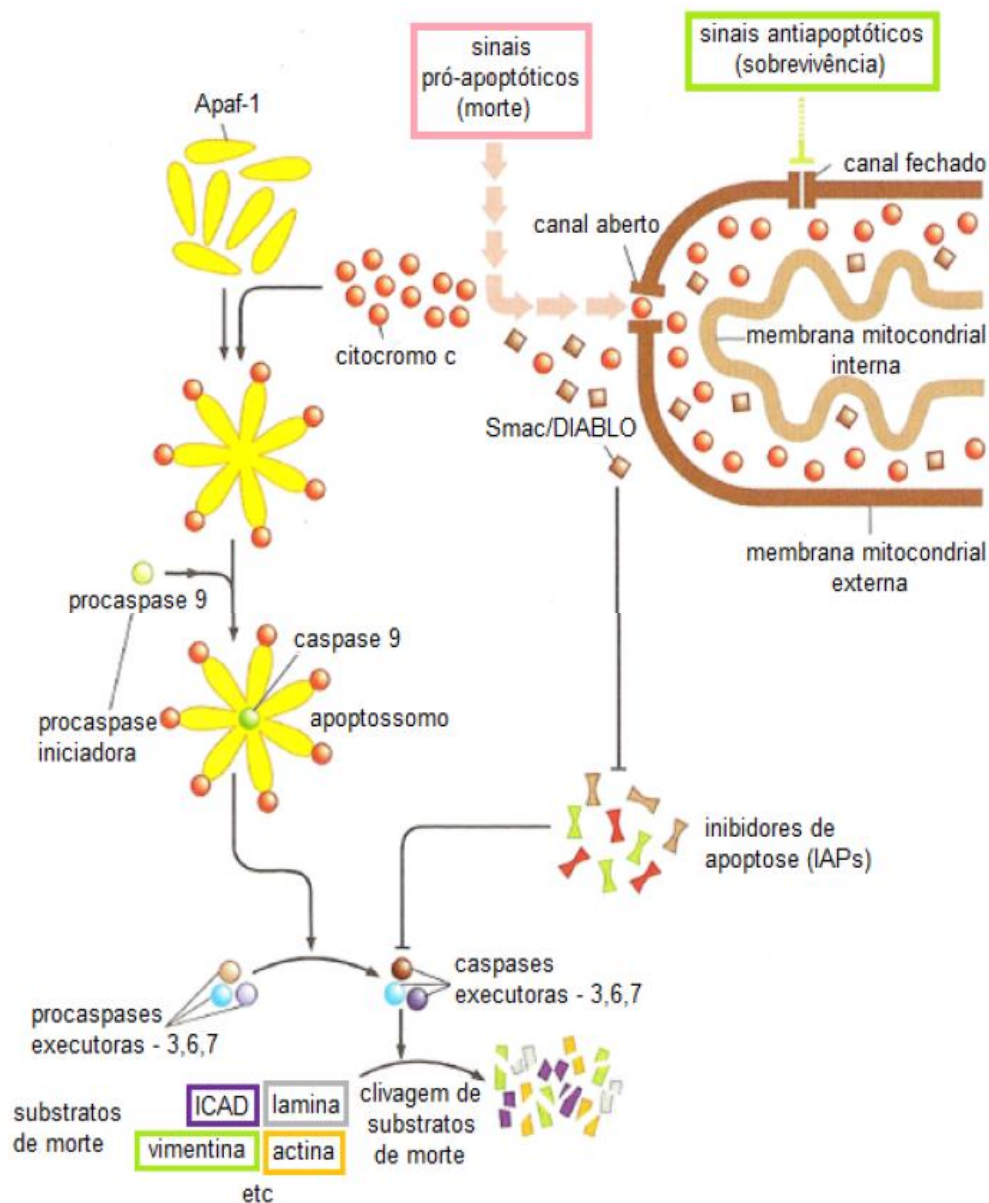
A via intrínseca é normalmente ativada quando há um estresse intra e/ou extracelular. Dentre as formas de estresse intracelulares podemos citar danos no DNA, altos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), hipóxia, infecção viral e ativação de oncogenes que podem levar a permeabilização da membrana externa da mitocôndria (BRUIN; MEDEMA, 2008; HENGARTNER, 2000; RICCIE ZONG, 2006). Os sinais que são transduzidos em resposta a esses estímulos convergem principalmente para a mitocôndria (HENGARTNER, 2000). Sendo assim, essa organela torna-se a principal mediadora da via intrínseca, integrando estímulos de morte celular, induzindo a permeabilização da membrana mitocondrial e liberando as moléculas pró-apoptóticas, nela existentes (GRIVICH et al., 2007). Chegando a mitocôndria, os sinais de morte levam ao colapso do potencial da membrana interna, formando uma transição da permeabilidade mitocondrial (TPM). A água que se encontrava entre as membranas passa para a matriz mitocondrial rompendo a organela e liberando as proteínas pró-apoptóticas para o citoplasma. Este processo interrompe a síntese de ATP, aumentando a produção de

EROS (KROEMER; REED, 2000). Este aumento leva à oxidação de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, aumentando o colapso do potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\psi$) (GREEM; KROEMER, 2004). A mitocôndria responde a esse dano oxidativo gerando uma via importante no início da apoptose. É também conhecido que as EROs promove a indução das caspases 9 e 3 (GOTTLIEB, 2000; WEINBERG, 2008).

Durante a apoptose ocorre a formação de um megaporo na mitocôndria contendo várias proteínas e é através desse poro que ocorre a liberação do citocromo c para o citoplasma que participa da ativação da apoptose. Além do citocromo c são também liberadas para o citosol proteínas ativadoras da apoptose (LOEFFLER; KREMER, 2000). No citosol o citocromo c forma um complexo com a APAF-1 e a caspase 9, este complexo é conhecido como apoptossomo e promove a clivagem da pró-caspase 9 liberando a caspase 9 ativa, e esta por sua vez, ativa a caspase 3 que ocasiona a apoptose (Figura 6) (GUIMARÃES; LINDEN, 2004).

Além disso, foi descoberta a participação na via intrínseca de uma flavoproteína conhecido como AIF (fator indutor de apoptose). Esta proteína migra da mitocôndria para o núcleo e induz a condensação da cromatina e fragmentação do DNA, sem envolver a cascata das caspases (BRÖKER et al., 2005).

Figura 6. Via intrínseca da apoptose (Adaptado de WEINBERG, 2008).



O termo autofagia é derivado do grego que significa *auto* (automático) e *fagia* (comer), é um processo de auto-digestão de uma célula causada pela ação de enzimas lisossomais da mesma célula levando a degradação de estruturas citoplasmáticas. É um processo catabólico geralmente utilizado pela célula como um mecanismo de sobrevivência em condições de escassez de nutrientes (DENTON; NICOLSON; KUMMAR; 2012).

A autofagia é geralmente induzida sob condições de estresse e se essa condição se tornar exacerbada pode levar a célula à morte, o que torna esse processo um tipo de mecanismo de morte celular. Esta via de morte celular ainda é má definida e controversa, pois a presença de marcadores autofágicos numa célula que está em processo de morte celular não significa dizer que é morte celular autofágica. Entretanto existem algumas evidências de que em alguns cenários específicos há um papel direto da autofagia, como por exemplo, no envelhecimento, isquemia, infarto do miocárdio e neurodegeneração (MADEO; TAVERMARAKIS; KROEMER, 2010).

No caso do câncer, as células podem sofrer um processo autofágico devido ao aumento exacerbado do metabolismo. Há também alguns indícios de morte celular por autofagia em células onde a apoptose não é funcional (GRANDER et al., 2009; SHIMIZU et al., 2004), ou até mesmo indução da autofagia antes da apoptose (LAANE et al., 2009; ZHAO et al., 2010), o que configura uma intrínseca relação entre esses dois processos de morte celular. Alguns trabalhos mostram que a autofagia é necessária em alguns casos específicos para que ocorra a morte celular programada, no entanto a maior parte das mortes programadas não é mediada por autofagia mesmo que a morte celular apresentem características de autofagia (EISENBERG-LERNER, 2009; GUMP; THORBURN, 2011). Com isso Shen e Codogno (2011) propuseram três critérios necessários para poder atribuir a morte celular por autofagia: primeiro, que a morte celular ocorra de forma independente da apoptose; segundo, que haja um aumento do fluxo autofágico e não simplesmente do aumento de marcadores autofágicos; e terceiro, que a inibição genética ou química da autofagia seja capaz de suprimir a morte celular. Estes três procedimentos são cruciais para poder discriminar se a autofagia determina a morte celular ou está alterando a dinâmica da morte.

A necrose é um tipo de morte celular que durante muito tempo foi atribuída à morte acidental e descontrolada, sendo caracterizada por um aumento do volume celular, inchaço das organelas, ruptura da membrana plasmática e consequente perda do conteúdo intracelular. Alguns trabalhos mostram que a necrose apresenta um controle genético e é regulada por um conjunto de vias de transdução de sinal e mecanismos catabólicos (KROEMER et al., 2009).

Vários processos, mediadores e organelas celulares têm sido associados à morte celular por necrose, mais ainda não está muito claro como eles se relacionam uns com os

outros. Entre esses fenômenos se incluem as alterações mitocondriais (produção de EROS), alterações lisossomais (permeabilização da membrana lisossomal), alterações nucleares [hidrólise de Poli ADP-ribose polimerase 1 (PARP-1) e Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD)], degradação de lipídeos (ativação de fosfolipases, lipoxigenases), aumentos na concentração citosólica do cálcio que resultam em sobrecarga mitocondrial e ativação de proteases de cisteínas (catepsinas) (GOLSTEIN; KROEMER, 2007; NICOTERA; BERNASSOLA; MELINO, 1999).

A necrose regulada conhecida como necroptose é regulada por um conjunto de vias de transdução de sinal e mecanismos catabólicos, por exemplo, o domínio de receptores de morte (TNFr1, Fas/CD95 e TRAIL-R) e receptores *Toll-like* (TLR3 e TLR4), também mostraram provocar necrose, principalmente se as capases estiverem inibidas. Este tipo de necrose estaria presente nas doenças neurodegenerativas, doenças inflamatórias, infecções e câncer, assim como em outros processos (KROEMER, 2009).

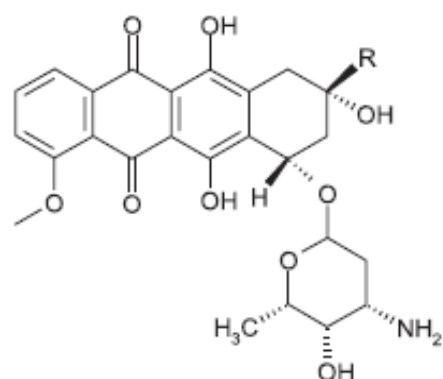
2.5 Antibióticos antitumorais

O uso de antibióticos na quimioterapia ainda é muito restrito, esses produtos resultaram da triagem de produtos antimicrobianos que levam a inibição do crescimento celular, por isso se mostram úteis no tratamento do câncer (INCA, 2012).

Uma das principais classes de antibióticos antitumorais são as antraciclinas. Evidências sugerem que as antraciclinas apresentam três mecanismos de ação. Um seria pela formação de ligações com os grupos fosfolipídeos (carregados negativamente) da membrana celular, alterando sua fluidez, assim como o transporte de íons (CULLINANE; CUTTS; VANROSMALLEN; 1994). Também promoveriam a formação do radical livre do oxigênio e da semiquinona através de um processo redutor enzimático. Outro modo de ação seria a formação de ligações interfilamentares com o DNA, o que leva ao bloqueio da síntese do DNA e RNA e diminuição da atividade da topoisomerase II, promovendo a ruptura dos filamentos do DNA (ALMEIDA et al., 2005).

Apesar de usualmente estes antibióticos serem classificados como agentes intercalantes do DNA, estudos mais recentes evidenciam que, além da intercalação, há a formação de uma estrutura complexa por ligações covalentes com o DNA (WANG et al., 1993). Os seus congêneres, doxorubicina e daunorubicina foram aprovados pela FDA – *Food and Drug Administration* para uso em diversos tipos de câncer (Figura 7).

Figura 7. Estruturas da daunorrubicina e doxorubicina (Adaptado de ALMEIDA et al., 2005).

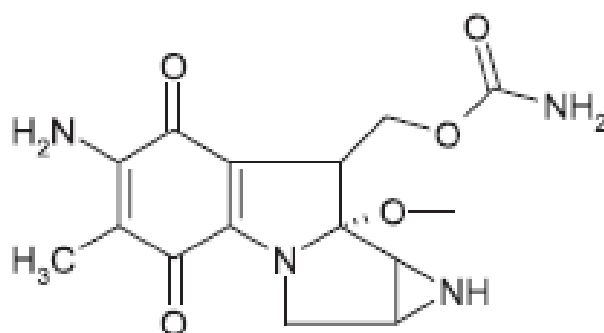


Daunorrubicina $R = \text{CH}_3\text{CO}$

Doxorrubicina $R = \text{HOCH}_2\text{CO}$

A mitomicina C é um antibiótico isolado de *Streptomyces caespitosus*. É um agente alquilante biorredutor que sofre ativação redutora metabólica enzimática. Os metabólitos formados alquilam o DNA através de ligações cruzadas, similares às formadas com alcaloides pirazolidínicos, mas de maior complexidade. Estes compostos favorecem a produção de superóxidos, que promovem danos de caráter oxidativo no DNA (Figura 8) (MURAD, 1996).

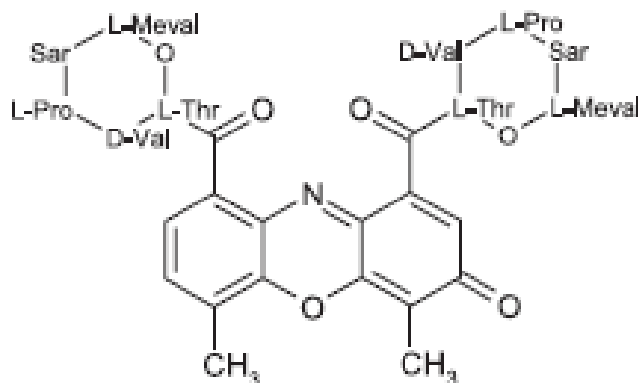
Figura 8. Estrutura da mitomicina C (Adaptado de ALMEIDA et al., 2005).



Dactinomicina (*Actinomicina D*, *Coesmegem*) é um antibiótico antitumoral isolado de *Streptomyces sp.* Liga-se fortemente ao DNA, através de sua intercalação entre pares

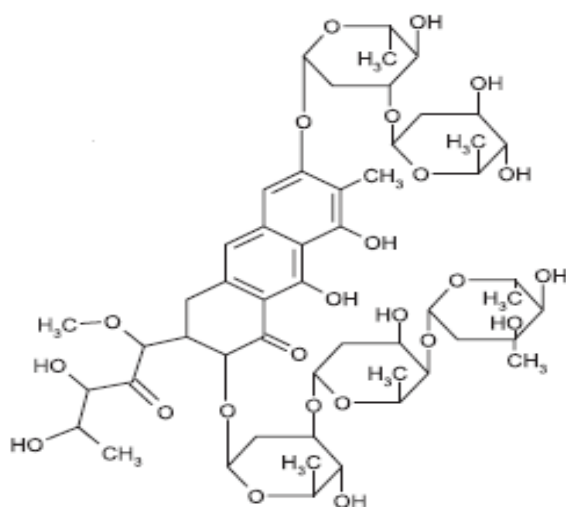
de bases adjacentes de guanina-citosina. Inibe todas as formas de síntese de RNA DNA dependentes, sendo a formação de RNA ribossômico mais sensível à ação do fármaco. A replicação do DNA não é tão reduzida, porém a síntese de proteínas é bloqueada (Figura 9) (SALMONM, 1998).

Figura 9. Estrutura da dactinomicina (Adaptado de ALMEIDA et al., 2005).



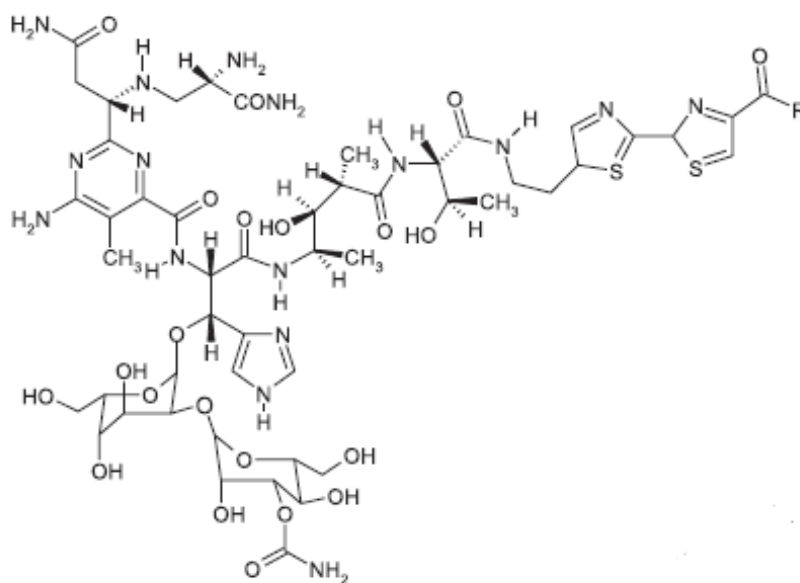
Plicamicina (*Mitramicina*, *Mithracin*) é outro antibiótico natural usado no tratamento do câncer, cujo mecanismo de ação parece envolver a ligação do fármaco ao DNA através de um complexo antibiótico-Mg²⁺. Esta interação interrompe a síntese de RNA dirigida pelo DNA (Figura 10) (ALMEIDA, 2005).

Figura 10. Estrutura da plicamicina. (Adaptado de ALMEIDA et al., 2005).



A bleomicina também tem como mecanismo de ação a ligação do fármaco ao DNA, produzindo quebras filamentosas e inibição da sua síntese. Mesmo que o efeito citotóxico deste antibiótico esteja relacionado à formação de ligações com o DNA, este fármaco é classificado como CCS (específica do ciclo celular), uma vez que provoca um acúmulo de células em G2 (Figura 11) (ALMEIDA, 2005).

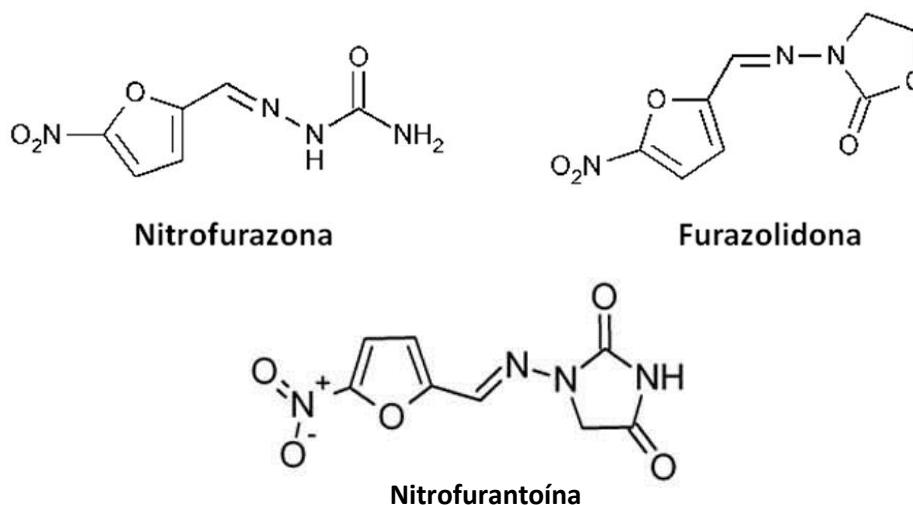
Figura 11. Estrutura da bleomicina (Adaptado de ALMEIDA et al., 2005).



2.6 Nitrocompostos

Os nitrocompostos foram introduzidos na terapêutica na década de 1940. Neste período, diversos compostos desta classe foram sintetizados e testados para várias doenças como, por exemplo, infecções bacterianas e parasitárias. Dentre os primeiros compostos heterocíclicos utilizados na terapêutica estão os nitrofuranos. Entre eles estão a nitrofurazona, a furazolidona e a nitrofurantoína que são utilizados no combate a vários tipos de infecções bacterianas há mais de 50 anos (Figura 12), (MCOSKER; FITZPATRICK, 1994).

Figura 12. Estruturas da nitrofurazona, furazolidona e nitrofurantoína.



A ineficiência que ocorre muitas vezes no tratamento de doenças como o câncer alerta para a descoberta de novos fármacos. Portanto alguns nitrocompostos são candidatos potenciais a agentes terapêuticos, destacando-se as atividades antiparasitárias (RAETHER; HÄNEL, 2003), antineoplásicas (HERLICH; SCWEIGEL, 1976) e antibacterianas (DODD; STILMAN, 1994), o que respalda a importância dessa classe de compostos (REISDORFER, 2007).

A atividade biológica dos nitrocompostos depende muito da presença do grupo nitro, onde a sua redução ocorre devido ao seu caráter aceptor de elétrons assim como o efeito da ressonância entre o nitrogênio e os dois átomos de oxigênio da sua estrutura (KOROLKOVAS; BURGKHALTER, 1988). Há também relatos da interação desses compostos com receptores específicos da biofase, sem associação da redução do grupo nitro como elemento essencial da bioatividade desse composto (HIRAKU et al., 2004). No entanto, a maioria dos nitrocompostos com ação antineoplásica, antiparasitária e antimicrobiana, tem o processo de biorredução enzimática do grupo nitro e subsequente interação dos produtos formados com biomoléculas essenciais de bactérias, fungos e parasitas como provável mecanismo de ação, o que o torna um pré-requisito para o bom desempenho desta classe de compostos (TOCHER, 1997; VIODÉ et al., 1998).

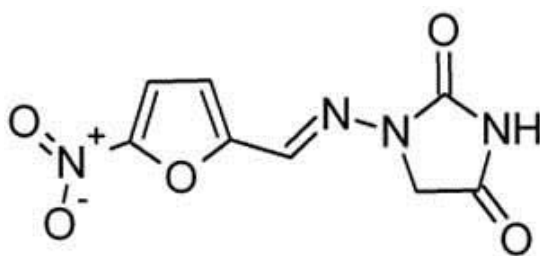
Os nitrocompostos apresentam um caráter mutagênico devido à presença de dois grupos potencialmente reativos como: o nitro na posição 5 e os substituintes R na posição

2 do anel furânico (MCCALLA, 1983). Com relação à atividade antineoplásica dessa classe de compostos, ela tem despertado interesse no tratamento de tumores sólidos que contém áreas de hipóxia (AL-MASOUDI et al., 2006). Em baixas concentrações de oxigênio intracelular, ocorre a formação de radicais livres que se originaram da biorredução desses compostos. Estes radicais livres apresentam um potencial redutor menor que o observado em células normais o que justifica a seletividade da ação citotóxica em células em hipóxia. Esta característica contribui para o planejamento de fármacos anticâncer mais específicos (TOCHER, 1997).

2.6.1 Nitrofurantóina

A nitrofurantóina é um derivado nitrofurano hindantoínico amplamente utilizado no tratamento de infecções do trato urinário e bacteriúria assintomática. É um agente antimicrobiano sintético que tem sido utilizado na indústria farmacêutica por mais de 50 anos (MCOSKER; FITZPATRICK, 1994). Foi introduzido na terapêutica em 1953 e possui os seguintes nomes comerciais: Niftran[®], Furatandin[®], Furabid[®], Macrobid[®], Macrochantin[®] (PICON et al., 2010), corresponde quimicamente a N-(5 Nitro-2-Furfuriliena)-Amino-Hidantoína (Figura 13).

Figura 13. Estrutura da nitrofurantóina.



A nitrofurantóina é completamente absorvida/degradada no trato intestinal superior e, portanto, não tem nenhum efeito prejudicial sobre a flora intestinal. É ativa contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo bacteriostática e bactericida

contra a maioria das espécies de estafilococos e estreptococos, possuindo a mesma ação frente à *Escherichia coli* e *Aerobacter aerogenes*. É inativa para fungos e vírus, sendo utilizada por via oral no tratamento de infecções urinárias (HERRLICH; SCWEIGEL, 1976).

O mecanismo de ação da nitrofurantoína de um modo geral envolve a redução do grupo nitro por flavoenzimas bacterianas, originando intermediários reativos que induzem à formação de radical hidroxila, que pode levar a modificações no DNA, o que leva a inibição da síntese de ácidos nucleicos e a quebra de fita simples e duplas do DNA (SPIELBERG; GORDON, 1981). Sabe-se que a nitrofurantoína possui múltiplos locais de ataque e de mecanismos de ação múltiplos ainda não conhecidos, o que impede o desenvolvimento da resistência bacteriana (MCOSKER; FITZPATRICK, 1998).

Alguns estudos relatam diversos efeitos colaterais da nitrofurantoína nas concentrações terapêuticas, consequentemente possui limitações na sua aplicação. É usada preferencialmente no combate a infecções urinárias, pois cerca de 40% é eliminado sob a forma inalterada na urina, com meia vida de apenas 30 minutos a 1 hora. Há mais de 50 anos que a nitrofurantoína vem sendo utilizada em uropatógenos suscetíveis sem haver praticamente nenhuma resistência adquirida (MCOSKER; FITZPATRICK, 1994). Efeitos adversos são raros e observado em uso a longo prazo (BRUMFITT; HAMILTON-MILLER, 1998), incluindo toxicidade hepática, hepatite crônica, hipersensibilidade e fibrose pulmonar, leucopenia, anemia hemolítica, disfunções neurológicas e neuropatias. Alguns dos seus efeitos adversos são associados à formação de metabólitos tóxicos reativos (BLACK; RABIN; SCHATZ, 1980).

Contudo o melhoramento do desempenho da atividade biológica desta classe de compostos pode ocorrer através da introdução de novos substituintes, baseados em estruturas já conhecidas e com bioatividade já comprovada, resultante de modificações moleculares planejadas no intuito de melhorar suas propriedades físico-químicas que influenciam sua atividade biológica (LEMKE; WILLIAMS; FOYE'S, 2008).

As pesquisas na indústria farmacêutica visam obter fármacos cada vez mais específicos e com menos efeitos adversos. Nesse contexto a modificação molecular surge como uma importante ferramenta para elaboração de novos candidatos a fármacos antitumorais, visando à diminuição da resistência e inibição significativa do crescimento do tumor (SOUZA, 2011).

Levando em consideração a necessidade mundial por novos agentes anticâncer, surge a necessidade de se investigar o potencial antitumoral de uma nova série de derivados da nitrofurantoína, visto que este composto apresenta uma ação antimicrobiana já conhecida, porém existem vários relatos na literatura sobre sua ação tóxica (SOUZA, 2011). Através da modificação molecular foram obtidos a partir da nitrofurantoína novos derivados N-alquilados e neste trabalho foi avaliado o potencial citotóxico desses compostos, teste estes inéditos para os compostos em questão.

3 JUSTIFICATIVA

O aumento no número de casos de câncer em todo mundo principalmente a partir do século passado, configura essa doença na atualidade como um dos mais importantes problemas de saúde pública no mundo, tanto em países desenvolvidos como os em desenvolvimento, sendo responsável por mais de seis milhões de mortes por ano, representando cerca de 12% de todas as causas de morte no mundo. Apesar do aumento dos casos dessa doença no mundo, a produção de novos fármacos contra o câncer representa um dos mais pobres recordes de novos agentes. A pesquisa por novos fármacos bem como seus mecanismos de ação é um passo importante a ser dado no sentido de que novas estratégias são necessárias tendo em vista que os medicamentos disponíveis hoje no mercado são de alto custo e apresentam elevada toxicidade, causando transtornos aos pacientes que são submetidos ao tratamento. Diante dessa problemática surge a necessidade de inovar e para isso a pesquisa tem que estar direcionada com o enfoque de que é preciso investir em novos fármacos com o objetivo de ter um medicamento seguro com preços acessíveis à população.

O projeto de pesquisa em questão teve o objetivo de investigar a atividade antitumoral de derivados da nitrofurantoína que possam apresentar baixos custos de produção e poucos efeitos adversos e, além disso, gerar conhecimento para criação de novas terapias contra o câncer ou incrementar as terapias já existentes.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar o efeito citotóxico de quatro novos derivados da nitrofurantoína e analisar os possíveis mecanismos do derivado mais ativo.

4.2 Específicos

- Determinar o efeito citotóxico de quatro novos derivados da nitrofurantoína em linhagens de células tumorais humanas;
- Verificar se os compostos são citotóxicos em linfócitos humanos;
- Analisar o possível mecanismo de morte celular e bloqueio do ciclo celular induzido pelo composto que apresentar melhor atividade citotóxica;
- Analisar, através de RT-PCR, o efeito do derivado que apresentar melhor atividade citotóxica a expressão de genes envolvidos no controle do ciclo celular e apoptose.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Lista de Materiais

Os reagentes clorofórmio e isopropanol foram obtidos da Merck®. Etanol da FMaia®. Acetato de Amônio da CRQ®. Agarose D1 Low EEO da empresa Pronadisa®. O Tris ultrapuro e o MTT (3 - (4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazólio) da Invitrogen®. O EDTA sal dissódico e o DMSO (sulfóxido de dimetilo) da Vetec®. O fosfato salina tamponada (PBS), a penicilina-estreptomicina líquida e DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) foram adquiridos da Gibco®. Soro fetal bovino (FBS) e glutamina foram adquiridos da Sigma-Aldrich Brasil®. O kit anexina V-FITC Apoptosis Detection foi adquirido da Calbiochem®. O kit enzima de polimerização taq foi obtido da sinapse biotecnologia®. O kit RT transcriptase reversa foi adquirido da Promega®.

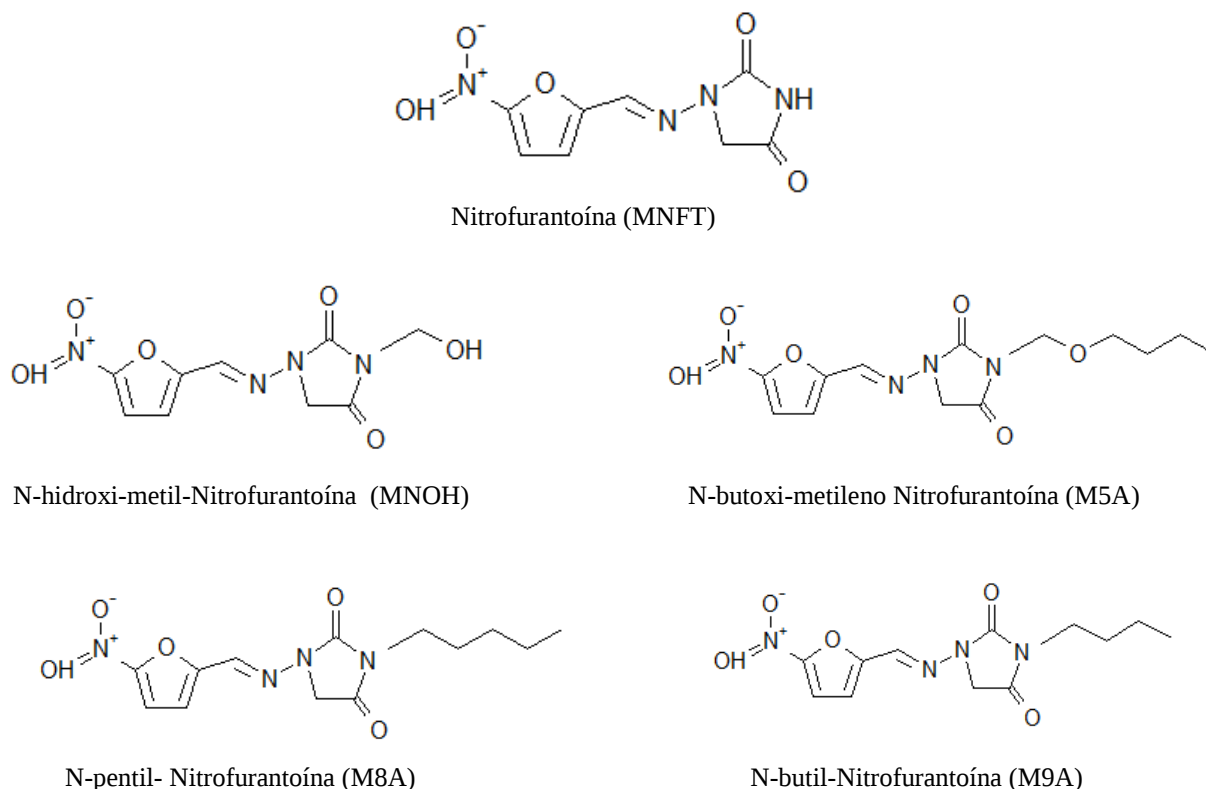
5.2 Material Biológico

As linhagens de células de câncer humano foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro e cultivadas no Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Antibióticos da UFPE. As linhagens foram as seguintes: HL-60 (Leucemia promielocítica), MCF-7 (Adenocarcinoma de mama), NCI-H292 (Carcinoma mucoepidermóide de pulmão) e HT-29 (Adenocarcinoma de cólon). Linfócitos humanos foram obtidos de doadores voluntários saudáveis. Registro no SISNEP (sistema nacional de informações sobre ética em pesquisa envolvendo seres humanos): 447498, e no CAAE (certificado de apresentação Para apreciação ética): 034.0.172.000-11.

5.3 Substâncias Químicas

A nitrofurantoína (MNFT) e seus derivados n-alquilados (N-hidroxi-metil-nitrofurantoína (MNOH), N-butoxi-metileno-nitrofurantoína (M5A), N-pentil nitrofurantoína (M8A), N-butil-nitrofurantoína (M9A) foram sintetizados e fornecidos pelo Laboratório de Síntese de Fármacos (LABSINFA), sob a coordenação do Prof. Dr. Dalci José Brondani (UFPE). A doxorubicina (Sigma Aldrich®) foi utilizada como controle positivo (Figura 14).

Figura 14. Estruturas da nitrofurantoína e de seus derivados n-alquilados.



5.4 Cultivo das células tumorais

As células foram cultivadas em garrafas para cultura de células (volume de 250 mL) e mantidas com meio de cultura RPMI (HL-60 e MCF-7) e DMEM (NCI-H292, HT-29) suplementados com soro fetal bovino a 10% e com antibióticos a 1%, penicilina e estreptomicina (Gibco). As células foram mantidas e incubadas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. O acompanhamento do crescimento celular foi realizado através do microscópio de inversão.

5.5 Citotoxicidade pelo método do MTT

A avaliação dos efeitos citotóxicos dos derivados da nitrofurantoína foi realizado através do teste do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium). Este teste se baseia na capacidade da enzima do ciclo de Krebs succinato desidrogenase ativa nas mitocôndrias de células viáveis em converter o sal tetrazolium (MTT) que é hidrossolúvel e de cor amarelada, em cristais de formazan, que são de cor púrpura. É um

ensaio quantitativo *in vitro* para estimar proliferação e sobrevivência celular. Essa técnica tem a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula, sendo então bastante útil na avaliação da citotoxicidade. As células tumorais (NCI-H292, HT-29 e MCF-7) foram semeadas (2×10^5 células/mL) e $0,3 \times 10^6$ (HL60) em placas de 96 poços. Em seguida as substâncias previamente dissolvidas em DMSO (dimetilsufóxido), foram diluídas em série no meio DMEM (NCI-H292, HT-29) e RPMI (MCF-7 e HL-60) para obtenção das concentrações ($0,048 - 25\mu\text{g/mL}^{-1}$) e adicionadas em placas de 96 poços ($100 \mu\text{L/poço}$). A doxorubicina foi utilizada como padrão nas mesmas concentrações. Após 72h de contato das células com os compostos, o sobrenadante foi aspirado e adicionados $150 \mu\text{L}$ de solução de MTT (Sigma-Aldrich®) na concentração de 5 mg.mL^{-1} . As placas foram deixadas por 3 horas em estufa 37°C e ao final desse período, $100 \mu\text{L}$ de DMSO foi adicionado a cada poço para a dissolução dos cristais de Formattam (ALLEY, et al., 1988; MOSMAM, 1983).

Análise dos dados

A absorbância foi medida em um leitor de microplacas (Modelo 3550 BIO-RAD, Inc.) no comprimento de onda de 540 nm. Os experimentos foram analisados através de suas médias e respectivos erros padrão, realizados em triplicata. O gráfico da absorbância X log da concentração e determinadas suas CI_{50} e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%), a partir de regressão não linear, utilizando o programa prisma versão 5 (Graph Pad Prism software versão. 5.0).

5.6 Citotoxicidade em linfócitos humanos (M8A)

Para o isolamento dos linfócitos foram coletados 5 mL de sangue de voluntários sadios em tubos contendo heparina. O sangue foi lavado com tampão fosfato (PBS) e os linfócitos foram isolados por gradiente de densidade usando Ficoll (Histopaque). Os linfócitos foram plaqueados (placa de 96 poços) na concentração de $2,0 \times 10^6$ células/mL e mantidos sob incubação por 48h a 37°C e 5% CO_2 . O composto M8A, previamente dissolvido em DMSO, foi diluído em série em meio DMEM para obtenção das concentrações finais ($0,048-25\mu\text{g/mL}$) e adicionadas ($100 \mu\text{L} / \text{poço}$) às placas contendo os linfócitos. A doxorubicina foi utilizada como padrão nas mesmas concentrações. Após um período de incubação de 72h, as placas foram retiradas e centrifugadas a 1500

rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi aspirado e adicionado 150 μ L de solução de MTT (5 mg/mL) em DMEM, sendo a placa colocada na estufa a 5% de CO₂ por 6 h. Em seguida, as placas foram novamente centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos, tendo o sobrenadante aspirado e seu precipitado ressuspendido em 150 μ L de DMSO e agitado por 30 minutos, até completar a dissolução dos cristais de formazan (BUARQUE et al., 2011).

5.7 Determinação da viabilidade celular – teste do azul de tripan

Este teste baseia-se na capacidade que o corante azul do tripan tem de penetrar em todas as células, no entanto somente as células viáveis conseguem bombear o corante para fora, marcando de azul as células não viáveis que perderam essa capacidade, o que permite a quantificação separada das células viáveis de células não viáveis, após a incubação com os compostos testes (PERES; CURI, 2005). Para este teste foi escolhida a linhagem HL-60 por se tratar de células cultivadas em suspensão o que viabiliza os estudos de mecanismo de ação. As células foram distribuídas em placas de 24 poços e incubadas com o composto M8A no valor da CI₅₀ e duas vezes a CI₅₀ de 24 horas (6,0 e 12,0 μ g/mL,) por 24 horas. A doxorrubicina (3,0 μ g/mL) foi utilizada como controle positivo. Após o período de incubação, 10 μ L do azul de tripan foram adicionados a 90 μ L da suspensão celular em um eppendorf. As células viáveis e não viáveis foram contadas em câmara de Neubauer, utilizando um microscópio óptico.

Análise dos dados

Os dados foram analisados através da média e do erro padrão de três experimentos independentes. Foram verificadas diferenças significativas entre os grupos comparando-os através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5.8 Análise morfológica – coloração por may-grunwald-giemsa

O teste se baseia em interações eletrostáticas entre os corantes e as moléculas alvo. Essa coloração é composta pelo azul de metileno (corante básico) e eosina (corante ácido), entre outros componentes básicos que permitem distinguir o citoplasma do núcleo, assim como analisar a célula quanto a sua integridade nuclear e também alterações no citoplasma, é técnica bastante indicada para estudos de padrão de morte celular (apoptose e necrose).

As células da linhagem HL-60 foram distribuídas em placas de 24 poços na concentração $0,3 \times 10^6$ (Células/mL) e incubadas com o composto M8A (6,0 e 12,0 µg/mL) por 24 horas. A doxorrubicina (0,3 µg/mL) foi utilizada como controle positivo e o controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,1%). Após a incubação as células foram examinadas em microscópio de inversão e posteriormente foi retirada uma alíquota de 50 µL da suspensão de células e adicionadas a uma centrífuga de lâmina (cytospin), numa rotação de 1200 rpm por 5 minutos. Após a confecção das lâminas, a fixação foi feita com metanol por 10 segundos e a coloração May-grunwald por 10 segundos e o Giemsa por mais 10 segundos.

Análise dos dados

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico para verificação das alterações morfológicas e foram comparadas ao grupo controle (não tratado) e posteriormente fotodocumentadas.

5.9 Análise morfológica – Anexina V/Iodeto de propídeo

Um dos principais processos decorrentes da apoptose é a perda da assimetria da membrana fosfolipídica, com a translocação da fosfatidilserina (OS) da membrana interna da bicamada lipídica para a superfície celular. A externalização da PS ainda continua pouco conhecida, entretanto sabe-se que esse processo funciona como um sinal para que os macrófagos a fagocitem antes que percam a integridade da membrana plasmática. As células que estiverem sofrendo este processo ficaram com a membrana celular marcada de pontos verdes fluorescentes. O brometo de etídeo (BE) por sua vez, só consegue intercalar ao DNA e marcar o núcleo de vermelho se a membrana celular estiver danificada, processo este que só ocorre em células necróticas ou em apoptose tardia (KUMMAR et al., 2004).

As células da linhagem HL60 foram distribuídas em placas de 24 poços na concentração de $0,3 \times 10^6$ células/mL e incubadas com o composto M8A (6,0 e 12,0 µM) por 24 horas. A doxorrubicina (3,0 µM) foi utilizada como controle positivo e o controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,1%). Posteriormente a suspensão de células foi ajustada para 1×10^6 células/mL. Em seguida, a suspensão foi transferida da placa para um tubo falcon e centrifugada a 1.200 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida o meio de cultura foi removido e o *pellet* de células foi ressuspenso em 0,1 mL

de PBS gelado e centrifugado a 1.200 rpm por 5 min. Posteriormente, o PBS foi removido e as células foram suspensas em 0,1 mL de 1x tampão de ligação gelado, então foi adicionado 0,5 µL de anexina V-FITC (Calbichem) e as células foram incubadas por 15 min em temperatura de 18-24 °C no escuro. Passado o período de tempo, as amostras foram centrifugadas a 1.200 rpm por 5 min, o sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 0,1 mL de 1x tampão de ligação gelado. Em seguida foi adicionado 2 µL do iodeto de propídeo, as amostras foram colocadas no gelo e ao abrigo da luz e em seguida analisadas em microscópio de fluorescência.

Análise dos dados

As células foram analisadas por um microscópio de fluorescência (Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha), a uma ampliação de 1000x, e filtro de excitação de BP 450-490nm. A análise dos dados foi realizado a partir da média e do erro padrão de três experimentos independentes, onde em cada experimento foram analisadas 12 lâminas e em cada lâmina foram contadas 200 células. Para verificar a ocorrência de diferenças significativas entre os grupos, os dados foram comparados através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5.10 Análise da fragmentação do DNA – Teste do DNA Ladder

A extração do DNA foi realizada através do protocolo fenol-Clorofórmio- Alcoól isoamílico. Em um tubo eppendorf de 1,5 mL foi adicionado: 100 µL das amostras de HL-60 (ressuspensos em 100 µL de TE (tris 10 mM-EDTA 1mM pH 8,0) e 100 µL de fenol equilibrado pH 8,0. Posteriormente as amostras foram homogeneizadas por 1 min em vórtex e centrifugadas a 14.000 rpm por 5 min a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo eppendorf devidamente identificado. A este tubo foi adicionado 50 µL de fenol e 50 µL de clorofórmio. As amostras foram novamente homogeneizadas por 1 min em um vórtex e centrifugadas a 14.000 rpm por 5 min, o sobrenadante foi transferido para outro tubo eppendorf e foi adicionado 100 µL de clorofórmio. As amostras foram homogeneizadas por 1 min em vórtex e centrifugadas à 14.000 rpm por 5 min. Em outro tubo eppendorf foi adicionado seguindo a ordem: 10 µL de acetato de amônio 3 M, 100 µL do sobrenadante do tubo anterior e 100 µL de isopropanol absoluto gelado. As amostras foram mixadas por 1 min em vórtex e

incubadas no freezer por 60 min. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 15 min, depois o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* lavado com 500 µL de etanol a 70%, em seguida centrifugadas a 14.000rpm por 5 min. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* seco em temperatura ambiente. Ao *pellet* foi adicionado 50 µL de água ultra pura e as amostras foram colocadas na geladeira por 10 minutos e levadas ao freezer por pelo menos 30 min.

Análise dos dados

Os padrões de banda foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com *Blue green loading dye I* (LGC- Biotecnologia), visualizados em transluminador de ultravioleta, comparados com o marcador de peso molecular 100 bp (DNA Ladder, Invitrogen, USA) e fotodocumentados.

5.11 Análise da expressão gênica de proteínas pró-apoptóticas (Bax) e antiapoptóticas (BCL-2 e BCLxL) – RT-PCR

A metodologia básica de RT-PCR foi realizada através da extração total do RNA com trizol, clorofórmio e isopropanol, com a pureza do RNA sendo confirmada pela razão de absorbância no espectrofotômetro A_{260nm} / A_{280nm} entre 1,8 - 2,0. A transcrição reversa foi realizada usando 0,6 µg de RNA total e 50 U de transcriptase reversa de *Moloney murine leukemia virus* (M-MLV RT) (Promega, Madison, WI) nas condições recomendadas pelo fabricante, usando 500 ng de primers randômicos (Roch, Nonnenwald, Germany).

Foram analisados os genes antiapoptóticos Bcl-2 e BclxL, o gene pró apoptótico Bax e um gene controle que não modifica sua expressão nas condições do experimento, o Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH), que produz um fragmento de 306 pares de bases (pb) após 6 horas de incubação com as duas concentrações (6,0 e 12,0 µg/mL) do derivado M8A. As reações de RT-PCR para cada gene tiveram um volume final de 25 µL, contendo 1X SYBR Green Master Mix PCR (Applied Biosystems). As amplificações foram feitas num termociclador, e consistiram de uma desnaturação do DNA inicial a 94°C (5 min), seguida, 94 °C por 1 min, mais 1 minuto da temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos (61°C GAPDH, 62°C Bax e BCLxL e 64°C BCL2), seguido de uma temperatura de extensão de 72 °C por 1 min, em 35 ciclos.

Posteriormente uma extensão final de 72 °C por 10 min. Ao término das ciclagens as amostras foram retiradas do termociclador e armazenadas no Freezer a numa temperatura de -20°C em seguida analisadas.

Análise dos dados

Os padrões de banda foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,25% corado com *Blue green loading dye I* (LGC- Biotecnologia) , visualizados em transluminador de ultravioleta, comparados com o marcador de peso molecular 100 bp (DNA Ladder, Invitrogen, USA) e fotodocumentados.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Ensaio de citotoxicidade em células tumorais - teste do MTT

Os resultados da atividade antiproliferativa dos derivados da nitrofurantoína realizada através do teste do MTT está representada na tabela 2. Todos os derivados testados apresentaram atividade citotóxica em pelo menos uma das linhagens testadas. No entanto, o composto M8A (N-pentil nitrofurantoína) foi o mais ativo frente a todas as linhagens testadas, com a CI_{50} variando de 1,3 a 2,4 $\mu\text{g/mL}$. O protótipo nitrofuratoína também apresentou atividade citotóxica frente às linhagens MCF-7, NCI-292 e HL-60, porém foi menos tóxica nas linhagens HT-29 e MCF-7. O derivado MNOH (N-hidroxi-metil-nitrofurantoína) apresentou citotoxicidade nas linhagens MCF-7, NCI-292 e HL-60, sendo menos tóxico na linhagem HT-29. De todos os compostos testados o M5A (N-butoxi-metileno-nitrofurantoína) foi o menos ativo, com valores de CI_{50} variando de 7,4 a 16,6 $\mu\text{g/mL}$, não sendo testado na linhagem MCF-7, enquanto que o derivado M9A teve a sua citotoxicidade seletiva para as linhagens MCF-7 e HL-60, com valores de CI_{50} de 1,9 e 1,4 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A doxorrubicina foi usada como controle positivo e apresentou citotoxicidade menor que 1 $\mu\text{g/mL}$ em todas as linhagens.

Tabela 2. Apresenta os valores de CI50% (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular), ($\mu\text{g/mL}$) e intervalo de confiança de 95%, realizado pelo teste do MTT após 72 horas de incubação. NT* – não testado.

Linhagens	HT29	MCF-7	NCI-292	HL-60
	CI50	CI50	CI50	CI50
DOX	0,9 0,6 – 1,5	0,2 0,1-0,2	0,04 0,01 - 0,1	0,02 0,01-0,02
MNFT	7,2 6,1 – 8,7	3,3 2,4 – 4,5	0,8 0,6- 1,2	1,3 1,06 – 1,5
MNOH	13,2 9,8 – 17,8	3,9 2,9 -5,1	1,6 1,3- 2,2	2,7 2,3 -3,09
M5A	9,6 6,9 – 13,7	NT*	16,6 11,0 – 25,3	7,4 5,9- 9,2
M8A	1,9 1,5 – 2,5	1,3 1,0 -1,6	2,4 1,9 – 3,08	2,2 1,7-2,7
M9A	9,3 5,7 – 15,7	1,9 1,7 – 2,3	8,2 7,3- 9,3	1,4 1,2 – 1,8

Como o composto M8A foi o mais citotóxico dentre todos os derivados testados, este foi selecionado para dar continuidade aos estudos sobre possíveis mecanismos de ação. A linhagem HL-60 foi escolhida pelo fato desta linhagem ter apresentado sensibilidade ao M8A e por ser um tipo celular cultivado em suspensão, o que viabiliza a realização dos experimentos de mecanismo de ação.

A literatura enfatiza a importância da síntese de novo derivados e o melhoramento do desempenho da atividade biológica de nitrocompostos baseados em estruturas já

conhecidas e com bioatividade já comprovada, através de modificações moleculares planejadas visando influenciar na atividade biológica através de suas propriedades físico-químicas (LEMKE; WILLIAMS; FOYE'S, 2008). De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (*International Standard Organization*), ISO 10993, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a atividade de candidatos a fármacos anticâncer (ROGERO et. al, 2003). Um dos principais testes utilizados na determinação da citotoxicidade é o teste do MTT (BERRIDGE; HERST; TAN, 2005). O NCI (*National cancer Institute*) dos Estados Unidos utiliza em seus protocolos a concentração inicial de 10 µg/mL, considerando um produto puro como citotóxico os que apresentarem o valor da CI50 abaixo de 5 µg/mL. Todos os compostos testados neste estudo apresentaram atividade citotóxica em pelo menos uma das linhagens tumorais exceto o derivado M5A. Isto se deu pelo fato de que a maioria dos nitrocompostos com ação anticâncer, antiparasitária e antimicrobiana, tem o processo de biorredução enzimática do grupo nitro e subsequente interação dos produtos formados com biomoléculas essenciais de bactérias, fungos e parasitas como provável mecanismo de ação, o que o torna um pré-requisito para o bom desempenho desta classe de compostos (TOCHER, 1997; VIODÉ et al., 1998).

Após a realização do teste de citotoxicidade de 72 horas foi realizado um novo teste de 24 horas com o selecionado, o M8A, na linhagem HL60 para determinar a dose na qual seria utilizado para os ensaios posteriores. O resultado mostrou uma CI50% de 5,4 µg/mL com intervalo de 3.345-8.821, porém para facilitar a realização dos experimentos posteriores essa concentração foi arredondada para 6,0µg/mL. As concentrações utilizadas nos ensaios posteriores foram o valor da CI50% (6,0 µg/mL) e duas vezes o valor da CI50% (12,0 µg/mL).

Derivados nitrofurantoínicos são descritos na literatura por apresentarem atividade tripanossomicida, entretanto não existem estudos referentes às suas propriedades citotóxicas e anticâncer, sendo este estudo uma contribuição importante para a descoberta e desenvolvimento de novas drogas.

6.2 Ensaio de citotoxicidade em linfócitos humanos

O teste foi realizado também utilizando da técnica do MTT e teve como objetivo verificar a citotoxicidade do composto M8A frente às células de linfócitos humanos. O

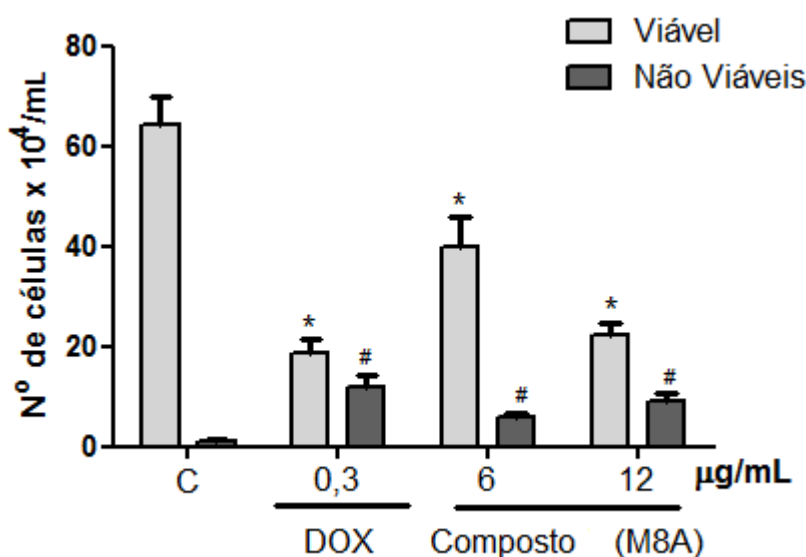
composto apresentou IC50% de 8,4 µg/mL, com intervalo de confiança variando entre 5,4 – 12,9 µg/mL. Este valor foi cerca de quatro vezes menos tóxico para linfócitos humanos do que para a HL-60 onde a sua IC50% foi de 2,2 µg/mL.

O teste de citotoxicidade em linfócitos humanos é um passo importante na descoberta de novos fármacos já que o intuito de se lançar novos fármacos anticâncer no mercado é aumentar o efeito anticâncer do composto e diminuir seus efeitos adversos. Um dos efeitos adversos mais comuns em pacientes portadores de câncer é a imunossupressão (VASIEVICH; HUANG, 2011). Em estudo de citotoxicidade com o nitrofurano quinifuril realizado por Rossa et al., (2003) apresentou alta toxicidade *in vitro* em células leucêmicas de rato e baixa toxicidade em células de animais normais quando comparado a nitracrina, já disponível na terapêutica. Os resultados encontrados neste trabalho corroboram com o estudo feito por Blumenstiel et al., (1999) que comprovaram que alguns derivados nitrofurânicos como a nifuroxazida e o nifuprazine não apresentaram efeitos tóxicos frente às células de mamíferos.

6.3 Determinação da viabilidade celular do M8A pelo azul de tripan

Para confirmar a viabilidade celular (número de células viáveis) foi realizado o teste do azul de tripan. A Figura 15 mostra a redução do crescimento celular, onde as concentrações de 6,0 µg/mL e 12,0 µg/mL reduziram o crescimento celular em 37,5 e 64%, respectivamente em relação ao grupo controle. A doxorubicina apresentou uma redução no crescimento de 70%.

Figura 16. Determinação da viabilidade células através do teste do azul de tripan após 24 horas incubação com o composto M8A (6,0 e 12,0 $\mu\text{g/mL}$). O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO). A doxorubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$) foi utilizada como controle positivo. * $P < 0,05$ comparado com o controle através da análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Newman-Keuls para comparação múltipla. Os dados são apresentados como média $\pm$ EP de três experimentos independentes.



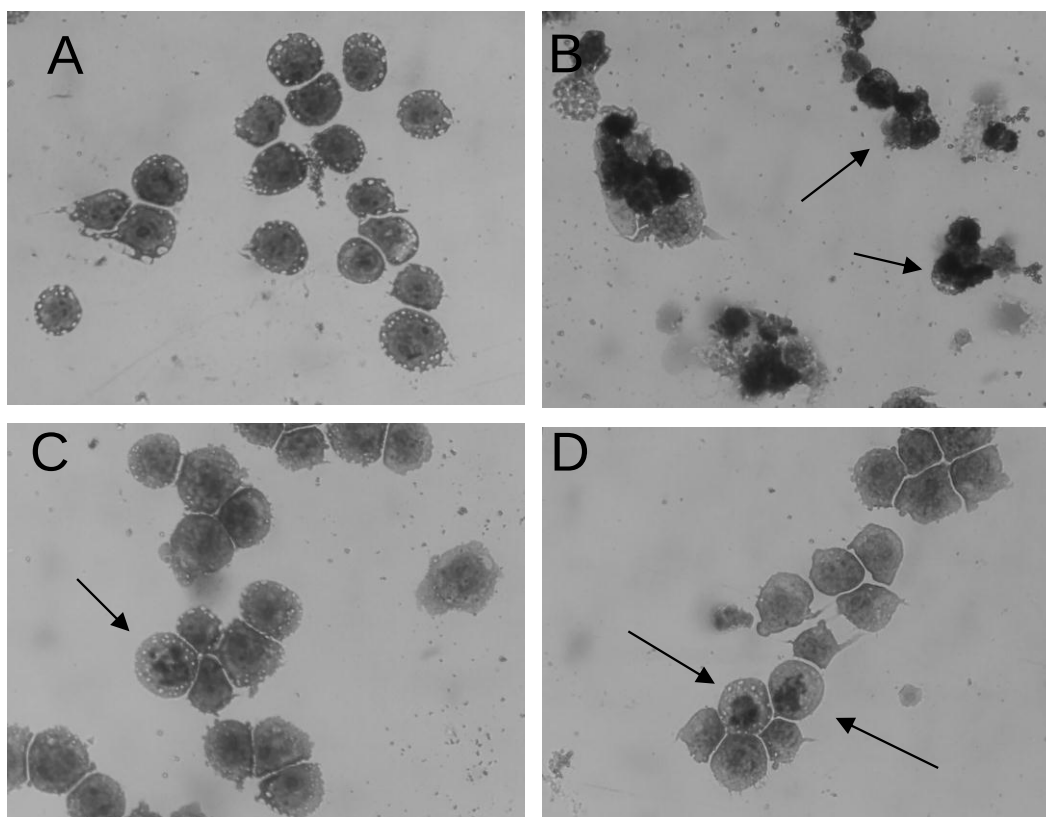
Um dos parâmetros mais utilizados para avaliar a toxicidade é a viabilidade celular, que pode ser evidenciada com auxílio de corantes vitais como, por exemplo, o azul de tripan (ROGERO et. al., 2003). O teste de exclusão do corante azul de tripan estuda a permeabilidade da membrana plasmática (BARILE, 1994). Portanto, mesmo a membrana sendo lisada por um agente citotóxico, organelas citoplasmáticas ainda podem manter sua atividade fisiológica, bombeando o corante para fora da célula (VALADARES, 2007).

As células em apoptose mantêm suas membranas íntegras durante quase todo o processo até a sua morte, diferentemente das células necróticas que morfologicamente apresentam perda da integridade da membrana, a célula fica túrgida e o DNA é degradado aleatoriamente (CHO et al., 2010; HENRIQUEZ et. al., 2008). Os resultados obtidos com o azul de tripan mostrou que o composto M8A diminuiu significativamente o número de células viáveis nas duas concentrações testadas (6,0 e 12,0 $\mu\text{g/mL}$) e consequentemente diminuiu o número de células não viáveis, de forma dose dependente.

6.4 Avaliação da morfologia

A morfologia das células HL-60 foi avaliada pelo método de coloração (May-Grunwald-Giemsa), após 24 horas de incubação com o composto M8A conforme mostrado na Figura 16. A análise por microscopia óptica revelou diversas alterações morfológicas induzidas pela substância testada. As células do grupo controle negativo (não tratadas) exibiram uma morfologia típica de células não aderidas, tais como: membrana íntegra e nítida visualização das membranas plasmática e nuclear. Nos grupos tratados com M8A nas doses de 6,0 e 12,0 $\mu\text{g/mL}$, as células apresentaram morfologia consistente com células em processo de apoptose, incluindo, redução do volume celular, fragmentação do DNA e restos celulares. A doxorubicina 0,3 $\mu\text{g/mL}$ foi utilizada como controle positivo e apresentou características de células necróticas como fragmentação da membrana plasmática. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO).

Figura 17. Análise morfológica de células HL-60 após 24 horas de incubação com o composto M8A coradas pelo May-Grunwald-Giemsa. A- Controle Negativo (DMSO), B- Doxorubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$), C- M8A (6,0 $\mu\text{g/mL}$) e D- M8A (12,0 $\mu\text{g/mL}$). As setas indicam fragmentação do DNA.

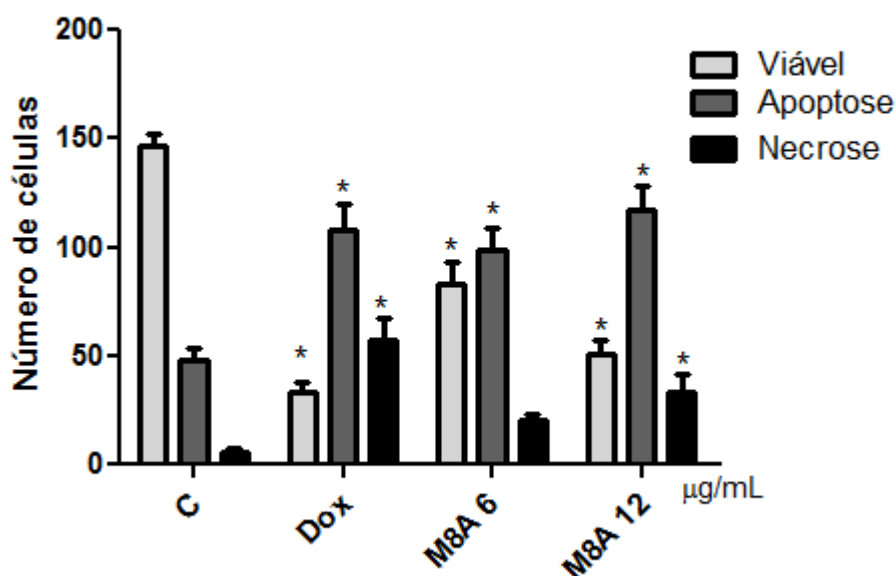


A análise de alterações morfológicas permite uma confirmação dos resultados obtidos nos testes de viabilidade celular. Para que a célula esteja realmente sofrendo processo de apoptose é necessário que haja uma manutenção da integridade da membrana e que a célula apresente alguns tipos de alterações como, por exemplo, condensação da cromatina e fragmentação do núcleo (MESQUITA, 2009). Os resultados obtidos na análise morfológica mostram alterações que incluíram, além da fragmentação do DNA, células picnóticas e restos celulares. As células do controle negativo se apresentaram normais com núcleos volumosos, enquanto que as células tratadas com doxorrubicina apresentaram redução do volume celular, fragmentação do DNA e condensação da cromatina.

6.5 Análise morfológica – marcação com anexina V/iodeto de propídeo

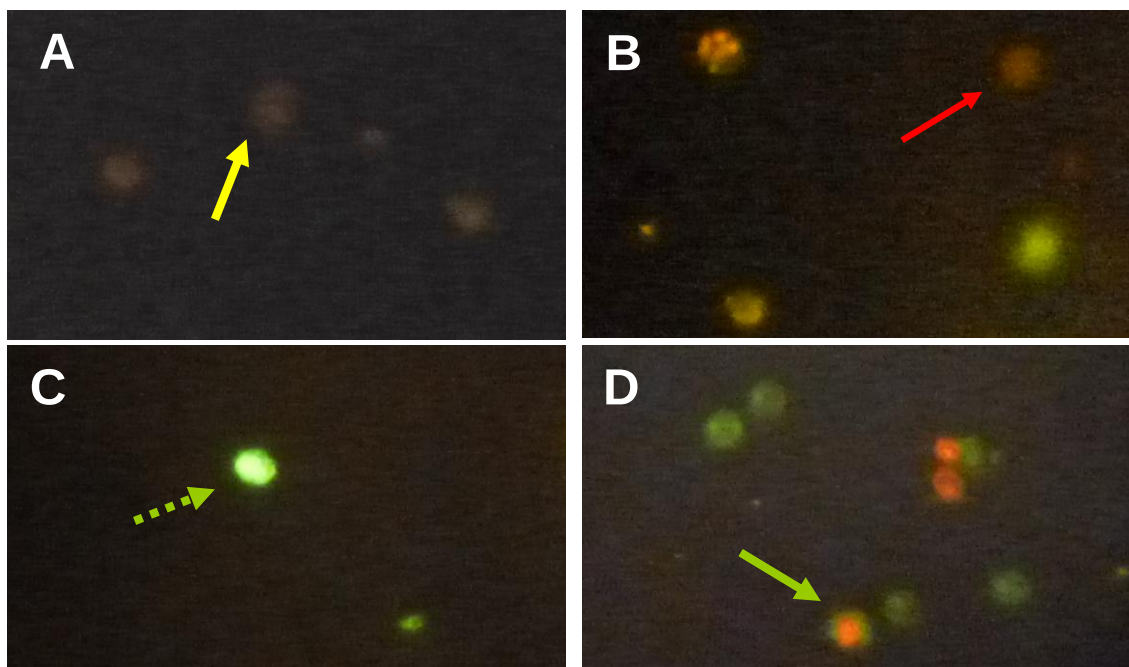
Para confirmar processo de apoptose induzido pelo derivado M8A nas células HL-60 conforme evidenciado em experimentos anteriores, foi realizado a marcação com anexina e iodeto de propídeo por microscopia de fluorescência. Foram contadas cerca de 200 células por amostra. Os resultados mostram que o M8A nas concentrações de 6,0 e 12,0 µg/mL induziram apoptose em 49 e 60% das células, respectivamente. O grupo controle apresentou 24% de células em apoptose ($p < 0,05$). O controle positivo, doxorrubicina, apresentou 54% de células em apoptose. O M8A nas concentrações de 6,0 e 12,0 µg/mL causaram necrose em 10% e 15% das células, respectivamente. Estes valores foram menores do que o apresentado pela doxorrubicina (29% de células em necrose). (Figura 18).

Figura 18. Efeito do composto M8A (6,0 e 12,0 $\mu\text{g/mL}$) e da doxorubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$), na linhagem de células HL-60, determinadas por microscopia de fluorescência utilizando o kit anexina V-FITC, após 24 h de incubação. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO) a 0.1%. A doxorubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$) foi utilizada como controle positivo. * $P < 0,01$ comparado com o controle por meio de ANOVA, seguido de teste de Newman-Keuls de comparação múltipla. Os dados são apresentados como média $\pm$ EP de três experimentos independentes.



A análise por microscopia de fluorescência permitiu verificar que as células que se encontravam em apoptose apresentavam um padrão diferente na fluorescência. Algumas possuíam apenas a externalização da fosfatidilserina (Figura 19C) enquanto outras apresentavam, além da externalização da fosfatidilserina, o núcleo marcado com o iodeto de propídeo. Isto se dá ao fato de que o processo de apoptose na sua fase inicial apresenta membrana plasmática íntegra, o que não permite a entrada do iodeto de propídeo, portanto a célula fica toda marcada de verde fluorescente (Figura 19C). No entanto, na fase final da apoptose há uma perda da integridade da membrana o que permite a entrada do iodeto de propídeo, marcando o núcleo de vermelho, o que é considerada uma apoptose tardia (Figura 19D). Neste estudo, o composto M8A (6,0 $\mu\text{g/mL}$) induziu a apoptose das células, sendo em sua maioria na fase inicial (Figura 19C). As células tratadas com o M8A na dose de 12,0 $\mu\text{g/mL}$ se apresentaram, na sua maioria, em apoptose tardia (Figura 19D). As células tratadas com doxorubicina se apresentaram, em sua maioria, em apoptose tardia e necrose (Figura 19B).

Figura19. Análise morfológica da fluorescência Anexina V/Iodeto de propídeo. A. controle negativo, B. doxorubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$), C. M8A (6,0 $\mu\text{g/mL}$) e D. (12,0 $\mu\text{g/mL}$). Analisadas por um microscópio de fluorescência (Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha), a uma ampliação de 400x, e filtro de excitação de 450-490nm.  Célula viável,  Célula em apoptose inicial,  Célula em apoptose tardia,  Célula necrótica.



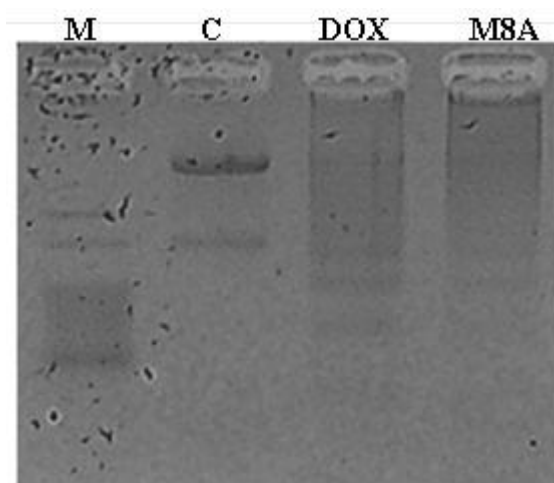
Uma característica bioquímica importante na detecção da apoptose é a externalização da fosfatidilserina presente na região interna da bicamada lipídica (BRATON et. al, 1997). A anexina V é uma proteína recombinante utilizada na identificação deste evento, pois ela interage de forma específica com os resíduos da fosfatidilserina (ARUR et. al., 2003). O iodeto de propídeo (IP) por sua vez, só consegue intercalar o DNA e marcar o núcleo de vermelho se a membrana celular estiver danificada, processo este que só ocorre em células necróticas ou em apoptose tardia (KUMMAR et al., 2004).

A utilização do teste da AnexinaV/Iodeto de propídeo foi realizado com o intuito de se caracterizar bioquimicamente a indução da apoptose. Os resultados mostraram que a indução da apoptose ocorre de uma forma dose depende, sendo maior na concentração de 12 $\mu\text{g/mL}$.

6.6 Análise da fragmentação do DNA – Teste do DNA Ladder

A Figura 20 mostra a fragmentação do DNA causada pelo derivado M8A. A imagem mostra que na concentração de 12,0µg/mL, o composto M8A causou fragmentação do DNA no padrão de escada, o que não ocorreria caso a morte celular fosse por necrose, pois esta no gel aparece com um padrão de “arrastado”. A doxorubicina (0,3 µg/mL) também induziu a fragmentação do DNA, confirmando assim os resultados da análise de fluorescência que mostraram uma grande quantidade de células em apoptose induzidas pelo composto teste. O controle negativo apresentou duas bandas íntegras encontras no DNA genômico.

Figura 20. Análise da fragmentação do DNA, teste do DNA *Ladder* induzido pelos compostos através de gel de agarose a 2% corados com *Blue green loading dye I* (LGC- Biotecnologia) , visualizados em transluminador de ultravioleta, comparados com o marcador de peso molecular 100 bp (Invitrogen, USA) e fotodocumentados. M (marcador), C (controle negativo tratado com veículo (DMSO), DOX (Doxorrubicina 0,3µg/mL), M8A (12,0 µg/mL).



Uma das principais características da apoptose é o processo de fragmentação do DNA em fragmentos com 180-200 pares de base ou múltiplo integrais, produzindo o típico "Padrão em escada" no gel. A fragmentação do DNA na apoptose ocorre através da ativação de endonucleases, diferentemente da necrose onde a fragmentação ocorre de forma aleatória produzindo assim um padrão de “arrastado” no gel (GOLD et al., 1993).

O teste do DNA *ladder* confirmou os resultados da microscopia de fluorescência, mostrando assim que o composto M8A está induzindo a morte celular por apoptose. O padrão de duas bandas no controle negativo pode ocorrer em DNA genômico sem

significar algum tipo de alteração ou fragmentação. O padrão de 2 bandas no controle negativo é considerado característico em DNA genômico (BERTÃO et al., 2012).

Este teste está sendo amplamente utilizado para indicar células em apoptose em diversos estudos de atividade antiproliferativa por ser um teste específico e de baixo custo (ANAZETTI et al., 2003; BERTÃO et al., 2012; LIN; FUJII; HOU, 2003, 2004).

6.7 Análise da expressão gênica de proteínas pró-apoptótica (Bax) e antiapoptótica (BCLxL) – utilizando a RT-PCR

Para ocorrer a apoptose é necessário que haja a ativação de proteínas pró-apoptóticas e a inibição das proteínas anti-apoptóticas. Com o intuito de se verificar o perfil da expressão de genes envolvidos no processo apoptótico (Bax e BCLxL) foi realizada a RT-PCR após 6 horas de incubação com o composto teste. A análise dos dados mostra que houve um aumento na expressão da proteína pró-apoptótica Bax nas células tratadas com o composto M8A nas doses de 6,0 e 12,0 $\mu\text{g/mL}$, em comparação ao grupo controle. O gene BCLxL aparentemente não sofreu alteração na sua expressão em nenhum dos grupos. Os resultados indicam que o composto M8A está induzindo a apoptose nas células HL-60, pelo menos em parte, através do aumento da expressão da proteína pro-apoptótica Bax, que está envolvida na via apoptótica intrínseca (Figura 21).

Figura 21. RT-PCR dos genes antiapoptótico BCLxL e pró-apoptótico Bax em células HL-60 incubadas com o composto M8A (6,0 e 12,0 $\mu\text{g/mL}$). O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO). Os padrões de banda foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,25% corado com *Blue green loading dye I* (LGC- Biotecnologia) , visualizados em transluminador de ultravioleta e comparados com o marcador de peso molecular 100 bp (DNA Ladder, Invitrogen, USA) e fotodocumentados.

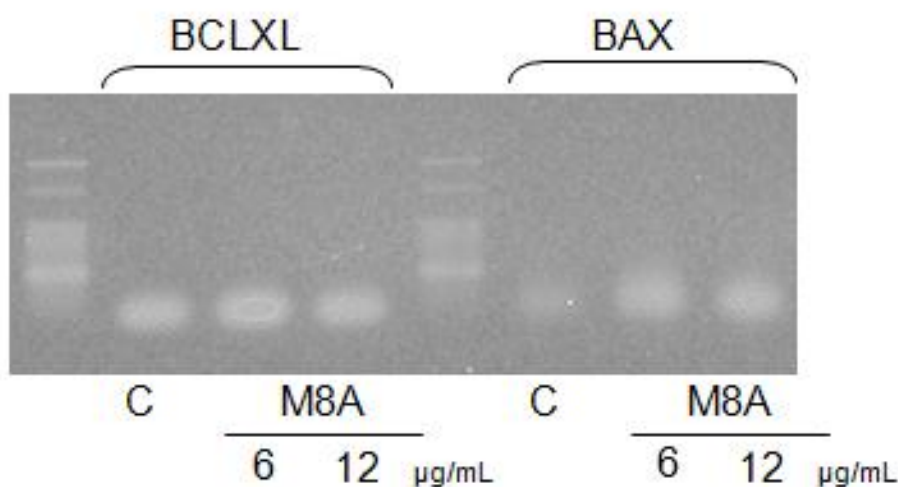
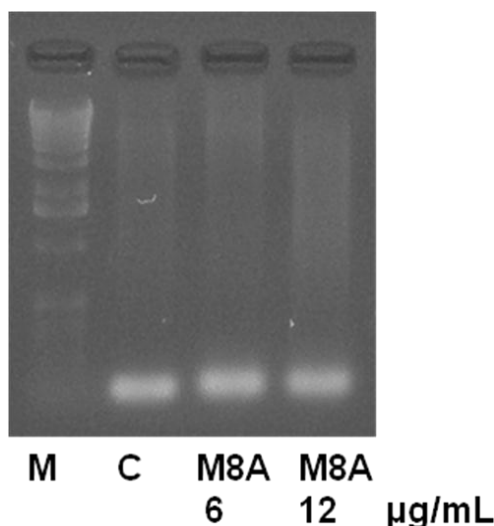


Figura 22. RT-PCR do gene controle GADPH em células HL-60 incubadas com o composto M8A (6,0 e 12,0 μ g/mL). O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO). Os padrões de banda foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,25% corado com *Blue green loading dye I* (LGC- Biotecnologia) , visualizados em transluminador de ultravioleta e comparados com o marcador de peso molecular 100 bp (DNA Ladder, Invitrogen, USA) e fotodocumentados.



A análise da expressão gênica é fundamental para a pesquisa biológica na detecção da expressão diferencial de um (s) gene (s) entre o estado normal e de doença podendo fornecer subsídios para novas abordagens terapêuticas no tratamento de doenças. O advento de técnicas de análises quantitativas em tempo real como a RT-PCR para medição da expressão de genes tem permitido a determinação exata dos níveis de expressão de genes alvos (BARBER et al., 2005).

Para a confirmação dos resultados foi utilizado um gene controle que não altera sua expressão nas condições do experimento, o GADPH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase). Este gene também chamado de “housekeeping” é usado para normalizar dados de expressão de genes em estudos de apoptose (BARBER et al., 2005).

Os genes BCLxL e Bax foram selecionados para o atual estudo por estarem envolvidos na via intrínseca da apoptose que é controlada pela família BCL2 composta por proteínas anti-apoptóticas, (Bcl-2, Bcl-XL, MCL-1) e pró-apoptóticas (Bax, Bid, Bak), estas proteínas regulam o potencial de membrana do retículo endoplasmático e mitocôndrias, sendo crucial para transmitir sinais pró-apoptóticos de morte celular, a ativação da protease procaspase -9, do citocromo c e do fator ativador de protease

apoptótica 1 (APAF-1), formando um complexo conhecido como apoptossomo que ativa a caspase-9, que por sua vez, ativa as caspases efetoras, como por exemplo as caspases 3, 6 e 7 que são responsáveis pela maior parte das alterações nas características morfológicas relacionadas a apoptose, como a externalização da fosfatidilserina (PS), a condensação da cromatina e a fragmentação do DNA (GHAVAMI et al., 2009; WANG et al., 2005).

Nas células que estão sofrendo o processo de apoptose, as proteínas anti-apoptóticas precisam ter sua expressão diminuída, e as proteínas pró-apoptóticas sua expressão aumentada. No entanto, a literatura apresenta resultados em que algumas proteínas antiapoptóticas mantêm seu padrão de expressão inalterado, enquanto que há um aumento de expressão de proteínas pró-apoptóticas induzidas por compostos diversos (ABONDANZA et al., 2008; FLOROS et al., 2006; PINTO et al., 2011). Estes estudos corroboram com os resultados encontrados neste trabalho. Analisando os perfis das bandas não se pode dizer se a expressão de Bax é dose dependente já que aparentemente nos dois grupos tratados com M8A (6,0 e 12,0 µg/mL) as bandas estão no mesmo padrão.

Os testes realizados neste trabalho comprovam que o derivado da nitrofurantoína M8A tem atividade antiproliferativa induzindo a morte celular por apoptose em células HL-60, com fortes indícios do envolvimento da via intrínseca ou mitocondrial.

7 CONCLUSÃO

Através do ensaio de citotoxicidade podemos concluir que tanto a nitrofurantoína como seus derivados apresentaram atividade citotóxica frente a quatro linhagens de células cancerígenas (HL-60, MCF-7, HT-29, NCI-292), sendo o derivado M8A o que se mostrou mais eficaz.

Os testes de mecanismo de ação mostraram que o composto M8A induz apoptose em células HL-60. Através da análise da RT-PCR pode-se verificar que realmente o derivado M8A induz a apoptose através da ativação da proteína pró-apoptótica Bax, sugerindo assim a participação da via intrínseca.

No entanto mais estudos precisam ser realizados como a RT-PCR Real Time para poder quantificar a expressão desses genes, assim como ensaios que confirmem o envolvimento da via intrínseca da apoptose como a determinação de caspases.

REFERÊNCIA

- ABONDANZA, T.S.; OLIVEIRA, C.R.; BARBOSA, C.M.V.; PEREIRA, F.E.G.; CUNHA, R.L.O.R. CAIRES, A.C.F.; COMASSETO, J.V.; QUEIROZ, M.L.S.; VALADARES, M.C.; BINCOLETTTO, C. Bcl-2 expression and apoptosis induction in human HL60 leukaemic cells treated with a novel organotellurium(IV) compound RT-04. **Food and Chemistry Toxicologic**. 46: 2540–2545. 2008.
- ALLEY, M. C.; SCUDIERE, D. A.; MONKS, A.; HURSEY, M. L.; CZERWINSKI, M. J.; FINE, D. L.; ABBOTT, B. J.; MAYO, J. G.; SHOEMAKER, R. H.; BOYD, M. R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Research**. 48: 589-601. 1988.
- AL-MASOUDI, N.A.; AL-SOUD, Y.A.; KALOGERAKIS, A.; PANNECOUQUE, C.; DE CLERCO, E.; Nitroimidazoles, part 2: Synthesis, antiviral and antitumor activity of new 4-nitroimidazoles. **Chemistry Biodiversity**. 3: 515. 2006.
- ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI, C.A. DONNIC, D. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo celular específicos e ciclo celular não específico que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**. 28: 118-129. 2005.
- ANAZETTI, M.C.; MELO, P.S.; DURAN, N.; HAUN, M. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology**. 88: 261-274. 2003.
- ARUR, S.; UCHE, U.E.; REZAUL, K.; FONG, M.; SCRANTON, V.; COWAN, A.E.; MOHLER, W.; HAN, D.K. 2003. Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. **Developmental Cell**. 4: 587-598.
- ASHKENAZI, A. Targeting death and decoy receptors of the tumor-necrosis factor superfamily. **Nature Reviews Cancer**. 2: 420-30. 2002.
- BARBER, R. D; HARMER, D. W; COLEMAN, R. A; CLARK, B. J. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. **Physiologic Genomic**. 21: 389-395. 2005.

BARILE, F.A. **In vitro cytotoxicology**. CRC Press. 1994. 96p.

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

BERTÃO, H.G.; SILVA, R.A.R.; BAPTISTA G.R.; ALBUQUERQUE, M.C.P.A. Miltefosine, na alkylphosphocholine originally developed as an antitumoral, ia an affective compound against *Schistosoma mansoni*. **Molecules**. 1: 7-21. 20112.

BLACK, M.; RABIN, L.; SCHATZ, N. Nitrofurantoin-induced chronic active hepatitis. **Annal Internal Medicine**. 92: 62-64. 1980.

BLUMENSTIEL, K.; SCHONECK, R.; YARDLEY, V.; CROFT, S.L; KRAUTH-SIEGEL, R.L. Nitrofurantoin drugs as common subversive substrates of *Trypanosoma cruzi* lipoamide dehydrogenase and trypanothione reductase. **Biochemical Pharmacology**. 58:1791-1799. 1999.

BRATTON, D.L.; FADOK, V.A.; RICHTER, D.A.; KAILEY, J.M.; GUTHRIE, L.A.; HENSON, P.M. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calciummediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. **Journal Biological Chemistry**. 272: 26159-26165. 1997.

BRÖKER, L.E.; KRUYT, F. A.E.; GIACCONE, G. Cell death independent of caspases: a review. **Clinical Cancer Research**. 11: 3155-162. 2005.

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

BRUIN, E.C.; MEDEMA, J.P. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. **Cancer Treatment Reviews**. 34: 737-749. 2008.

BRUMFITT, W.; HAMILTON-MILLER, J.M. Efficacy and safety profile of long-term nitrofurantoin in urinary infections: 18 years' experience. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. 42: 363-71. 1998.

BURQUE, C. D; MILITÃO, G. C. G; LIMA, D. J. B; LOTUFO, L. V. C; PESSOA, C; MORAES, M. O. Pterocarpanquinones, aza-pterocarpanquinone and derivatives: Synthesis, antineoplastic activity on human malignant cell lines and antileishmanial activity on *Leishmania amazonensis*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**. 19: 6885–6891. 2011.

CHAMMAS, R.; BRENTANI, R.R. Cell-matrix interactions. **Elsevier Science (USA)**. 1: 405-414. 2002.

CHO, Y.S.; PARK, S.Y.; SHIN, H.S, CHAB, F.K. Physiological consequences of programmed necrosis, an alternative form of cell demise. **Molecules and Cells**. 29: 327-32. 2010.

CULLINANE, C.; CUTTIS, S. M.; VANROSMALLEN, A.; PHILLIPS, D. R. Formation of adriamycin-DNA adducts in vitro. **Nucleic Acids Research**. 22: 2296. 1994.

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

DAVID, E.R.; ZIMMERMAN, M.R. Cancer an old disease, a new disease or something in between. **Nature Review Cancer**.10: 728-733. 2010.

DENECKER, G., VERCAMMEN, D.; STEEMANS, M.; VAN DEN BERGHE, T.; BROUCKAERT, G.; VAN LOO, G.; ZHIVOTOVSKY, B.; FIERIS, W., GROOTEN, J., DECLERCQ, W.; VANDENABEELE, P.; Death receptor-induced apoptotic and necrotic cell death: Differential role of caspases and mitochondria. **Cell Death and Differentiation**. 8: 829-840. 2001.

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

DODD, M.C.; STILLMAN, W.B. The in vivo bacteriostatic action of some simple furan derivatives. **Journal Pharmacol**. 82: 11-18. 1994.

EISENBERG-LERNER, A.; BIALIK, S.; SIMON, H.U.; KIMCHI, A. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. **Cell Death Differentiation**. 16: 966–975. 2009.

FADEEL, B.; ORRENIUS.; Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. **Journal Internal Medicine**. 6: 479-517. 2005.

FADOK, V.A.; VOELKER, D.R.; CAMPBELL, P.A.; COHEN, J.J.; BRATTON, D.L.; HENSON, P.M. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. **Journal Immunology**. 148: 2207-2216.

FLOROS, K.M.; HELLINIDA T.; DIMITRA F.; MAROULIO T.; ANDREAS S. Alterations in mRNA Expression of Apoptosis-Related Genes *BCL2*, *BAX*, *FAS*, *Caspase-3*, and the Novel Member *BCL2L12* after Treatment of Human Leukemic Cell Line HL60 with the Antineoplastic Agent Etoposide. **Academy of Science**. 1090: 89–97. 2006.

GHAVAMI, S.; HASHEMI, M.; ANDE, S.R.; YEGANEH, B.; XIAO, W.; ESHRAGHI, M.; BUS, C.J.; KADKHODA, K.; WIECHEC, E.; HALAYKO, A.J.; LOS, M. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. **Journal Medical Genetics**. 46: 497-510. 2009.

GOLD, R.; SCHMIED, M.; ROTHE, G.; ZISCHLER, H.; BREITSCHOPF, H.; WEKERLE, H.; LASSMANN, H. Detection of DNA fragmentation in apoptosis: application of in situ nick translation to cell culture systems and tissue sections. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**. 41: 1023–1030. 1993.

GOLSTEIN, P.; KROEMER, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **Trends Biochemical Science**. 32: 37–43. 2007.

GOMES-CARNEIRO, M.R.; RIBEIRO-PINTO, L.F.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Fatores de risco ambientais para o câncer gástrico: a visão do toxicologista. **Cadernos de Saúde Pública**. 13: 27-38. 1997.

GOTTLIEB, E.; VANDER, HEIDEN, M.G.; THOMPSON, C.B. Bcl-XL prevents the initial decrease in mitochondrial membrane potential and subsequent reactive oxygen species production during tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. **Molecular Cellular Biology**. 20: 5680-689. 2000.

GRANDER, D.; KHARAZIHA P.; LAANE E.; POKROVSKAJA K.; PANARETAKIS, T. Autophagy as the main means of cytotoxicity by glucocorticoids in hematological malignancies. **Autophagy**. 5: 1198–1200. 2009.

GREEN, D. R.; KROEMER, G. The Pathophysiology of Mitochondrial Cell Death. **Science**. 305: 626-629. 2004.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; DA ROCHA, A.B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de cancerologia**. 53: 335-343. 2007.

GRODSTEIN. F; MANSON, J. E; STAMPFER, M. J. Hormone therapy and coronary heart disease: the role of time since menopause and age at hormone initiation. **Journal Womens Health**. 15: 35-44. 2006.

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

GUMP, J.M.; THORBURN, A.; Autophagy and apoptosis: what is the connection. **Trends Cellular Biology**. 21: 387–392. 2011.

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

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**. 100: 57–70. 2000.

HARRINGTON, K.J.; MELCHER, A.; VASSAUX, G.; PANDHA, H.S; VILE, R.G. Exploiting synergies between radiation and oncolytic viruses. **Current Opinion in Molecular Therapeutics**. 10: 362–70. 2008.

HARTWELL, L.H.; KASTAN, M. B. Cell cycle control and cancer. **Science**. 266: 1821-1828. 1994.

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

HENRIQUEZ, M.; ARMISÉN, R.; STUTZIN, A.; QUEST, A.F. Cell death by necrosis, a regulated way to go. **Current Opinion in Molecular Therapeutics**. 8: 187-206. 2008.

HERLICH, P.; SCWEIGEL, M. Nitrofurans. A group of synthetic antibiotics with a new mode of action; Discrimination of specific Messenger RNA classes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 73: 3386-3390. 1976.

HIRAKU, Y.; SEKINE, A.; NABESHI, H.; MODORIKAWA, K.; MURATA, M.; KUMAGAI, Y.; KAWANISHI, S. Mechanism of carcinogenesis induced by a veterinary antimicrobial drug, nitrofurazone, via oxidative DNA. **Cancer Letters**. 215:141-50. 2004.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Quimioterapia. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=101 Acesso em: 27 de Nov de 2012.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Radioterapia. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=100 acesso em: 30 de Nov de 2012.

KEPP, O.; GALLUZZI, L.; LIPINSKI, M.; YUAN, J.; KROEMER, G. Cell death assays for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**. 10: 221–237. 2011.

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

KOROLKOVAS, A.; BURCKAHALTER, J. H. **Química farmacêutica**, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1988, 784p.

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

KROEMER, G.; REED, J.C. Mitochondrial control of cell death. **Nature Medicine**. 6: 513-519. 2000.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S. **Pathologic Basis of Disease**, 7 ed. WB Saunders, 2004. 1552p.

LAANE, E.; TAMM K.P.; BUENTKE, E.; ITO, K.; KHARAZIHA, P.; OSCARSSON, J. *et al.* Cell death induced by dexamethasone in lymphoid leukemia is mediated through initiation of autophagy. **Cell Death Differentiation**. 16: 1018–1029. 2009.

LEMKE, T.L.; WILLIAMS, D.A.; FOYE'S. **Principles of medicinal Chemistry**, 6. ed. Lippincott Williams & Wilkins. Baltimores, 2008. 470p.

LIN, S.; MAKOTO, F.; DE-XING, H. Rhein induces apoptosis in HL-60 cells via reactive oxygen species-independent mitochondrial death pathway. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 418: 99-107. 2003.

LOEFFLER, M.; KREMER, G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. **Experimental Cellular Research**. 256: 19-26. 2000.

LUO, J.; SOLIMINI, N.L.; ELLEDGE, S.J. Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. **Cell**. 136: 823–837. 2009.

MADEO, F.; TAVERNARAKIS, N.; KROEMER, G. Can autophagy promote longevity? **Nature Cell Biology**. 12: 842–846. 2010.

MANIATIS, T.; SMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**, 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. 156p.

MARTELI, A.M.; ZWEYER, M.; OCHIS, R.L.; TAZZARI, P.L, TABELLINI, G.; NARDUCCI, P.; BORTUL, R. Nuclear apoptotic changes: an Overview. **Journal Cellular Biochemistry**. 82: 634-646. 2001.

MCCALLA, D.R. Mutagenicity of nitrofurantoin derivatives: Review. **Environmental Mutagenesis**. 5: 745–765. 1983.

MCOSKER, C.C.; FITZPATRICK, P.M. Nitrofurantoin: Mechanism of action and implications for resistance development in common uropathogens. **Journal Antimicrobiology Chemotherapy**. 33: 23-30. 1994.

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

MURAD, A.M.; KATZ, A. **Oncologia Bases Clínicas do Tratamento**; Guanabara; Rio de Janeiro. 1996. 41p.

NICOTERA, P.; BERNASSOLA, F.; MELINO, G. Nitric oxide (NO), a signaling molecule with a killer soul. **Cell Death Differentiation**. 6: 931–933. 1999.

OLIVEIRA, A.P.; COLAÇO, A., CHAVES, R.; GUEDES-PINTO, H.; DE-LA-CRUZ, P.L.F.; LOPES, C. Chemical carcinogenesis. **Academia Brasileira de Ciências**. 79: 593-616. 2007.

PERES, C. M.; CURI, R. **Como cultivar células**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2005.

PICON, P. X.; MAROSTICA, P. J. C.; BARROS, E.; et al. **Pediatria consulta rápida**. 1. ed. São Paulo: Artmed. 2010. 78p.

RAETHER, W.; HÄNEL, H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. **Parasitology Journal**. 19-39. 2003.

REISDORFER, F.P. **QSPR/SAR em derivados 5-nitro-heterocíclicos com atividade antichagásica. Estudo das relações entre o potencial de redução do grupo nitro e propriedades físico-químicas**. Tese de doutorado, Conjunto das químicas – USP. 2007.

RICCI, M.S; ZONG, W.X. Chemotherapeutic for targerting cell death pathways. **The Oncologist**. 11: 342-357, 2006.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDAB, T.I.; CRUZ, A.S. Teste *in vitro* de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. **Materials Research**. 6: 317-320, 2003.

ROSSA, M. M.; ROCHA-E-SILVA, T. A. A.; TERRUGGI, C. H. B.; TEDESCO, A. C.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; BORISSEVICH, I. E.; DEGTEREV, I. A.; Comparison of the cytotoxicity of two nitroheterocyclic drugs (NHCD) towards transformed and non-transformed cells. **Pharmacological Research**. 48: 369-375. 2003.

SALGALLER, M.L.; LODGER, P.A. Use of cellular and cytokine adjuvantes in the immunotherapy of câncer. **Journal of Surgical Oncology**. 68: 122-138. 1998.

SALMON, S.E. KATZUNG; B.; G. **Bases em Farmacologia Básica & Clínica**, 1.ed.; Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 1998 p. 629-655.

SANTELLA R.M.; GAMMON, M.; TERRY, M. DNA adducts, DNA repair genotype/phenotype and cancer risk. **Mutation Research**. 592: 29-35. 2005.

SHACTER, E.; WEITZMAN, S.A.; Chronic inflammation and cancer. **Oncology**. 16: 217-230. 2002.

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

SHIMIZU, S.,; KANASEKI, T.; MIZUSHINA, N.; MIZUTA T, ARAKAWA-KOBAYASHI, S.; THOMPSON, C.B. et al. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. **Nature Cellular Biology**. 6: 1221–1228. 2004.

SOUZA, M.I.F. **Síntese de novos derivados da nitrofurantoina e avaliação de suas atividades biológicas**. Dissertação de mestrado. Centro de ciências da saúde. UFPE. 2011.

SPIILBERG, S.P.; GORDON, G.B. Nitrofurantoin citotoxicity. **Journal of Clinical Investigation**. 67: 37-71, 1981.

TOCHER, J. H.; Reductive activation of nitroheterocyclic compounds. **General Pharmacology**. 28: 485. 1997.

TOUCHEFEU, Y.; HARRINGTON, K.J, GALMICHE, L.P.; VASSAUX, G. Gene therapy, recent developments and future prospects in gastrointestinal oncology. **Alimentary Pharmacology Therapeutic**. 32: 953-968. 2010.

TROSKO, J.E. The role of stem cells and gap junctional intercellular communication in carcinogenesis. **Journal Biochemistry of Molecular Biology**. 36: 43–48. 2003.

VALADARES, M. C.; CASTRO, N. C.; CUNHA, L. C. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. 43: 631-638. 2007.

VAN CRUCHTEN, S.; VAN DEN BROECK, W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. **Anatomy Histology and Embryology**. 31: 214-223. 2002.

VAN LOO, G.; DEMOL, H.; VAN GURP, M.; HOORELBEKE, B.; SCHOTTE, P.; BEYAERT, R.; ZHIVOTOVSKY, B.; GEVAERT, K.; DECLERCQ, W.; VAND, J. A matrix-assisted laser desorption ionization post-source decay (MALDI-PSD) analysis of proteins released from isolated liver mitochondria treated with recombinant truncated Bid. **Cell Death Differentiation**. 9: 301-308. 2002.

VASIEVICH, E.A.; HUANG, L. The suppressive tumor microenvironment: a challenge in cancer immunotherapy. **Molecular Pharmacology**. 8: 635-41. 2011.

VIODÉ, C.; BETTACHE, N.; CENAS, N.; KRAUTH-SUEGEL, R. L.; CHAUVIÈRE, G.; BAKALARA, N.; PÉRIÉ, J. Enzymatic reduction studies of nitroheterocycles. **Biochemistry Pharmacology**. 57: 549. 1998.

WANG, J. "A Model of Intertemporal Asset Prices under Asymmetric Information." **Review Economic**. 60: 249-82. 1993.

WANG, J.; WANG, Yu J.; CAO X.D.; WU, G.C. Electroacupuncture suppresses surgical trauma stress-induced lymphocyte apoptosis in rats. **Neuroscience Letters**. 383: 68-72. 2005.

WEINBERG, R.A. **A biologia do câncer**. Porto Alegre: Artmed. 2008. 864p.

WHO, World Health Organization. Disponível em <http://www.who.int/research/en/> acessado em: 30 de novembro de 2012.

ZHANG M, Li. S.; Li. J.; ENSMINGER, W.D.; LAWRENCE, T.S. Ionizing radiation increases adenovirus uptake and improves transgene expression in intrahepatic colon cancer xenografts. **Molecular Therapy**. 8: 21–8. 2003.

ZHAO, Y.; YANG, J.; LIAO, W.; LIU, X.; ZHANG, H.; WANG, S. et al. Cytosolic FoxO1 is essential for the induction of autophagy and tumour suppressor activity. **Nature Cell Biology**. 12: 665–675. 2010.

ZIMMERMANN, K.C.; BONZON, C.; GREEN, D.R. The machinery of programmed cell death. **Pharmacology & Therapeutics**. 92: 57-70, 2001.