

Universidade Federal de Goiás

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biologia

Área de concentração: Biologia Celular e Molecular

**Ação biológica *in vitro* de tiosemicarbazonas derivadas  
de canfeno e limoneno em células de melanoma humano  
(SK-MEL-37)**

Débora Cristina Silva dos Passos

Goiânia, 2013.

Universidade Federal de Goiás

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biologia

Área de concentração: Biologia Celular e Molecular

**Ação biológica *in vitro* de tiosemicarbazonas derivadas  
de canfeno e limoneno em células de melanoma humano  
(SK-MEL-37)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal de  
Goiás, com a finalidade de obtenção do título de Doutora  
em Biologia.

Doutoranda: Débora Cristina Silva dos Passos

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Lídia Andreu Guillo

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cecília Maria Alves de Oliveira

Goiânia, 2013.

Ao meu querido esposo Juan Carlos, aos meus pais (Maria Aparecida e Jeová) e ao meu irmão (Carlos Henrique), pois, vocês são os melhores presentes que Deus poderia colocar em minha vida. Obrigada por estarem sempre presentes!! Amo muito vocês!

## AGRADECIMENTOS

“Repartir o conhecimento é uma das melhores formas de alcançar a imortalidade”.

Dalai Lama

Primeiramente a Deus por ter me proporcionado a oportunidade de estar viva e gozar de saúde para alcançar a concretização de mais uma etapa em minha vida e ter a felicidade de partilhar essa etapa com pessoas tão especiais.

À minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Lídia Andreu Guillo por partilhar seu vasto conhecimento comigo e dar-me à oportunidade de levar um pouco desse conhecimento em forma de aprendizado. Com certeza, em minha memória será sempre imortal, pois, aprendi a admirá-la muito. Muito obrigada por tudo!

À professora Dr<sup>a</sup>. Cecília Maria Alves de Oliveira do IQ/UFG pelo fornecimento dos compostos que tornaram possível a realização deste trabalho e por todo o incentivo e força ao longo da realização do mesmo.

Ao professor Dr. Armando que se prontificou de forma tão gratuita a participar da banca de avaliação da qualificação e deu contribuições muito importantes para a melhoria deste trabalho. Estou muito feliz em tê-lo nessa banca. Muito Obrigada por sua disponibilidade!

À professora Dr<sup>a</sup>. Lee Chen Chen por ter aceitado participar dessa banca. Sua presença me honra e me deixa muito contente, pois, esteve comigo ao longo dessa caminhada acadêmica e suas contribuições me ajudaram enquanto profissional, mas, acima de tudo enquanto pessoa. Sua humanidade me encanta. Obrigada por estar presente em mais essa etapa de minha vida acadêmica e pessoal. Admiro-te muito!

Ao professor Dr. Cirano por ter aceitado fazer parte dessa banca, pois, admiro muito seu trabalho e foste muito importante para que eu conseguisse chegar até aqui. Obrigada pelo fotodocumentador e por sua disponibilidade!

Ao professor Dr. Clever por ter aceitado fazer parte dessa banca. Obrigada por sua disponibilidade!

À professora Dr<sup>a</sup>. Erika Regina por ter aceitado participar dessa banca e ter contribuído tão diretamente para que esse trabalho se tornasse realidade. Minha eterna gratidão a você!

Ao professor Dr. Salvador de Carvalho por partilhar mais um momento comigo. Você é um dos maiores responsáveis por eu estar aqui e com certeza todas as palavras que eu usar será insuficiente para expressar a admiração e a gratidão que tenho por ti. Só resta dizer-lhe muito obrigada por tudo!

À Dr<sup>a</sup>. Elisângela Ribeiro por toda amizade e ensinamentos repassados. Foi um prazer imenso trabalhar com você, és um desses seres humanos raros que nos fazem acreditar que milagres são sempre possíveis de acontecer. Aprendi muito com você!

Ao senhor Meu esposo Juan Carlos por compreender minhas ausências e me apoiar durante os momentos mais complicados ao longo desse processo.

Aos meus queridos pais e ao meu irmão, meus melhores amigos e incentivadores. Chegar até aqui só foi possível porque vocês sempre me apoiaram e me incentivaram a acreditar que desistir nunca é a melhor saída. Amo vocês demais!

A todas as pessoas queridas que me incentivaram nos momentos em que a vontade humana não foi o suficiente para que eu continuasse, naqueles momentos em que só o apoio de pessoas especiais nos faz seguir em frente. Esse apoio veio no momento certo e serei eternamente grata a vocês: Kleber, Hozana, Johnathan, Geovana, Iara, Beatriz, Gleidson, Gleyce e Inês, meu muito obrigada!

A todas as minhas companheiras de laboratório: Fernanda, Ludimila, Zenilda, Iara, Érika, Kárita e Elayne pelas conversas, pelo apoio e por todos os momentos compartilhados. Foi maravilhoso trabalhar e aprender com vocês.

A todos os amigos, colegas e professores que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos vocês só me resta dizer: **Muito obrigada!!!**

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1:** Peso molecular, fórmula química e estrutural dos compostos derivados de tiossemicarbazonas. ----- 14
- Quadro 2:** Sequências dos primers e condições da PCR para RT-PCR das proteases humanas: caspase2, caspase3, caspase6, caspase8 e caspase 9 e as proteínas humanas: Apaf-1 e GAPDH.----- 27
- Quadro 3:** Valores de IC<sub>50</sub> e intervalo de confiança dos experimentos independentes realizados com os diferentes DT ----- 42
- Quadro 4:** Avaliação da variação entre as fases do ciclo celular de células de melanoma SK-MEL-37 não tratadas e células tratadas com diferentes concentrações dos DT ----- 43
- Quadro 5:** Atividade das caspases 2, 3, 6, 8 e 9 em células de melanoma SK-MEL-37 tratadas com benzaldeído tio-canfeno por 2, 4, 6 e 24h a uma concentração única de 100 µM. ----- 46
- Quadro 6:** Atividade das caspases 2, 3, 6, 8 e 9 em células de melanoma SK-MEL-37 tratadas com benzaldeído tio-limoneno por 2, 4, 6 e 24h a uma concentração única de 100 µM. ----- 48
- Quadro 7:** Atividade das caspases 2, 3, 6, 8 e 9 em células de melanoma SK-MEL-37 tratadas com m-nitro tio-limoneno por 2, 4, 6 e 24h a uma concentração única de 100 µM. ----- 49
- Quadro 8:** Atividade das caspases 2, 3, 6, 8 e 9 em células de melanoma SK-MEL-37 tratadas com p-hidróxi tio-limoneno por 2, 4, 6 e 24h a uma concentração única de 100 µM. ----- 50

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	Representação esquemática do melanoma -----	3
<b>Figura 2:</b>	Estrutura química de Tiossemicarbazonas -----	6
<b>Figura 3:</b>	Fórmula estrutural da tiossemicarbazonas sintetizadas para este estudo ----	8
<b>Figura 4:</b>	Vias apoptóticas -----	11
<b>Figura 5:</b>	Painel do aspecto visual da cultura de células de melanoma SK-MEL-37 após 24 horas de tratamento com uma concentração de 100 $\mu$ M dos diversos DT estudados. Ampliação 100x -----	30
<b>Figura 6:</b>	Painel do aspecto visual da cultura de células de melanoma SK-MEL-37 após 24 horas de tratamento com uma concentração de 100 $\mu$ M dos diversos DT estudados. Ampliação 200x -----	32
<b>Figura 7:</b>	Painel do aspecto visual da cultura de células de melanoma SK-MEL-37 após 48 horas de tratamento com uma concentração de 100 $\mu$ M dos diversos DT estudados. Ampliação 100x -----	34
<b>Figura 8:</b>	Painel do aspecto visual da cultura de células de melanoma SK-MEL-37 após 48 horas de tratamento com uma concentração de 100 $\mu$ M dos diversos DT estudados. Ampliação 200x -----	36
<b>Figura 9:</b>	Seleção visual feita a partir do tratamento das células de melanoma humano SK-MEL-37 por 72 horas, com uma concentração única de 100 $\mu$ M -----	38
<b>Figura 10:</b>	Gráfico dose-resposta do tratamento das células de melanoma humano SK-MEL-37 por 72 horas, com diferentes concentrações dos compostos pré-selecionados visualmente por desprendimento das células do fundo do frasco -- -----	39
<b>Figura 11:</b>	Gráfico dose-resposta do tratamento das células de melanoma humano SK-MEL-37 por 72 horas, com diferentes concentrações dos compostos pré-selecionados visualmente por desprendimento das células do fundo do frasco -- -----	40

<b>Figura 12:</b>	Gráfico dose-resposta do tratamento das células de melanoma humano SK-MEL-37 por 72 horas, com diferentes concentrações dos compostos pré-selecionados visualmente por desprendimento das células do fundo do frasco -----	41
<b>Figura 13:</b>	Indução da fragmentação do DNA e a parada do ciclo celular na fase SG2M após 48 horas de incubação com os DT -----	43
<b>Figura 14:</b>	Os compostos Benzaldeído tio-canfeno e Benzaldeído tio-limoneno induzem apoptose nas células de melanoma -----	44
<b>Figura 15:</b>	Benzaldeído tio-canfeno induz alterações morfológicas e fragmentação nuclear em células de melanoma SK-MEL-37 -----	45
<b>Figura 16:</b>	Curvas padrões da p-nitroanilina e da dosagem de proteínas dos experimentos referentes à quantificação da atividade das caspases 2, 3, 6, 8 e 9 em células de melanoma SK-MEL-37 tratadas com diferentes DT -----	46
<b>Figura 17:</b>	Atividade das caspases 2, 3, 6, 8 e 9 em células de melanoma SK-MEL-37 tratadas com benzaldeído tio-canfeno a uma concentração única de 100 $\mu$ M ----	47
<b>Figura 18:</b>	Atividade das caspases 2, 3, 6, 8 e 9 em células de melanoma SK-MEL-37 tratadas com benzaldeído tio-limoneno a uma concentração única de 100 $\mu$ M --	48
<b>Figura 19:</b>	Atividade das caspases 2, 3, 6, 8 e 9 em células de melanoma SK-MEL-37 tratadas com m-nitro tio limoneno TSC a uma concentração única de 100 $\mu$ M -	49
<b>Figura 20:</b>	Atividade das caspases 2, 3, 6, 8 e 9 em células de melanoma SK-MEL-37 tratadas com p-hidróxi tio-limoneno a uma concentração única de 100 $\mu$ M -----	50
<b>Figura 21:</b>	Visualização de produtos amplificados na RT PCR de RNA extraído de células SK-MEL-37 tratadas com benzaldeído tio-canfeno por 2, 6 e 24h -----	51
<b>Figura 22:</b>	Micrografia eletrônica de varredura de células da linhagem SK-MEL-37 em cultura -----	52
<b>Figura 23:</b>	Benzaldeído tio-canfeno induz a atividade de caspases em Células SK-MEL-37 -----	53

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ADN- ácido desoxirribonucléico
- BCA- ácido bicinchoninico
- BSA- soro albumina bovina
- DAPI- 4',6-diamidino-2-fenilindol
- DIABLO- “Direct IAP binding protein with low”
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- EDTA - “Ethylenediamine tetraacetic acid”, ácido etilenodiamino tetra-acético
- HMDS- Hexametildissilazana
- IAP – proteínas inibidoras de apoptose
- IC<sub>50</sub> - Concentração Inibitória para 50% das células
- INCA- Instituto Nacional do Câncer
- IQ- Instituto de Química
- MEV- Microscopia eletrônica de varredura
- MEM - “Minimum Essential Médium”
- μL - Micro litros
- μM - Micro molar
- MTT- brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)
- pNA- p-nitroanilina
- PBS - Phosphate buffered saline, tampão salina fosfatada
- PI - Propidium Iodide, Iodeto de propídeo
- RDR- Ribonucleotídeo difosfato redutase
- rpm -rotações por minuto
- SMAC- “Second mitochondria-derived activator of caspases”
- TBE - Tris borato EDTA
- TNFR1 – fator de necrose tumoral
- UFG- Universidade Federal de Goiás
- UEM- Universidade Estadual de Maringá
- UV - ultravioleta

## RESUMO

O melanoma é um tipo de câncer que surge nos melanócitos e é notoriamente resistente à radioterapia e quimioterapia. As tiossemicarbazonas são compostos sintéticos com marcantes propriedades biológicas tais como antibacteriana, antiviral, antiprotozoária e antitumoral e em estudos anteriores demonstraram ação citotóxica frente à células de melanoma humano, por isso, neste estudo, foi avaliada a atividade anti-proliferativa, a atividade enzimática das caspases 2, 3, 6, 8, 9, o efeito no ciclo celular, os níveis de expressão gênica das caspases 2, 3, 6, 8, 9, Apaf-1 e as alterações morfológicas por microscopia em células de melanoma humano (SK-MEL-37) de vinte e uma tiossemicarbazonas derivadas do monoterpeneo natural (-)-canfeno: canfeno, benzaldeído, benzofenona, mentona, etil piruvato, acetofenona, p-nitroacetofenona, p-cloroacetofenona, p-metoxiacetofenona, p-metilacetofenona, p-fluoracetofenona, p-hidroxiacetofenona, furano, 3-metóxi-4-hidroxibenzaldeído, p-fluorbenzaldeído, 2-hidroxibenzaldeído, aldeído cinâmico, tiofeno-2-carboxialdeído, 1-H-imidazol-4-carboxialdeído, tiossemicarbazida, bem como seis do monoterpeneo natural R-(+)-limoneno: benzaldeído, tiossemicarbazida, o-nitro, m-nitro, p-nitro, p-dimetilamino e p-hidróxi. Os valores encontrados para a concentração inibitória para 50% das células ( $IC_{50}$ ) situaram-se entre 12  $\mu$ M e 55  $\mu$ M. A porcentagem de células na fase G0/G1 diminuiu e na fase SG2/M aumentou após quarenta e oito horas de incubação com o benzaldeído tio-canfeno, benzaldeído tio-limoneno, m-nitro, p-hidróxi e tiossemicarbazida, indicando que o efeito antiproliferativo observado pode ser devido a uma interrupção das células na fase SG2/M. Observou-se uma maior atividade de caspase 3 (m-nitro tio-limoneno), 6 (benzaldeído tio-canfeno e p-hidróxi tio-limoneno) e 8 (benzaldeído tio-limoneno). Características apoptóticas tardias foram detectados em 62% das células tratadas com benzaldeído tio-canfeno e as alterações morfológicas típicas de processo de apoptose foram visualizadas através da microscopia de fluorescência e de microscopia eletrônica de varredura (MEV) após tratamento com o benzaldeído tio-canfeno escolhido devido ao seu baixo valor de  $IC_{50}$  (12  $\mu$ M). Observou-se a expressão gênica das caspases 2, 3, 6, 8 e o apaf-1 nas células tratadas com benzaldeído tio-canfeno indicando a participação dessas enzimas no efeito antiproliferativo observado. Os resultados indicam que as tiossemicarbazonas derivadas de canfeno e limoneno podem inibir a proliferação celular, regular o ciclo celular e induzir apoptose nas células de melanoma humano (SK-MEL-37), portanto, podem ser considerados candidatos para futuros ensaios pré-clínico *in vivo*.

Palavras-chaves: Tiossemicarbazonas; MTT; Células de melanoma SK-MEL-37; Apoptose.

## ABSTRACT

Melanoma is a type of cancer that arises from melanocytes and is notoriously resistant to radiation and chemotherapy. The thiosemicarbazones are synthetic compounds with marked biological properties such as antibacterial, antiviral, antiprotozoal and antitumor and previous studies have demonstrated cytotoxic activity against the human melanoma cells, so in this study, we evaluated the antiproliferative activity, the enzymatic activity of Caspases 2, 3, 6, 8, 9, the effect on the cell cycle gene expression levels of caspases 2, 3, 6, 8, 9, Apaf-1 and microscopic morphological changes in human melanoma cells (SK -MEL-37) twenty one monoterpene derived from natural thiosemicarbazone (-) - camphene: camphene, benzaldehyde, benzophenone, menthone, ethyl pyruvate, p-nitroacetophenone, p-chloroacetophenone, p-methoxyacetophenone, p-methylacetophenone, p fluoracetofenona-p-hidroxiacetofena, furan, 3-methoxy-4-hydroxybenzaldehyde, p-fluorbenzaldehyde, 2-hydroxybenzaldehyde, cinnamic aldehyde, thiophene-2-carboxaldehyde, 1-H-imidazole-4-carboxaldehyde, thiosemicarbazida and six monoterpene natural R-(+)-limonene: benzaldehyde, thiosemicarbazide, o-nitro, m-nitro, p-nitro, p-hydroxy and p-dimethylamino. The values found for the inhibitory concentration for 50% of cells (IC<sub>50</sub>) were between 12  $\mu$ M and 55  $\mu$ M. The percentage of cells in phase and in phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> decreased S<sub>G2</sub> / M increased after forty-eight hours of incubation with benzaldehyde thio-camphene, limonene thio-benzaldehyde, m-nitro, p-hydroxy and thiosemicarbazide increased indicating that the growth inhibitory effect might be also due to arrest of cells at S-G<sub>2</sub>/M phase. We observed increased activity of caspase 3 (m-nitro thio-limonene), 6 (camphene thio-benzaldehyde and p-hydroxy thio-limonene) and 8 (thio-benzaldehyde limonene). Late apoptotic features were detected in 62% of cells treated with benzaldehyde thio-camphene and morphological changes typical of apoptosis were visualized by fluorescence microscopy and scanning electron microscopy (SEM) after treatment with benzaldehyde thio-camphene chosen due to their low IC<sub>50</sub> value (12 mM). It was observed gene expression of caspases 2, 3, 6, 8 and Apaf-1 in cells treated with benzaldehyde thio-camphene indicating the participation of these enzymes in the anti-proliferative effect observed. Our results indicate that the thiosemicarbazones derivatives can inhibit proliferation, regulate cell cycle, induce apoptosis of human melanoma cells (SK-MEL-37) and could be an candidate for future preclinical *in vivo* studies.

Keywords: Thiosemicarbazones; MTT; melanoma cells SK-MEL-37; Apoptosis.

## SUMÁRIO

<b>1- INTRODUÇÃO</b>	1
1.1- Melanoma	2
1.2- Os testes <i>in vitro</i>	3
1.3- Tiossemicarbazonas	4
1.4- Morte celular	8
<b>2- OBJETIVOS</b>	12
<b>3- MATERIAL E MÉTODOS</b>	13
3.1- Cultura e manutenção da linhagem celular	13
3.2- Tiossemicarbazonas derivadas de canfeno e limoneno	13
3.3- Avaliação do potencial citotóxico de tiossemicarbazonas derivadas de canfeno e limoneno	19
3.4- Avaliação da morte celular por citometria de fluxo	21
3.5- Marcação Anexina V-FITC/PI por citometria de fluxo	21
3.6- Análise por microscopia de fluorescência	22
3.7- Investigação da atividade das caspases 2, 3, 6, 8 e 9	23
3.8- Análise da presença de caspase a partir do marcador de luminescência Nuc View	25
3.9- Análise por RT PCR	25
3.10- Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	27
<b>4- RESULTADOS</b>	28
4.1- Pré-seleção dos compostos	28
4.2- Determinação da concentração inibitória (IC <sub>50</sub> )	38
4.3- Avaliação do ciclo e morte celular por citometria de fluxo	42

4.4- Marcação Anexina V-FITC/PI por citometria de fluxo	44
4.5- Análise por microscopia de fluorescência	44
4.6- Ensaio colorimétrico de atividade das caspases 2, 3, 6, 8 e 9	45
4.7- Análise por RT PCR	50
4.8- Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	52
4.9- Detecção de caspase através da microscopia de fluorescência	53
<b>5. DISCUSSÃO</b>	54
<b>6. CONCLUSÃO</b>	59
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	60
<b>8. ANEXO</b>	72

## 1- INTRODUÇÃO

O melanoma cutâneo pode ser definido como um tumor maligno devido à transformação atípica dos melanócitos (SLOMINSKI et. al., 2004), resulta na proliferação descontrolada de melanoblastos, apresenta etiologia desconhecida, é um dos tumores com pior prognóstico conhecido (DHOMEN et. al., 2009), considerada a forma mais letal de câncer de pele (LINOS et. al., 2009). O melanoma metastático apresenta alta taxa de resistência em relação à quimioterapia, imunoterapia e radioterapia demonstrando pequenos níveis de apoptose espontâneo *in vitro* e *in vivo* quando comparado com outros tipos celulares (SOENGAS & LOWE, 2003). Estudos epidemiológicos de várias partes do mundo tem demonstrado um aumento de sua incidência e mortalidade (KASHANI-SABET et. al., 2009; KRUIJFF & HOEKSTRA, 2012) por isso, os estudos para o desenvolvimento e aplicação de novos compostos que possam exercer uma ação eficaz na indução de apoptose nessas células tem sido cada vez mais necessários (KAMRAN & GUDE, 2012).

A química medicinal e a biologia molecular, através do planejamento e da modificação molecular, têm contribuído para a síntese de substâncias diversas (KALAIVANI et. al., 2012), dentre esses vários compostos, tem-se destacado os derivados das tiossemicarbazonas que, são compostos nitrogenados de considerável interesse científico, devido às inúmeras propriedades biológicas (HAMRE et. al., 1950; KARALI, 2002; WNUK E ROBINS, 2006; KALINOWSKI et. al., 2007; LI et. al., 2013; FLOYD et. al., 2013) e ação eficaz contra diversos microrganismos (HAMRE et. al., 1950; BHARTI et. al., 2002; BERALDO & GAMBINO, 2004; KALAIVANI et. al., 2012; GLISONI et. al., 2013).

De modo geral, pode-se dizer que tiossemicarbazonas agem como inibidores de enzimas, através de reações de complexação com metais importantes na atividade catalítica. Yu Yu (2011) comprovou que a atividade citotóxica do Di-2-piridilcetona-4, 4-dimetil-3 tiossemicarbazona (Dp44mT) se deve à quelação de ferro e conseqüente inibição da ribonucleosídeo difosfato redutase (RDR), enzima responsável pela síntese e reparo do ADN. O mecanismo de ação desta classe de moléculas permanece incerto, no entanto acredita-se que também possam atuar sobre proteases de cisteína, desencadeando o processo apoptótico (GREENBAUM et. al., 2004).

Para testes da ação das tiossemicarbazonas tem-se utilizado testes *in vitro* que apresentam como principais vantagens: o uso de células de origem humana e o baixo custo, para a sua execução quando comparados aos testes *in vivo*. A simplicidade dos testes *in vitro* facilita a interpretação e a dedução dos mecanismos de ação a nível celular e molecular (GRUBER &

HARTUNG, 2004). Estudos demonstram que os testes em culturas celulares podem ser utilizados com sucesso, pois são reprodutíveis, rápidos, sensíveis e financeiramente acessíveis para a execução dos estudos (ROGERO, 2000; STAUB et. al., 2007; SALVARANI et. al., 2010).

A presença de diferentes substituintes permite uma avaliação mais ampla da atividade biológica das tiossemicarbazonas (BERALDO et. al., 1997) e diversos estudos em tiossemicarbazonas substituídas têm demonstrado que sua atividade é afetada significativamente pelo tipo de substituinte e sua posição (LI et. al., 2010; HEFFETER et. al., 2012.). Assim, o grupo de Química Orgânica Sintética do Instituto de Química (IQ) da Universidade Federal de Goiás (UFG), em cooperação com pesquisadores do Departamento de Química (DQ) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), sintetizaram uma série de tiossemicarbazonas derivadas do monoterpeneo natural (-) –canfeno e do R-(+)-limoneno, com o intuito de verificar a eficácia de diferentes radicais ligados à tiossemicarbazona para a indução de apoptose em melanoma humano.

## **1.1- Melanoma**

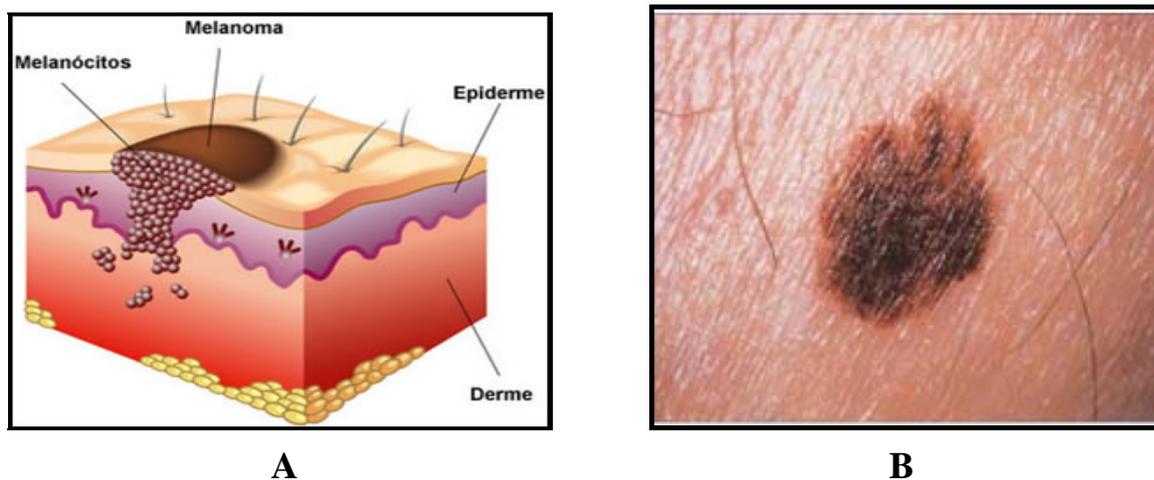
Os melanócitos são células pigmentadas responsáveis pela síntese de melanina, um polímero pigmentar de fotoproteção. Os melanócitos estão localizados na camada basal da epiderme (FERREIRA & ROCHA 2004), são de origem neuroectodérmica e compreendem cerca de 10% de todas as células epidérmicas agindo contra danos causados por excessiva exposição à radiação ultravioleta (UVR) além de serem responsáveis pela pigmentação da pele, olhos e cabelos (LIN & FISHER 2007).

Melanoma cutâneo é um câncer que surge a partir dos melanócitos (GRAY-SCHOPFER et al., 2007) e pode ser definido como um tumor maligno devido à transformação atípica dos melanócitos (SLOMINSKI et. al., 2004; LINOS et. al., 2009). Essa transformação pode ser iniciada pela perda de contato entre os melanócitos e os queratinócitos (LI & HERLYN, 2000) e se mantém pela proliferação dessas células atípicas malignas que se tornam mais resistente à morte celular (CHAMMAS et al., 2003).

A primeira descrição do melanoma maligno apareceu nas escritas de Hipócrates por volta de 460 à 375 a.C. (MORTON, 2000) e embora represente apenas 4% dos tipos de câncer de pele, o melanoma é considerado o mais grave (KRUIJFF & HOEKSTRA, 2012), devido à possibilidade de formação de metástases que tendem a invadir gânglios linfáticos, a pele vizinha à lesão primária e as veias e capilares próximos invadindo a corrente sanguínea e se

espalhando para outras partes do corpo (RABELO & FRAGA, 1970; CANCERTOPIC, 2012), é um tumor com alta malignidade, é a principal causa de morte em pacientes com câncer de pele, cuja incidência tem aumentado, resultando em um sério problema de saúde pública (MOHR et. al., 2009).

Na fase inicial, o melanoma está restrito à camada mais superficial da pele correspondendo, nesse caso, ao melanoma "in situ" (Figura 1), pois ainda não houve disseminação de células tumorais à distância (metástase). Quando o melanoma deixa de ser plano, formando lesão elevada na pele, é sinal de que também está progredindo em profundidade, sendo caracterizado por um crescimento vertical. Esta fase está associada à invasão dos vasos sanguíneos e linfáticos da pele e, conseqüentemente, formação de metástases (OTAKE, 2005). De acordo com as estimativas para 2012/2013, realizadas pelo INCA (Instituto Nacional do Câncer), a incidência do câncer de pele do tipo melanoma é de 6230 casos novos em homens e mulheres (INCA, 2013).



**Figura 1-** Representação esquemática do melanoma. (A) Esquema da organização tecidual do melanoma *in situ*. (B) Lesão presente na pele de um indivíduo atingido pelo melanoma *in situ*.

(A) <http://medfoco.com.br/fotos-de-melanoma-cancer-de-pele> em 07 de Abril de 2013.

(B) (Modificado de <http://www.cosmetic-lasersurg.com/main/medical-dermatology/skin-cancer> em: 07 de Abril de 2013.

## 1.2- Os testes *in vitro*

A proliferação descontrolada das células neoplásicas *in vivo* pode ser estudada através de sistemas *in vitro* de cultura de células. Uma distinção primária entre células neoplásicas e células normais em cultura, está relacionada com a capacidade das células normais em apresentar inibição do tipo densidade-dependente da proliferação celular. As células normais

proliferam até alcançar uma densidade de células finita, o que é em parte determinado pela disponibilidade de fatores de crescimento acrescentados ao meio de cultura (normalmente na forma de soro). Uma vez alcançada essa densidade finita, a proliferação cessa permanecendo a célula na fase G0 do ciclo celular, porém, a proliferação da maioria das células neoplásicas não é sensível à inibição densidade-dependente, as quais continuam crescendo a elevadas densidades em cultura, com reduzida exigência para fatores de crescimento (COOPER, 2000).

Com o controle do uso de animais de laboratório em pesquisas, há a necessidade de desenvolver e padronizar testes *in vitro* que possam detectar a toxicidade de compostos para o uso em seres humanos, principalmente aqueles com futuras aplicações clínicas (STAUB et. al., 2007; SALVARANI et. al., 2010).

Para a medição da viabilidade e de proliferação celular, um dos ensaios *in vitro* mais utilizados, tem sido o ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo), que consiste na redução do sal tetrazólio (MTT) pela atividade metabólica celular. Dessa forma, os eventos metabólicos de apoptose ou necrose que levam à uma diminuição na viabilidade da cultura celular podem ser quantificados por espectrofotometria (BERNHARD, 2003). Este método é um ensaio versátil e com boa reprodutibilidade, particularmente em células aderentes (MOSSMAN, 1983; CARMICHAEL, 1987), representando assim, uma alternativa ao uso indiscriminado de animais por indústrias farmacêuticas na busca por novos compostos com atividade antitumoral.

### **1.3- Tiossemicarbazonas**

Paul Ehrlich foi o primeiro a introduzir idéias sobre as relações estrutura-atividade, no início do século XX, quando desenvolveu compostos de arsênio para o tratamento de sífilis (ORVIG & ABRAMS, 1999). Em 1965, o físico Barnett Rosemberg descobriu a atividade antitumoral do cis (diaminodicloro)platina(II), o “cisplatina” ou cis-ddp (BASOLO, 1993). A cisplatina juntamente com o seu derivado de segunda geração *cis*-diaminociclobutano-1,1-dicarboxilato (carboplatina), constitui alguns dos principais compostos utilizados no tratamento de tumores (STORR et. al., 2006).

Entre estes vários compostos, os derivados de tiossemicarbazonas (DT) tem despertado especial interesse na investigação científica devido a suas propriedades químicas, biológicas e farmacológicas (PUNTEL et. al., 2009). De forma geral, agem como inibidores de enzimas, através da complexação de metais endógenos ou através de reações redox, seja através de interações com o DNA ou da inibição de síntese do DNA. Alguns derivados das

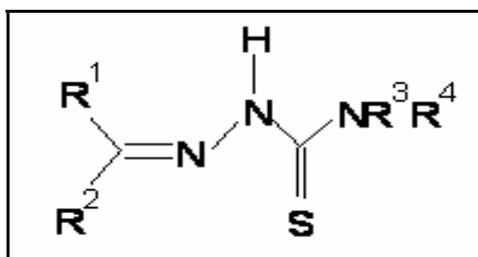
tiossemicarbazonas reagem com elementos metálicos pela ligação do átomo de enxofre e do nitrogênio azometina, formando quelatos, alguns apresentam capacidade de formar complexos com cátions metálicos (BHARTI et. al., 2003). Tais características relacionam-se com suas ações farmacológicas e suas atividades biológicas tais como atividade antiviral (TEITZ et. al., 1994; WNUK & ROBINS, 2006), antitumoral (FEUN et. al., 2002; AFRASIABI et. al., 2004; WHITNALL et. al., 2006; KALINOWSKI et. al., 2007; LI et. al., 2013; FLOYD et. al., 2013) e citotóxica (KARALI, 2002) além de apresentar ação eficaz contra bactérias, como *Staphylococcus aureus* (GLISONI et. al., 2013), *Enterococcus*, *Bacilo de Hansen* (HAMRE et. al., 1950), *Escherichia coli*, *Krebisiella pneumoniae* (KALAIVANI et. al., 2012) e *Pseudomonas aeruginosa* (GLISONI et. al., 2013) fungos como *Candida albicans*, *Sacaromices cerevisiae* (KASUGA et. al., 2003; BERALDO & GAMBINO, 2004), *Aspergillus fumigatus* (ALOMAR et. al., 2010) e protozoários como *Plasmodium falciparum* (WALCOURT et. al., 2004), *Tripanosoma cruzi* (BHARTI et. al., 2002; LESSA et. al., 2011; DEMORO et. al., 2013), *Trichomonas vaginalis* e outros parasitas (BHARTI et. al., 2002).

A atividade antitumoral de tiossemicarbazonas está relacionada principalmente à sua capacidade de inibir a ribonucleosídeo difosfato redutase (RDR), enzima que catalisa a redução de ribonucleotídeos a desoxirribonucleotídeos, etapa crucial para a replicação e reparo do ácido desoxirribonucléico (ADN) (YU et. al., 2009). Alterações na atividade da RDR podem modificar a velocidade de mutação espontânea das células (GILES, 2007; ODENIKE et. al., 2008), sua inativação interrompe a síntese do ADN e promove a consequente inibição da proliferação celular. Assim, a enzima é considerada um alvo estratégico para a terapia do câncer (SHAO et. al., 2006).

Sartorelli et al. (1977) demonstraram que o 1-formilisoquinolina tiossemicarbazona inibe o suprimento de desoxirribonucleotídeos e a replicação do DNA em células de Sarcoma 180 *in vitro* através da inibição do sítio ativo da RDR. Os compostos 3-aminopiridina-2-carboxialdeído-tiossemicarbazona (Triapina ou 3-AP) e 3-aminopiridina-4-metil-2-carboxialdeído tiossemicarbazona (3-AMP) demonstraram grande potencial na inibição da RDR em células de leucemia L-1210 (LIU et. al., 1992), porém, em estudos clínicos de fase II, a Triapina se mostrou ineficaz no combate de tumores sólidos como o adenocarcinoma avançado de pâncreas (ATTIA et. al., 2008), tumores de pulmão (MA et. al., 2008) e carcinomas renais (KNOX et. al., 2007). A utilização de 3-AP em humanos tem demonstrado alguns efeitos, tais como: mielo-supressão e hipoxia metamoglobinizante, estes efeitos secundários estão relacionados com a habilidade das tiossemicarbazonas em quelar o ferro, formando os complexos de ferro redox-ativas (YU et. al., 2012).

Yuan et al. (2004) comprovaram atividade antitumoral de tiossemicarbazonas em fibroblastos humanos (MCR-5), células de neuroepitelioma (SK-N-MC), melanoma humano (SK-Mel-28) e células de câncer de mama (MCF-7). Outras tiossemicarbazonas com atividade antitumoral tem emergido, dentre elas incluem-se: Dp44mt, benzoilpiridina-4,4-dimetil-3-tiossemicarbazona (Bp44mT) e n-acetil-carnosina (NSC 00) (YU et. al., 2012).

As tiossemicarbazonas são compostos obtidos pela reação de condensação quimiosseletiva de tiossemicarbazidas com aldeídos e/ou cetonas, em meio alcoólico sob refluxo e quantidades catalíticas de ácido (MENDES et. al., 2001) e recebem a denominação da classe tiossemicarbazona após o nome do respectivo aldeído ou cetona condensado, (HANG & BERTOZZI, 2001). A estrutura química das tiossemicarbazonas (BERALDO, 2004) e a numeração dos seus átomos segundo a IUPAC é mostrada na figura 2.



**Figura 2:** Estrutura química de Tiossemicarbazonas (Fonte: Tenório e Góes, 2005)

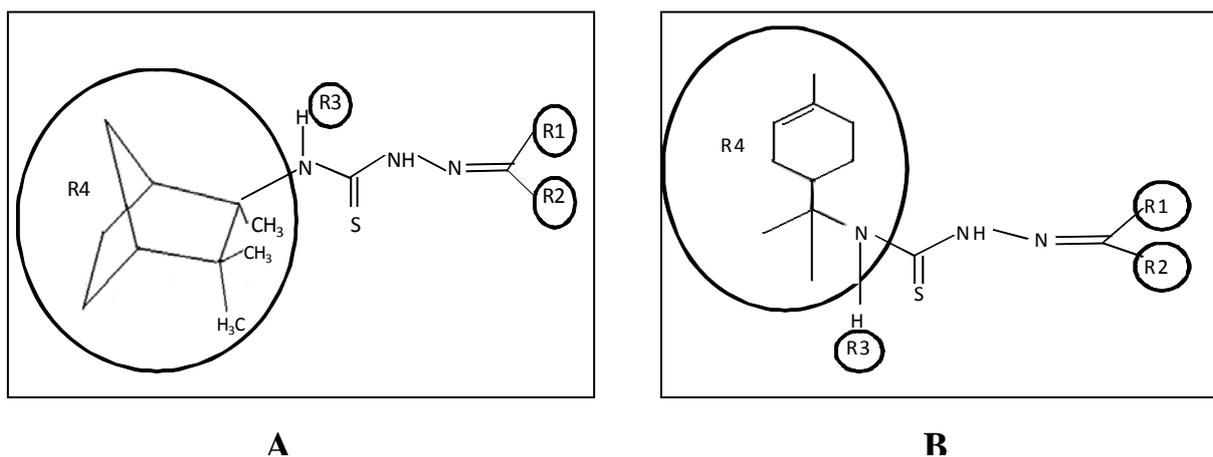
Em Química Medicinal, o termo “relação estrutura-atividade” compreende o estudo dos efeitos que a estrutura química de um composto pode causar durante sua interação com o receptor biológico (ARROIO et. al., 2010) assim, em muitos casos, a presença de diferentes substituintes faz aumentar a atividade biológica das tiossemicarbazonas (BERALDO et. al., 1997). Li et al. (2010) realizaram a síntese de diversas tiossemicarbazonas complexadas aos metais manganês, cobalto e zinco para estudos de atividade antitumoral contra células de leucemia K562 enquanto, Kalaivani et al. (2012) sintetizaram uma série de tiossemicarbazonas complexadas ao paládio para estudos de atividade antibacteriana.

Tiossemicarbazonas complexadas ao manganês, cobalto e zinco apresentaram efeitos antiproliferativos em células leucêmicas (K562) (Li et. al., 2010) enquanto, Li et al. (2008) comprovaram que tiossemicarbazonas complexadas ao zinco são citotóxicos em células de câncer de pulmão (A549). Heffeter et al. (2012) comprovaram que a dimetilação de tiossemicarbazonas heterocíclicas podem potencializar seus efeitos citotóxicos abrindo um novo caminho para os estudos da relação estrutura atividade das tiossemicarbazonas.

O desenvolvimento de novas drogas com atividade antimetastática representa ainda um grande desafio, principalmente com relação ao melanoma onde as taxas de mortalidade continuam altas (KAMRAN & GUDE, 2012). A síntese de novas moléculas derivadas de tiossemicarbazonas e produtos naturais emergem como uma estratégia promissora no desenvolvimento de novos compostos com atividade antitumoral (LI et. al., 2010). Dentre esses produtos naturais encontram-se uma classe de substâncias conhecida como terpenos e são os principais constituintes dos óleos essenciais. Eles são constituídos por unidades básicas de isopreno (contendo cinco carbonos cada), que formam diferentes classes terpenóides, sendo classificadas como: monoterpenos (classe de terpenos com 10 unidades de carbono - C10), sesquiterpenos (classe de terpenos com 15 unidades de carbono - C15), diterpenos (classe de terpenos com 20 unidades de carbono – C20), entre outras (GUSEVSKAYA et.al., 2000).

Canfeno e limoneno são monoterpenos de origem natural, abundantes, de baixo custo e renováveis, presentes em plantas das regiões tropicais do Brasil. O canfeno compõe os óleos essenciais da cânfora, bergamota, terebentina, gengibre e outras plantas e o limoneno está presente nas essências de frutas cítricas, como limão e laranja (BARROS et. al., 2004).

Alguns derivados de canfeno apresentaram atividade citotóxica frente a células de melanoma humano (SOARES, 2008) assim, o grupo de Química Orgânica Sintética do IQ/UFG, em colaboração com pesquisadores do DQ/UEM sintetizaram uma série de tiossemicarbazonas derivadas do monoterpeno natural (-)- canfeno e do R-(+)-limoneno (Figura 3A e 4B). Os compostos são inéditos e apresentam substituição na posição R4 dos monoterpenos naturais (-) Canfeno e (+) Limoneno e diversos grupos substituintes nos radicais R1 e R2 e podem se tornar futuros fármacos com promissora atividade antitumoral. Neste estudo, foi avaliada a atividade biológica desses compostos frente às células de melanoma SK-MEL-37.



**Figura 3:** Fórmula estrutural da tiossemicarbazonas sintetizadas para este estudo. (A) estrutura indicando a adição em  $R_4$  do monotерpeno canfeno; (B) estrutura indicando a adição em  $R_4$  do monotерpeno limoneno.

Ensaio *in vitro* de inibição da atividade proliferativa foram realizados para elucidação do possível mecanismo de ação das tiossemicarbazonas derivadas do canfeno e do limoneno.

#### 1.4- Morte celular

Múltiplos sinais modulam a proliferação celular, sobrevivência e morte celular e essa ação coordenada permite que a célula normal cresça e se divida até sua senescência (FOSTER, 2008; MESTER & REDEUILH, 2008). Entretanto, as células tumorais perdem a capacidade de regular esses sinais, resultando no descontrole de proliferação e ausência de morte celular, contribuindo para o desenvolvimento dos tumores. De modo geral, estímulos tóxicos ou deletérios para a célula podem desencadear a morte celular por necrose ou apoptose, as quais são diferenciadas pela morfologia e vias bioquímicas celulares (BAYLY et al., 1997; FOSTER, 2008).

Uma célula é considerada morta quando está inserida em um dos seguintes critérios moleculares ou morfológicos: (a) a célula perdeu a integridade de sua membrana plasmática; (b) a célula, incluindo seu núcleo, sofreu completa fragmentação em corpos discretos, geralmente chamados de corpos apoptóticos; (c) ou seus fragmentos foram incorporados por uma célula adjacente. De acordo com critérios morfológicos, a morte celular pode ser dividida em algumas modalidades, mas, as duas principais são: apoptose e necrose (KROEMER et. al., 2007). A necrose ou apoptose é determinada ao menos em parte pela abundância de estoques de energia intracelular. Enquanto a apoptose requer uma quantidade mínima de ATP

intracelular, a necrose é geralmente acompanhada de uma necessidade maior de ATP (NICOTERA, 1998).

A morte celular por necrose, também chamada de morte celular patológica ou acidental, ocorre quando as células são expostas a uma variação extrema de suas condições fisiológicas normais, tais como hipertemia, hipoxia, isquemia, metabólitos tóxicos e irradiação. Estas condições fisiológicas culminam com a perda abrupta da integridade da membrana plasmática (citólise) e alteração de seus gradientes eletroquímicos, assim, a liberação de seus constituintes celulares para o meio extracelular estimula a resposta inflamatória e ampliam a lesão tecidual (EDINGER & THOMPSON, 2004). Este processo de morte celular utiliza uma energia independente em um processo desordenado caracterizado pela liberação e espalhamento do conteúdo celular nas células vizinhas, causando inflamação (MILAN & HUERTA, 2009). As células em processo de necrose apresentam como principais características morfológicas: inchaço citoplasmático, ruptura da membrana citoplasmática, inchaço de organelas citoplasmáticas e moderada condensação da cromatina (KROEMER et. al., 2007).

A apoptose é um termo que foi introduzido em 1972 e representa uma forma de morte celular que tem como principais papéis a eliminação de células infectadas, danificadas ou não desejadas pelo organismo (KERR et. al., 1972). A morte celular por apoptose é regulada endogenamente por mecanismos orientados e apresenta uma morfologia característica que inclui o encolhimento da célula, dano às organelas, marginalização da cromatina, fragmentação nuclear (KROEMER et. al., 2009), aparecimento de vacúolos e alteração na membrana plasmática com eventual ruptura das células em corpos apoptóticos (CRUCHTEN & BROECK, 2002; KROEMER et. al., 2009). Essas características são acompanhadas por uma série de eventos bioquímicos (EARNSHAW et. al., 1999) e todas essas modificações ocorrem devido a ativação de uma cascata de proteases chamadas caspases, culminando na morte celular (GHOBRIAL, 2005; GRIVICICH et al., 2007).

Há duas vias principais de regulação da apoptose: 1) Apoptose mediada por receptores de morte (TNF, TNFR1, TRAMP, TRAIL e de Fas) presentes na membrana plasmática, denominada via extrínseca e 2) Apoptose mediada pela mitocôndria denominada via intrínseca (HAJRA & LIU, 2004; HAIL et al., 2006). Tanto a via extrínseca quanto a intrínseca possuem um grupo independente de caspases iniciadoras que convergem sinais para o mesmo grupo de caspases efetoras com finalidade de executar eventos intracelulares que resultarão na morte celular programada (ZHANG et al., 2004).

As caspases são uma família de cisteínas proteases que desempenham um papel crítico na fase de execução da apoptose e são responsáveis por muitas das propriedades bioquímicas e

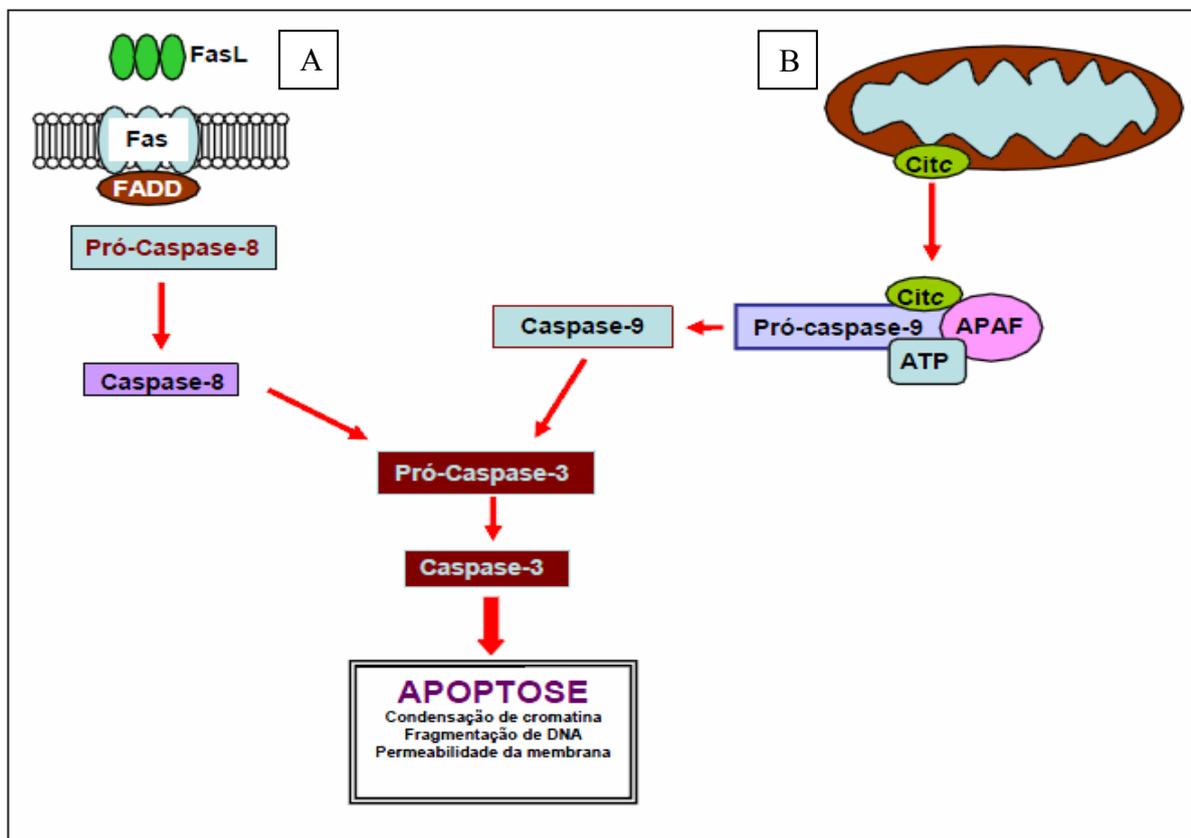
das alterações morfológicas associadas com a apoptose. As caspases se diferem nas funções, na estrutura quaternária, nos fatores para sua ativação e na abundância de cada uma nas células (KAUFMANN et. al., 2008), compartilham similaridades na sequência de aminoácidos, na estrutura e na especificidade do substrato e são nomeadas de acordo com sua ordem cronológica de descoberta (JORDÁN et.al., 2000). As caspases apresentam formas variáveis de agrupamento (EARNSHAW et. al., 1999), um desses agrupamentos divide as caspases em três grupos: a) caspases envolvidas na produção de citocinas (1, 4, 5 e 13), b) caspases envolvidas na ativação de outras caspases (2, 8, 9 e 10) e c) caspases efetoras de morte ou executoras (3, 6 e 7) que hidrolizam substratos seletivos.

Na via intrínseca, diversos sinais atuam modulando a permeabilização da membrana mitocondrial externa. O caminho mitocondrial pode ser ativado por vários estímulos incluindo hipoxia, espécies reativas de oxigênio, irradiação ultravioleta ou gama, deprivação de fatores de crescimento e vários compostos citotóxicos, resultando na ativação de proteínas pró-apoptóticas (KROEMER et. al., 2007). Estas proteínas oligomerizam e induzem a permeabilização da membrana externa mitocondrial através da formação de canais que causam a liberação e redistribuição de pequenos íons, solutos, metabólitos, citocromo c e da proteína 14-kDa carreadora de elétrons da cadeia respiratória para o citosol (BELIZÁRIO et al., 2007). O citocromo c liberado no citosol é necessário como co-fator e rapidamente se associa com a região C-terminal a uma proteína adaptadora (Apaf-1), esta interação facilita a ligação ao dATP e pró-caspase 9 formando um complexo chamado de apoptossomo, e através da clivagem proteolítica a caspase 9 se torna ativa e subsequentemente ativa outras caspases (GREEN & KROMER, 1998; KAVURMA et al., 2008; HENRIQUES-PONS & OLIVEIRA, 2009) (Figura 4). O complexo catalítico gerado pelos sinais mitocondriais e a ação das caspases ativadas de via extrínseca são sinais convergentes responsáveis pela ativação das caspases efetoras 3 e 7. (HAIL et al., 2006).

Outro fator mitocondrial pró-apoptótico é o Smac/DIABLO que atua inibindo as IAPs (proteínas inibidoras de apoptose) de bloquear a atividade das caspases. As IAPs pertencem uma família de proteínas com atividade anti-apoptótica que atuam inibindo as caspases. Após dano mitocondrial, a Smac/DIABLO é liberada do espaço intermembrana para o citoplasma, juntamente com o citocromo c. Enquanto o citocromo c liga-se à Apaf-1 e ativa diretamente a caspase-9, o Smac/DIABLO remove as IAP de sua ligação inibitória com as caspases (GRIVICICH et al., 2007).

O processo extrínseco inicia-se na membrana plasmática com a formação do complexo DISC (do inglês do inglês *death-inducing signaling complex*) que consiste na associação dos

receptores de morte presentes na membrana (Fas, FasL, FADD) . O DISC se liga à pró-caspase 8 e seguidamente a esse recrutamento, promove sua ativação que gera uma ativação proteolítica das caspases executoras (3, 6 e 7), originando a degradação de proteínas envolvidas na estrutura e sobrevivência celular (KAVURMA et al., 2008), culminando em fragmentação do DNA (WALCZAK & KRAMMER, 2000) e consequente processo de apoptose (figura 4).



**Figura 4** – Vias apoptóticas. A: Via extrínseca de indução da apoptose. Esta via utiliza os receptores de morte presentes na superfície celular. B: Via intrínseca de indução da apoptose. A liberação de citocromo c permite a formação do apoptossomo na ligação com o Apaf-1 e a caspase-9 (Adaptado de DORTA, 2007).

Acredita-se que defeitos no processo de apoptose podem contribuir para doenças como o câncer assim, o interesse no controle da apoptose cresceu entre os pesquisadores de câncer (DEVARAJAN et al., 2002; MOUSTAID & KRZESLAK, 2013). As células tumorais adquiriram diversas maneiras de escaparem do processo de apoptose, quer por desregulação de mecanismos intracelulares ou por uma resposta imunológica ineficiente. O mais importante é a evidência de que mudando uma dessas condições, a morte celular por apoptose possa ser restabelecida (ZASLAU et al., 2004; RIGGS et al., 2005; BRAULT et al., 2005). Portanto, a busca por novos quimioterápicos que exerçam sua atividade antitumoral através do mecanismo de apoptose celular tem sido continuamente estimulada.

## 2- OBJETIVOS

### Geral

- Verificar a ação biológica *in vitro* (atividade citotóxica e antiproliferativa) de tiossemicarbazonas derivadas de canfeno e limoneno em células de melanoma humano (SK-MEL-37).

### Específicos:

- 1) Avaliar a viabilidade celular através do ensaio de MTT (brometo de 3-(4, 5 dimetiliazol-2-il)-2, 5- difeniltetrazólio) de vinte e sete tiossemicarbazonas derivadas de canfeno e limoneno;
- 2) Elucidar e quantificar os processos de necrose e apoptose através da quantificação por citometria de fluxo.
- 3) Analisar por microscopia de fluorescência e microscopia eletrônica de varredura as mudanças morfológicas das células tratadas com benzaldeído tio-canfeno;
- 4) Identificar as caspases envolvidas no processo apoptótico de células tratadas através de ensaio colorimétrico e da expressão de transcritos das proteases humanas: caspase2, caspase3, caspase6, caspase8, caspase9 e Apaf-1 por RT PCR;

### **3- MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1- Cultura e manutenção da linhagem celular**

As células de melanoma humano metastático da linhagem SK-MEL-37 empregadas neste estudo foram obtidas por doação pelo Dr. Loyd J. Old do Instituto de Câncer Memorial Sloan-Kettering, New York, USA. As células estocadas em nitrogênio líquido foram descongeladas em frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup> (Nunc Brand Products, USA) contendo meio de cultura MEM (Cultilab, Campinas, Brasil), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil) e 100 U/mL de penicilina-estreptomicina (Gibco BRL, Argentina) e 0,25 µg/mL de Fungizona (Gibco BRL, Argentina) e mantidas em incubadora úmida com condições de 5% de CO<sub>2</sub> e 37 °C. Após a confluência as células eram repicadas utilizando solução de tripsina (0,25%) -EDTA (1 mM) (Cultilab, Campinas, Brasil).

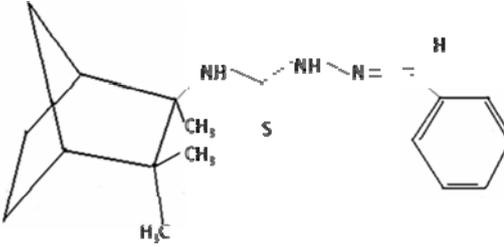
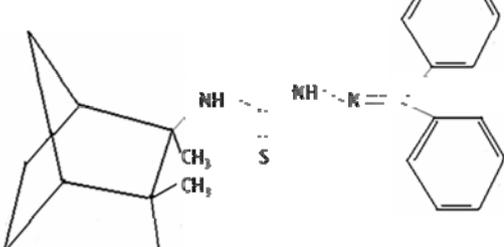
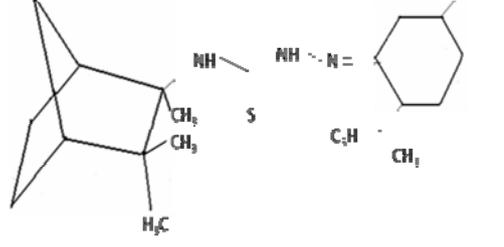
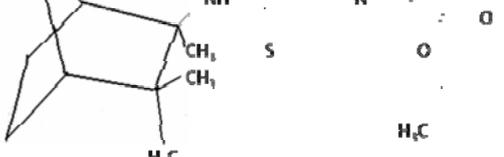
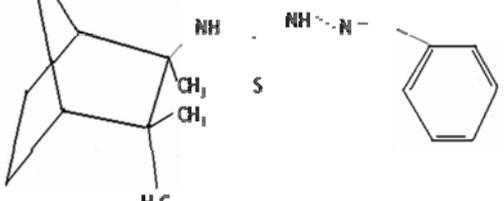
#### **3.2- Tiossemicarbazonas derivadas de canfeno e limoneno**

A síntese dos compostos de tiossemicarbazonas derivadas de canfeno e limoneno (DT), utilizados neste estudo, foi realizada pelo grupo de Química Orgânica Sintética do IQ/UFG, em colaboração com pesquisadores do DQ/UEM, como descrito por Silva et al., 2005.

Todos os compostos foram inicialmente solubilizados em DMSO/etanol absoluto (10%/90%) para a obtenção da concentração estoque de 20 mM. A partir dessa solução, foi preparada uma série de concentrações através de diluições seriadas (1:1) da solução-estoque em etanol absoluto. As novas diluições obtidas (100x) foram utilizadas nos experimentos de viabilidade celular (MTT), adicionando-se diretamente ao meio de cultura para obter a concentração final desejada.

A fórmula e o peso molecular dos derivados das tiossemicarbazonas utilizadas neste estudo são apresentadas no quadro 1.

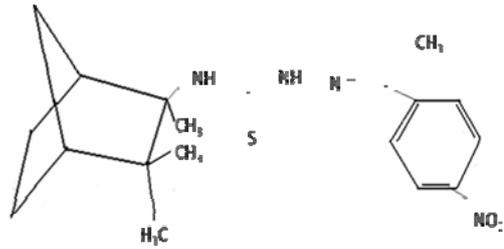
**Quadro 1:** Peso molecular, fórmula química e estrutural dos compostos derivados de tiossemicarbazonas.

<p><b>Nome:</b> Benzaldeído tiossemicarbazona derivado do canfeno (Benzaldeído tio-canfeno)</p> <p><b>Fórmula Molecular:</b> C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>S</p> <p><b>Massa Molar (g/mol):</b> 315,477</p>	
<p><b>Nome:</b> Benzofenona tiossemicarbazona derivado do canfeno (Benzofenona tio-canfeno)</p> <p><b>Fórmula Molecular:</b> C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>S</p> <p><b>Massa Molar (g/mol):</b> 391,57</p>	
<p><b>Nome:</b> Mentona tiossemicarbazona derivado do canfeno (Mentona tio-canfeno)</p> <p><b>Fórmula Molecular:</b> C<sub>21</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>S</p> <p><b>Massa Molar (g/mol):</b> 363,60</p>	
<p><b>Nome:</b> Etil piruvato tiossemicarbazona derivado do canfeno (Etil piruvato tio-canfeno)</p> <p><b>Fórmula Molecular:</b> C<sub>16</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S</p> <p><b>Massa Molar (g/mol):</b> 325,47</p>	
<p><b>Nome:</b> Acetofenona tiossemicarbazona derivado do canfeno (Acetofenona tio-canfeno)</p> <p><b>Fórmula Molecular:</b> C<sub>19</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>S</p> <p><b>Massa Molar (g/mol):</b> 329,50</p>	

**Nome:** *p*-nitroacetofenona tiossemicarbazona derivado do canfeno (*p*-nitroacetofenona tio-canfeno)

**Fórmula Molecular:** C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S

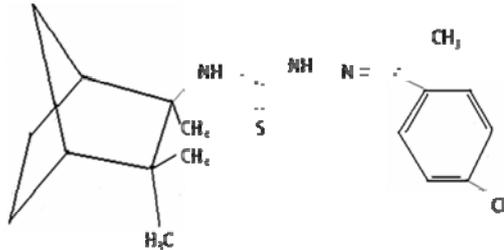
**Massa Molar (g/mol):** 374,50



**Nome:** *p*-cloroacetofenona tiossemicarbazona derivado do canfeno (*p*-cloroacetofenona tio-canfeno)

**Fórmula Molecular:** C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>3</sub>S

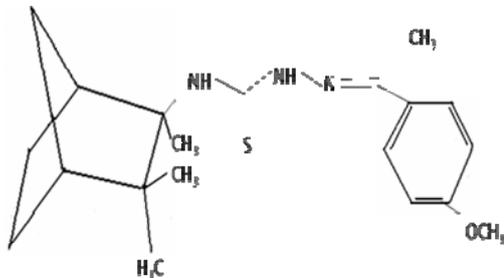
**Massa Molar (g/mol):** 363,94



**Nome:** *p*-metoxiacetofenona tiossemicarbazona derivado do canfeno (*p*-metoxiacetofenona tio-canfeno)

**Fórmula Molecular:** C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>OS

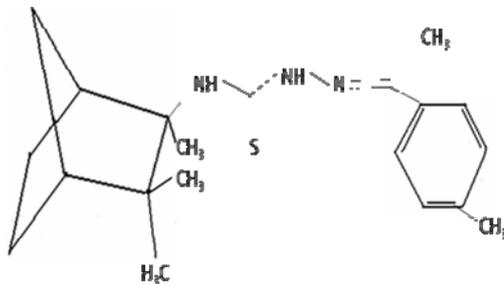
**Massa Molar (g/mol):** 359,53



**Nome:** *p*-metilacetofenona tiossemicarbazona derivado do canfeno (*p*-metilacetofenona tio-canfeno)

**Fórmula Molecular:** C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>S

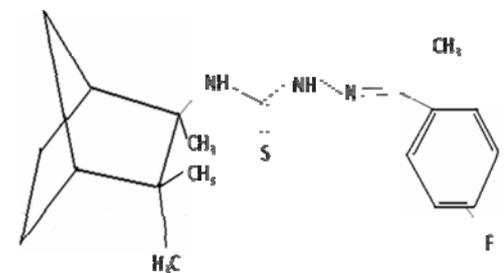
**Massa Molar (g/mol):** 343,53



**Nome:** *p*-fluoracetofenona tiossemicarbazona derivado do canfeno (*p*-fluoracetofenona tio-canfeno)

**Fórmula Molecular:** C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>FN<sub>3</sub>S

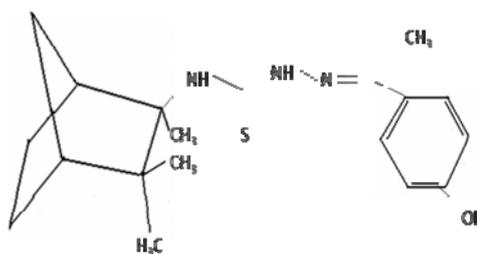
**Massa Molar (g/mol):** 347,50



**Nome:** *p*-hidroxiacetofenona tiossemicarbazona derivado do canfeno (*p*-hidroxiacetofenona tio-canfeno)

**Fórmula Molecular:** C<sub>19</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>OS

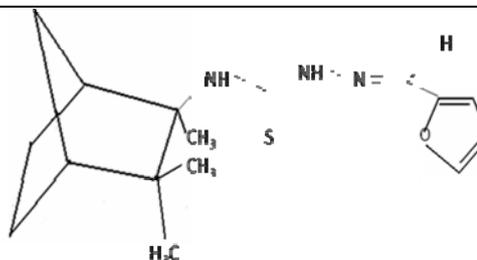
**Massa Molar (g/mol):** 345,50



**Nome:** Furano tiossemicarbazona derivado do canfeno (Furano tio-canfeno)

**Fórmula Molecular:** C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>OS

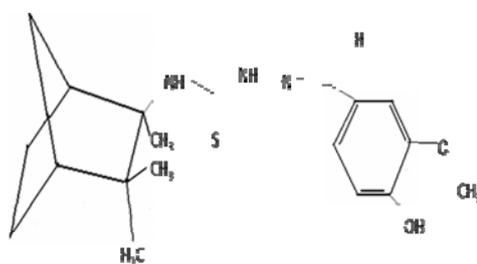
**Massa Molar (g/mol):** 305,43



**Nome:** 3-metoxi-4-hidroxibenzaldeído tiossemicarbazona derivado do canfeno (3metóxi-4-hidroxibenzaldeído tio-canfeno)

**Fórmula Molecular:** C<sub>19</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S

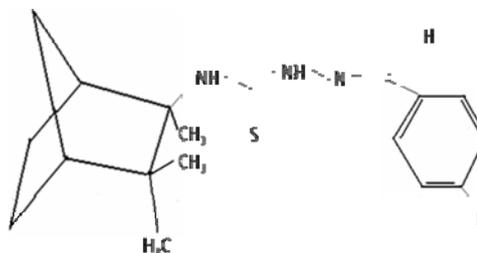
**Massa Molar (g/mol):** 361,50



**Nome:** *p*-fluorbenzaldeído tiossemicarbazona derivado do canfeno (*p*-fluorbenzaldeído tio-canfeno)

**Fórmula Molecular:** C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>FN<sub>3</sub>S

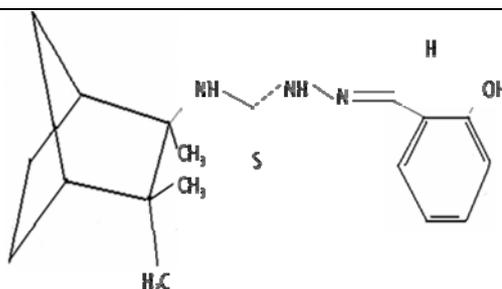
**Massa Molar (g/mol):** 333,47



**Nome:** 2-hidroxibenzaldeído tiossemicarbazona derivado do canfeno (2-hidroxibenzaldeído tio-canfeno)

**Fórmula Molecular:** C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>OS

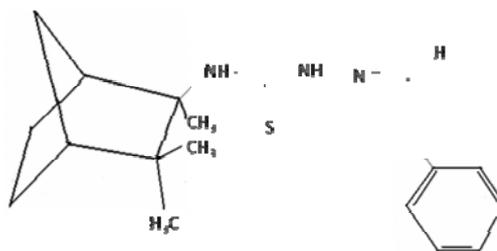
**Massa Molar (g/mol):** 331,47



**Nome:** Aldeído cinâmico tiossemicarbazona derivado do canfeno (Aldeído cinâmico tio-canfeno)

**Fórmula Molecular:** C<sub>20</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>S

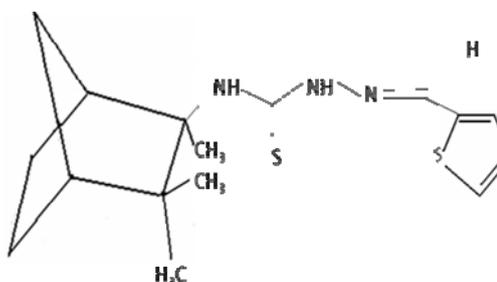
**Massa Molar (g/mol):** 341,51



**Nome:** Tiofeno-2-carboxialdeído tiossemicarbazona derivado do canfeno (Tiofeno-2-carboxialdeído tio-canfeno)

**Fórmula Molecular:** C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>S<sub>2</sub>

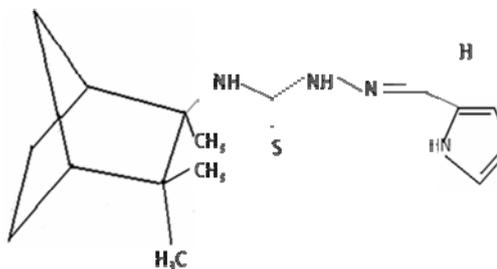
**Massa Molar (g/mol):** 321,50



**Nome:** 1-H-pirrol-2-carboxialdeído tiossemicarbazona derivado do canfeno (1-H-pirrol-2-carboxialdeído tio-canfeno)

**Fórmula Molecular:** C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>S

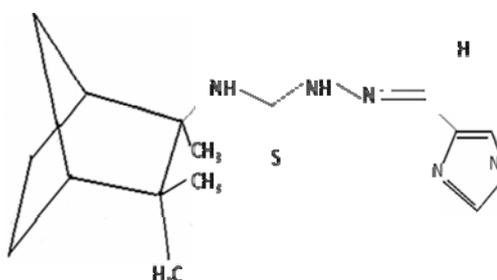
**Massa Molar (g/mol):** 304,45



**Nome:** 1-H-imidazol-4-carboxialdeído tiossemicarbazona derivado do canfeno (1-H-imidazol-4-carboxialdeído tio-canfeno)

**Fórmula Molecular:** C<sub>15</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>S

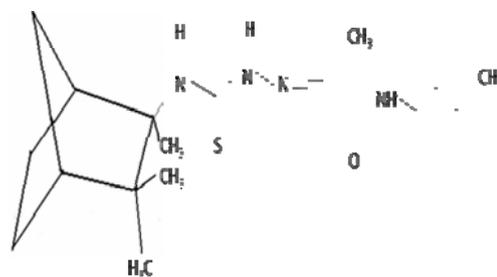
**Massa Molar (g/mol):** 305,44

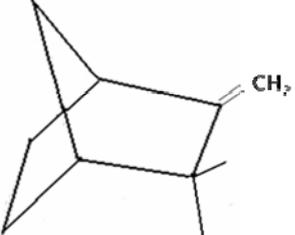
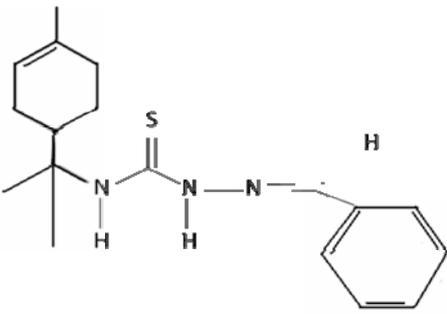
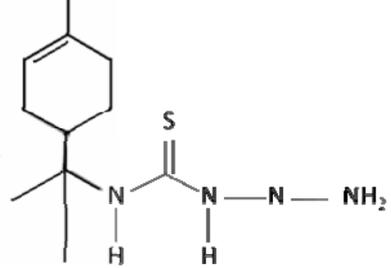
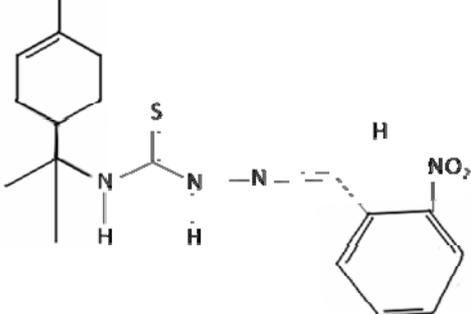
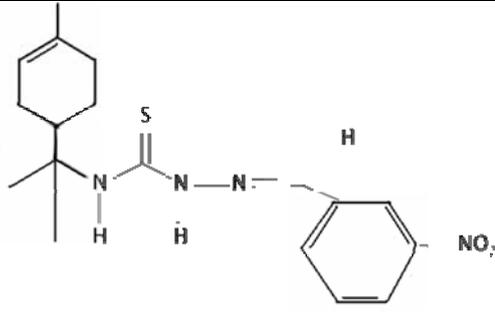


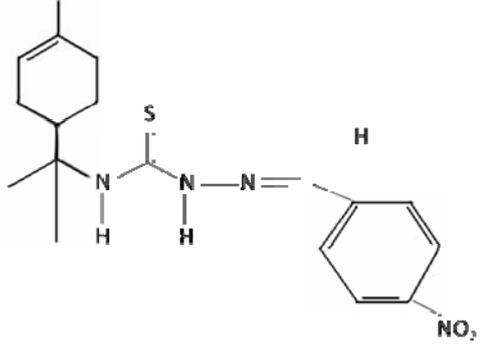
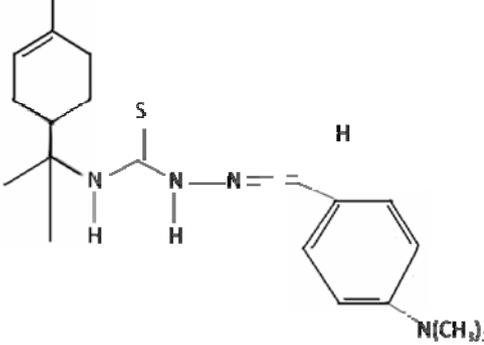
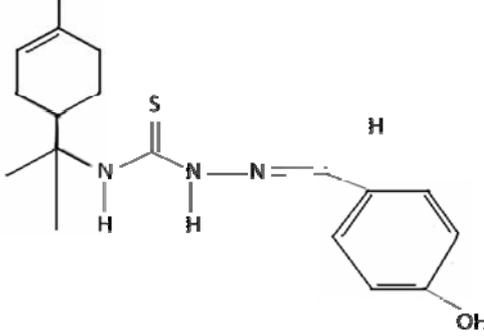
**Nome:** Tiossemicarozida tiossemicarbazona derivado do canfeno (Tiossemicarozida tio-canfeno)

**Fórmula Molecular:** C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>OS

**Massa Molar (g/mol):** 352,54



<p><b>Nome:</b> (-)-Canfeno</p> <p><b>Fórmula Molecular:</b> C<sub>10</sub>H<sub>16</sub></p> <p><b>Massa Molar (g/mol):</b> 136,23</p>	
<p><b>Nome:</b> Benzaldeído tiossemicarbazona derivado do limoneno (Benzaldeído tio-lim)</p> <p><b>Fórmula Molecular:</b> C<sub>11</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>S</p> <p><b>Massa Molar (g/mol):</b> 227,371</p>	
<p><b>Nome:</b> Tiossemicarbazida limoneno</p> <p><b>Fórmula Molecular:</b> C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>S</p> <p><b>Massa Molar (g/mol):</b> 315, 477</p>	
<p><b>Nome:</b> o-nitro tiossemicarbazona derivado do limoneno (o-nitro tio-lim)</p> <p><b>Fórmula Molecular:</b> C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>ON<sub>4</sub>S</p> <p><b>Massa Molar (g/mol):</b> 360,475</p>	
<p><b>Nome:</b> m-nitro tiossemicarbazona derivado do limoneno (m-nitro tio-lim)</p> <p><b>Fórmula Molecular:</b> C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>ON<sub>4</sub>S</p> <p><b>Massa Molar (g/mol):</b> 360,475</p>	

<p><b>Nome:</b> p-nitro tiossemicarbazona derivado do limoneno (p-nitro tio-lim)</p> <p><b>Fórmula Molecular:</b> C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>ON<sub>4</sub>S</p> <p><b>Massa Molar (g/mol):</b> 360,475</p>	
<p><b>Nome:</b> p-dimetilamino tiossemicarbazona derivado do limoneno (p-dimetilamino tio-lim)</p> <p><b>Fórmula Molecular:</b> C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>S</p> <p><b>Massa Molar (g/mol):</b> 358,545</p>	
<p><b>Nome:</b> p-hidróxi tiossemicarbazona derivado do limoneno (p-hidróxi tio-lim)</p> <p><b>Fórmula Molecular:</b> C<sub>18</sub>H<sub>30</sub>N<sub>3</sub>OS</p> <p><b>Massa Molar (g/mol):</b> 331,477</p>	

### 3.3- Avaliação do potencial citotóxico de tiossemicarbazonas derivadas de canfeno e limoneno

A avaliação da viabilidade celular foi realizada através do ensaio de MTT onde a atividade celular é quantificada pela redução do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), localizando a atividade de desidrogenases presente em células viáveis e liberando o formazan (cristais de coloração violeta) (MOSSMAN, 1983; CARMICHAEL, 1987; MOSSMAN, 1996). O formazan produzido pelas células nos testes de MTT está diretamente correlacionado com o número de células viáveis de cada experimento (BEHRNARD et. al., 2003).

O ensaio se baseia na proporcionalidade entre o número de células e a absorbância do formazan, é versátil, quantitativo e com boa reprodutibilidade, particularmente em células aderentes, além de ser considerado um método avançado com relação às técnicas tradicionais

usadas nos ensaios de proliferação e citotoxicidade (CARMICHAEL et. al., 1987; MOSSMAN, 1996). Nesse trabalho o solvente utilizado para solubilização do formazan e estabilidade da solução foi o metanol.

Com a finalidade de pré-selecionar os compostos com atividade antiproliferativa significativa, as células foram tratadas com uma concentração única de 100  $\mu$ M uma vez que concentrações superiores não apresentam interesse terapêutico (MAN et al., 2000). As células de melanoma (SK-MEL-37) foram semeadas em placas de petri de 3,5 cm<sup>2</sup> (Nunc Brand Products, USA) e tratadas com uma concentração constante de 100  $\mu$ M de cada composto. Após 24, 48 e 72 horas de incubação, as mudanças morfológicas foram fotografadas em microscópio óptico invertido de fluorescência (Eclipse TE 2000S, NIKON).

Após o período de incubação de 72h, adicionou-se solução de MTT (5mg/mL), após 1 hora e 30 minutos seguido da adição do metanol para solubilização do produto formazan. Transferiram-se alíquotas de 100  $\mu$ L para uma placa de 96 poços, seguindo-se a leitura da absorbância a 570 nm em leitor de microplacas (ELX-800, Bio-Tack Instrument, INC). Os valores de absorbância obtidos a partir desse experimento foram utilizados para a construção de um gráfico de Porcentagem representando a viabilidade celular x derivados das tiossemicarbazonas com o Programa GraphPad Prism, versão 4.00 para Windows, da GraphPad Software, San Diego, USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com). Os compostos que apresentaram uma média de 20% de viabilidade celular foram selecionados para os experimentos posteriores.

Os compostos submetidos ao ensaio clássico do MTT foram: benzaldeído tio-limoneno, tiossmicarbazida limoneno, m-nitro tio-limoneno, p-hidróxi tio-limoneno, etil piruvato tio-canfeno, acetofenona tio-canfeno, p-cloroacetofenona tio-canfeno, p-metilacetofenona tio-canfeno, furano tio-canfeno, 3-metóxi-4-hidroxibenzaldeído tio-canfeno, p-fluorbenzaldeído, 2-hidroxibenzaldeído tio-canfeno, tiofeno-2-carboxialdeído tio-canfeno, tiossemicarbazida tio-canfeno.

As células foram semeadas de forma a atingirem a confluência em 100 horas em placas de 24 poços e incubadas por 24 horas para adesão em incubadora a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, após a adesão, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos DT: 3,125  $\mu$ M, 6,25  $\mu$ M, 12,5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M e 100  $\mu$ M em triplicatas. Foram utilizados dois tipos de controles: um com o solvente empregado na diluição das drogas (DMSO/etanol- 10%/90%) e outro com meio de cultura sem adição de nenhum tipo de droga. Após 72h de tratamento, acrescentou-se 50  $\mu$ L da solução-estoque de MTT (5mg/mL - Calbiochem, USA) diretamente ao meio de cultura, incubando-se novamente por 1 hora e 30 minutos a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esses procedimentos, o meio foi totalmente descartado, acrescentando-se 300  $\mu$ L de metanol gelado

(Vetec) para a solubilização do formazan formado. Alíquotas de 100 µL foram transferidas para uma placa de 96 poços, seguindo-se a leitura da absorbância a 570 nm, pico de absorção máxima do formazan, em leitor de microplacas (ELX-800, Bio-Tack Instrument, INC). Para a construção dos gráficos de Porcentagem de viabilidade celular x concentração, bem como o cálculo do IC<sub>50</sub> (Concentração Inibitória para 50% das células), utilizou-se o Programa GraphPad Prism, versão 4.00 para Windows, da GraphPad Software, San Diego, USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com). Os valores de absorbância obtidos no tratamento com os compostos (A) foram padronizados para os valores obtidos com o solvente (B) para obtenção da porcentagem de viabilidade celular (C) através da equação:  $C = A/B \times 100$  para todas as concentrações estudadas.

### **3.4-Avaliação da morte celular por citometria de fluxo**

A fragmentação do DNA e avaliação do ciclo celular foi feita a partir da incorporação de iodeto de propídeo, em citômetro de fluxo, baseada na quantidade de ADN para cada fase do ciclo celular, conforme descrito por Rabinovitch (1995).

Os compostos submetidos ao ensaio do MTT foram: benzaldeído tio-limoneno, benzaldeído tio-canfeno, tiossemicarbazida limoneno, m-nitro tio-limoneno, p-hidróxi tio-limoneno e doxo. As células foram semeadas em placas de petri de 10cm de diâmetro, calculando-se o número de células semeadas para confluência em 72 horas. Ao final de 24 horas de crescimento, as células presentes nas placas foram tratadas com DT e Doxo (controle positivo), na concentração única de 100µM. Ao final de 48h de tratamento, as células foram desprendidas da placa com um raspador de células, lavadas com DPBS (4°C) e coletadas por centrifugação (2000rpm, 3 minutos). O *pellet* resultante foi lavado com DPBS puro (2x), fixado em etanol 70% e conservado a -20°C até o momento da análise. Antes da determinação do ciclo celular, as células foram centrifugadas (2000rpm, 3 minutos), o *pellet* resultante foi lavado com DPBS puro (2x) e marcado com 900µL de solução de Iodeto de propídeo (PI) (580 µg/mL RNase (Sigma), 100µg/mL de PI e 0.1% Triton X-100 (Sigma) em DPBS), foram incubados a 37°C for 30 min. 10000 eventos foram adquiridos no citômetro de fluxo (FACScan Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) a 488 nm. Os dados foram analisados usando os software CellQuest<sup>TM</sup> e o programa WinMDI.

### **3.5- Marcação Anexina V-FITC/PI por citometria de fluxo**

Durante o processo de apoptose a membrana plasmática não se rompe, prevenindo a liberação de componentes celulares para o meio extracelular (KERR et al., 1995). Adicionalmente, em sua porção externa passa a expor o fosfolípide fosfatidilserina, mantido normalmente em seu folheto interno, serve como sinal para fagocitose da célula apoptótica por macrófagos e células adjacentes (GREEN & KROEMER, 1998). As células então, em apoptose expõem na sua superfície fosfatidilserina enquanto células viáveis mantêm esses fosfolípidios na face interna membrana plasmática (BOERSMA et al., 2005; CHINKWO, 2005).

A anexina V é uma proteína que possui alta afinidade pela fosfatidilserina e se liga aos resíduos de fosfatidilserina no folheto interno da membrana plasmática (MARTIN et.al., 1995; PLASIER, 1999; CHEN, 2007). Ao utilizar-se anexina-V marcada com FITC (isotiacianato de fluoresceína) para detecção de apoptose é possível avaliar os níveis de fosfatidilserina expostas na membrana celular externa que se associaram a anexina-V, indicando fase inicial de apoptose (apoptose precoce).

Considerando que a translocação da fosfatidilserina apresenta-se também em processos de necrose, pois com a desnaturação da membrana plasmática a anexina penetra no citoplasma e liga-se a fosfatidilserina, utilizou-se o brometo de etídeo, que marca apenas as células necrosadas e permite diferenciação dos dois processos (MACKLIS & MADISON, 1990).

Para esse experimento utilizou-se o Kit de detecção de Apoptose TACS™ Annexin V-FITC (R & D System), seguindo as especificações do fabricante. As células foram semeadas em placas de petri de 10cm<sup>2</sup> de diâmetro, calculando-se o número de células semeadas para confluência em 48 horas. Ao final de 24 horas de crescimento, as placas foram tratadas com DT, na concentração única de 100µM. Ao final de 8h de tratamento, as células foram desprendidas da placa com um raspador de células, lavadas com DPBS (4°C) e coletadas por centrifugação (2000rpm, 3 minutos). O *pellet* resultante foi lavado com DPBS puro (2x). Os *pellets* lavados foram marcados com solução de anexina e iodeto de propídeo (PI) solução: (10 µL de buffer 10x, 10µL de PI, 1 µL de Annexin, 79 µL de água mili-Q), incubados por 15 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação foram adicionados 400 µL de buffer 1x (50 µL de buffer 10x e 450 µL de água mili-Q), esperou-se 30 minutos e procedeu-se a leitura no citômetro de fluxo (FACScan Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA), considerando-se a ocorrência de 10000 eventos. Os dados foram analisados usando o software CellQuest™.

### **3.6- Análise por microscopia de fluorescência**

O DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol) é um corante vital fluorescente, específico para núcleos (fluorocromo) que cora ácidos nucleicos, formando um complexo estável com a dupla fita de ADN emitindo forte fluorescência (SCHWEIZER, 1976). Permite assim, a visualização dos núcleos e possibilita através da microscopia de fluorescência a observação de mudanças na morfologia nuclear indicativas de apoptose (condensação da cromatina e da fragmentação nuclear) (GUICCIARDI et. al., 2000; DE CARVALHO et. al., 2006).

As células de melanoma (SK-MEL-37) foram semeadas em placas de petri de 8, 8 cm<sup>2</sup> de área (Nunc Brand Products, USA) em uma concentração adequada para atingirem a confluência em 72 horas. Vinte e quatro horas após a semeadura adicionou-se uma solução de DAPI (Invitrogen) a 1mg/ml, 48h após a semeadura, as células foram tratadas com o benzaldeído tio-canfeno, na concentração única de 100 µM. Após 8h de tratamento, as células foram monitoradas e fotografadas em microscópio invertido de fluorescência (Eclipse TE 2000S, NIKON).

### **3.7- Investigação da atividade das caspases 2, 3, 6, 8 e 9**

As caspases recebem esse nome por serem proteases de cisteína (“C”) e clivarem seus alvos logo após os resíduos de ácido aspártico (Asp-x) (“aspase”) (COHEN, 1997). Como mecanismo de proteção contra ativação inadequada, essas enzimas são sintetizadas na forma de precursores inativos (zimogênios), necessitando de clivagem para iniciar sua ativação (HENGARTNER 2000).

Os compostos submetidos ao ensaio do MTT foram: benzaldeído tio-limoneno, benzaldeído tio-canfeno, m-nitro tio-limoneno e p-hidróxi tio-limoneno. O kit colorimétrico ApoTarget™ Protease Ensaio Colorimétrico (Invitrogen) foi utilizado para a quantificação da atividade das caspases. O kit apresenta substratos sintéticos com as sequências de aminoácidos que são reconhecidas e clivadas pelas caspases. Os substratos são: VDVAAD (Val-Asp-Val-Ala-Asp- para a caspase-2), DEVD (Asp-Glu-Val-Asp para a caspase-3), VEID (Val-Glu-Ile-Asp para a caspase-6), IETD (Ile-Glu-Thr-Asp- para a caspase-8), e LEHD (Leu-Glu-His-Asp- para a caspase-9) e estão marcados em sua região C-terminal com o cromóforo p-nitroanilina (PNA). Assim, após a clivagem dos respectivos substratos pelas caspases correspondentes, a absorção de luz pela pNA livre é quantificada com a utilização de um leitor de microplacas (ELX-800, Bio-Tack Instrument, INC) a 405nm.

Para a realização do ensaio, células em crescimento exponencial foram semeadas em placas de cultura (100 mm de diâmetro) com uma densidade de semeadura de 3 x 10<sup>5</sup> células/mL. 24h após a semeadura, as células foram tratadas com DT (100 µM) e incubadas

por períodos variados em relação a cada DT, variando de 2h até no máximo 24h de incubação com o composto selecionado. Terminado o período de tratamento, as células foram recolhidas e coletadas por centrifugação, lavadas duas vezes com PBS gelado. A 4 ° C, os pellets foram transferidos para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, sedimentados a 2000 rpm e ressuspensos em tampão de lise celular (Tris buffer detergente contendo salina) para a lise das células. Após a lise, as amostras foram sedimentadas em ultracentrífuga a 12000rpm por 10 minutos. Aliquotas do sobrenadante foram retiradas para determinação da concentração das proteínas. As amostras foram então misturadas com o tampão de reação e DTT (dithiothreitol - 1M), na proporção de 1/50. A cada amostra foram adicionados 200 mM de: VDVAD-pNA (Caspase-2) ou DEVD-pNA (Caspase-3) ou VEID-pNA (caspase-6) ou IETD-pNA (caspase-8) ou LEHD-pNA (caspase-9). As amostras foram incubadas a 37 ° C por 2 e 15h, depois incubadas em temperatura ambiente por mais 21h, completando 36h de incubação, na ausência de luz. Após cada período de incubação as amostras foram lidas em leitor de microplacas (ELX-800, Bio-Tack Instrument, INC) a 405nm.

Foram realizados experimentos controle para determinação da taxa basal de caspases presentes nas células de melanoma não tratadas. Diante dos valores encontrados determinou-se a atividade das caspases a partir da normalização dos dados com as curvas-padrões de p-nitroanilina pura e dosagem de proteínas.

Para a construção da curva padrão de p-nitroalínina, preparou-se uma solução estoque de 10mM em DMSO e, a partir da solução estoque foram feitas soluções de 200µM, 100µM, 50µM, 20µM e 10µM, em tampão de lise fornecido pelo kit utilizado. Retirou-se então uma alíquota de 100µL - para uma placa de 24 poços e a absorbância da solução foi medida a 405nm em um leitor de microplacas . Os resultados obtidos foram analisados no Programa GraphPad Prism, versão 4.00 para Windows, da GraphPad Software, San Diego, USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com) e resultaram na construção da curva-padrão da pNA (figura 16A). Os valores encontrados foram normalizados pelos valores de proteínas totais de cada amostra.

A determinação da concentração de proteínas em cada amostra foi baseada no ensaio do ácido bicinchoninico (SMITH et. al., 1985), usando soro albumina bovina (BSA) como proteína padrão. Os padrões foram preparados a partir de diluições seriadas, resultando em concentrações na faixa de 200µg/mL - 6, 25µg/mL.

Cada amostra foi diluída (1:100) em PBS (pH 7,2). Uma alíquota de 50µL foi adicionada a uma solução de sulfato de cobre 4% e ácido bicinchoninico (BCA), na proporção de 1:50. As amostras foram então, incubadas a 60 °C por 30 minutos e posteriormente, incubadas em temperatura ambiente por 15 min. Após este período, a absorbância das

amostras foi medida em leitor de microplacas (ELX-800, Bio-Tack Instrument, INC) a 570nm. Os resultados obtidos foram analisados no Programa GraphPad Prism, versão 4.00 para Windows, da GraphPad Software, San Diego, USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com) e resultaram na construção da curvas-padrão da dosagem de proteínas (figura 16 B).

### **3.8- Análise da presença de caspase a partir do marcador de luminescência Nuc View**

NucView<sup>TM</sup><sup>488</sup> Caspase é um substrato fluorogênico capaz de detectar a atividade de caspases no interior de células vivas, emitindo uma fluorescência em tempo real. O experimento foi realizado seguindo as especificações do fabricante. As células de melanoma (SK-MEL-37) foram semeadas em placas de petri de 3,5cm<sup>2</sup> de área (Nunc Brand Products, USA) em uma concentração adequada para atingirem a confluência em 48 horas. Vinte e quatro horas após a semeadura adicionou-se o benzaldeído tio-canfeno (100 µM), 8h após início do tratamento, retirou-se o meio das células e adicionou-se às células uma solução de meio de cultura com Nuc View com uma concentração de 1µM, seguindo as especificações do fabricante. 15 minutos após a adição da solução de Nuc View, as células foram monitoradas e fotografadas em microscópio invertido de fluorescência (Eclipse TE 2000S, NIKON).

### **3.9- Análise por RT PCR**

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica de amplificação *in vitro*, potencialmente útil, que pode, em questão de horas, amplificar seqüências específicas de DNA e é extremamente sensível. Encontra sua principal aplicação em situações onde a quantidade de DNA disponível é reduzida. Uma das modalidades da PCR é a RT PCR, a enzima transcriptase reversa (RT) reproduz o DNA a partir de um molde de RNA. Esta enzima está sendo muito utilizada no campo da engenharia genética, permitindo o seqüenciamento de fragmentos de DNA através de análises químicas e reações enzimáticas (HARA et al.,1985; KARLSSON et al., 1995; CHOI et al., 2006).

Para a realização deste experimento, as células de melanoma (SK-MEL-37) foram semeadas em placas de petri de 10 cm<sup>2</sup> de área (Nunc Brand Products, USA) em uma concentração adequada para atingirem a confluência em 48 horas. Vinte e quatro horas após a semeadura, as células foram tratadas com uma concentração constante de 100 µM de benzaldeído tio-canfeno. Após 2, 6 e 24 horas de tratamento procedeu-se a extração de RNA usando o Trizol (Invitrogen, USA) e seguindo as especificações do fabricante. O RNA extraído

foi quantificado usando um fluorímetro (Qubit™, Invitrogen, USA). 2µg do RNA extraído foram tratados com DNase (Invitrogen, USA) por 15 minutos a temperatura ambiente.

Foi utilizado o equivalente a 1µg de RNA tratado na reação de transcrição reversa aos quais foram adicionados 1µg de Thermo Script do Kit RT PCR™ (Invitrogen, USA), seguindo as especificações do fabricante. Controles RT negativos (não utilizando a Thermo Script) também foram incluídos.

A reação de PCR foi composta por 1,25µM de cada primer (quadro 2), 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1mM de cada dNTPs, 2,5U *Taq* Polymerase em 1x PCR buffer (Invitrogen, USA) e 2µL de cDNA, perfazendo um volume final de 25µL. As condições de ciclagem aplicadas estão descritas no quadro 2. A amplificação dos produtos foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,5%, contendo brometo de etídio (EtBr; *UltraPure* Invitrogen: 1µg/mL). cDNA de GAPDH como controle negativo e amostras sem cDNA também foram utilizadas na reação de PCR. A condição de corrida utilizada foi: 80V, 300mA a 1:40h. O peso molecular (100pb) de comparação (escada alélica) (100 pb DNA *Ladder* (Invitrogen). As bandas foram reveladas com o sistema de fotodocumentação digital após análise no transluminador mediante luz UV.

**Quadro 2:** Sequências dos primers e condições da PCR<sup>a</sup> para RT-PCR das proteases humanas: caspase2, caspase3, caspase6, caspase8 e caspase 9 e as proteínas humanas: Apaf-1 e GAPDH.

Nome da protease	Primers ( 5' para 3')	Reference
Caspase 2	GTTACCTGCACACCGAGTCACG GCGTGGTTCTTTCCATCTTGTGGTCA	Uehara, T, Kikuchi, Y & Nomura, Y, 1999.
Caspase 3	GAATATCCCTGGACAACA ACGCCATGTCATCATCAA	Uehara, T, Kikuchi, Y & Nomura, Y, 1999.
Caspase 6	GGACTTTTGCAAAGACCCAA GTCAGGCTGGTCTCGAACTC	Minko, T, Kopeckova, P & Kopeceka, J, 2001.
Caspase 8	TCATTTTGAGATCAAGCCCC CCCCTGACAAGCCTGAATAA	Minko, T, Kopeckova, P & Kopeceka, J, 2001.
Caspase 9	ATG GAC GAA GCG GAT CGG CGGC TTA TGA TGT TTT AAA GAA AAG	Kuida, k <i>et. al.</i> , 1998.
Apaf-1	GGG AAG ATG GAT GCA AAA GCT CGA CTG GCT GCA ATT CTT CTC TGT AAG	Kuida, k <i>et. al.</i> , 1998.
GAPDH	GAA GGT GAA GGT CGG AGT C GAA GAT GGT TGA TGG GAT TTC	Minko, T, Kopeckova, P & Kopeceka, J, 2001.

<sup>a</sup> Condições de PCR para caspases 2,3, 8 e apaf-1: 94°C/4 min, 55°C/1 min, 72°C/1 min por 1 ciclo; 94°C/1 min, 55°C/1min, 72°C/1 min por 28 ciclos, 60°C por 10 min. Para caspases 6 e 9: 94°C/4 min, 55°C/1 min, 72°C/1 min por 1 ciclo; 95°C/15s, 60°C/1min, 72°C/1 min por 30 ciclos, 72°C por 10 min. Para GAPDH: 95°C/2 min por 1 ciclo; 95°C/15s, 60°C/1min, 72°C/1 min por 28 ciclos, 72°C por 10 min.

### 3.10- Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia tem por objetivo a obtenção de imagens ampliadas de um objeto, que permite a distinção de detalhes não revelados a olho nú (MANNHEIMER, 2002). Neste

trabalho a microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para o estudo da morfologia das células de melanoma tratadas com benzaldeído tio-canfeno.

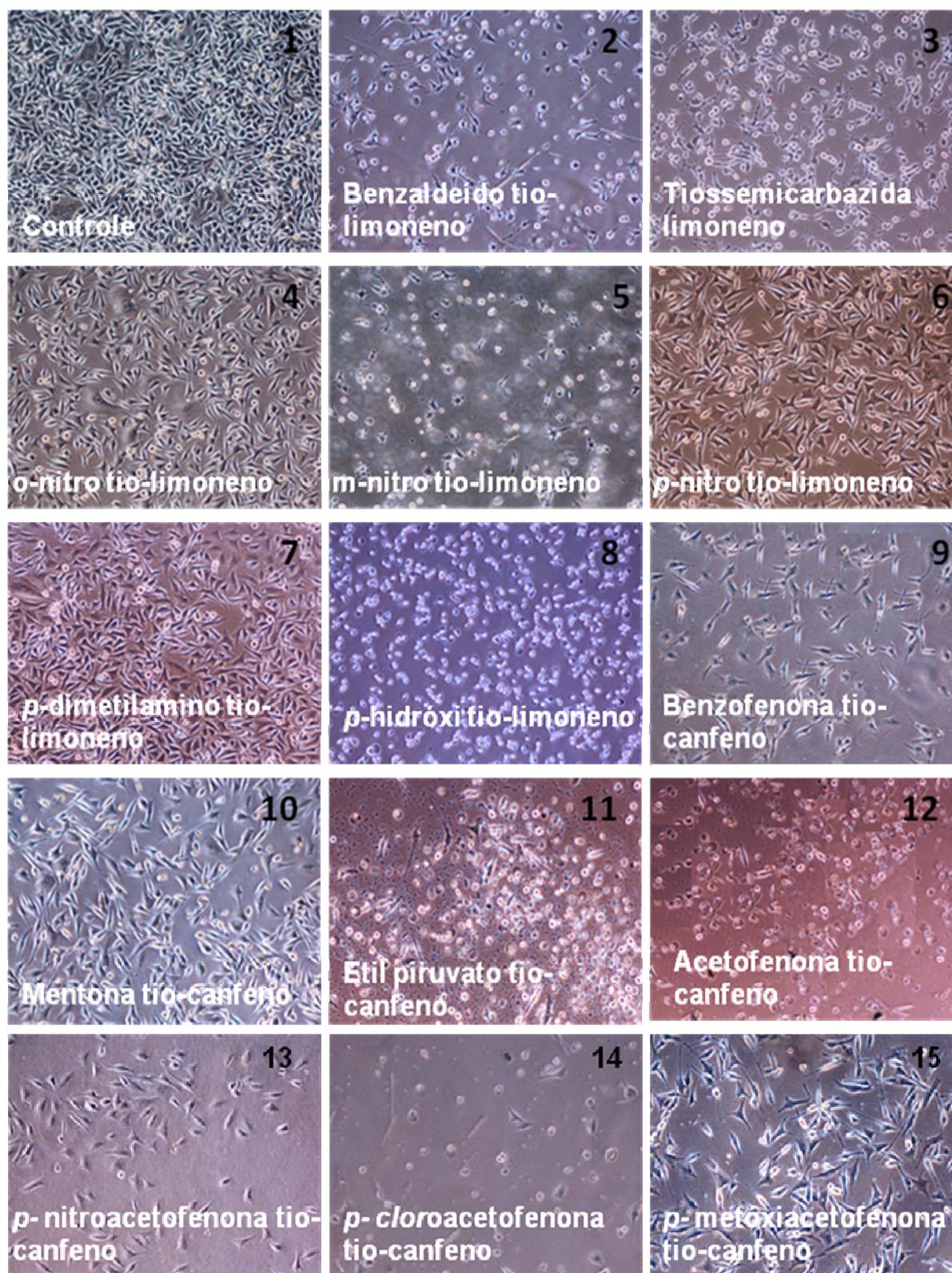
As células de melanoma SK-MEL-37 foram plaqueadas em placas de 3,5cm<sup>2</sup> de área (Nunc Brand Products, USA) contendo lamínulas gelatinizadas (gelatina 0,1%) para 72 horas de crescimento, após a confluência, as células foram tratadas com uma concentração única de 100µM de benzaldeído tio-canfeno, após 8 horas de tratamento foi realizada uma primeira fixação. As células foram lavadas com DPBS com Ca<sup>++</sup> e Mg<sup>++</sup> e colocadas em solução de Karnovsky's na geladeira por 72 horas, após esse período de incubação, as células foram lavadas com tampão de cacodilato de sódio (0,1M pH 7,2), durante 5 minutos (2x). As células foram desidratadas em uma série de concentrações crescentes de etanol, incluindo banhos de 30% a 90% por 10 minutos cada e a concentração 100%, por três vezes durante 10 minutos cada. Retirou-se o etanol 100% e colocou-se 1mL de Hexametildissilazana (HMDS) por 30 minutos a uma temperatura ambiente, retirou-se o excesso de HMDS, levou-se as células a um dessecador overnight. As lamínulas contendo as células fixadas foram levadas ao Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LAMMAR) no Instituto de Física/UFG, foram cobertas com uma fina camada de ouro, observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JSM – 6610, equipado com EDS e Thermo scientific NSS Spectral Imaging) operado a 4 kV. O mesmo padrão foi adotado para as células SK-MEL-37 sem adição de benzaldeído tio-canfeno.

## **4- RESULTADOS**

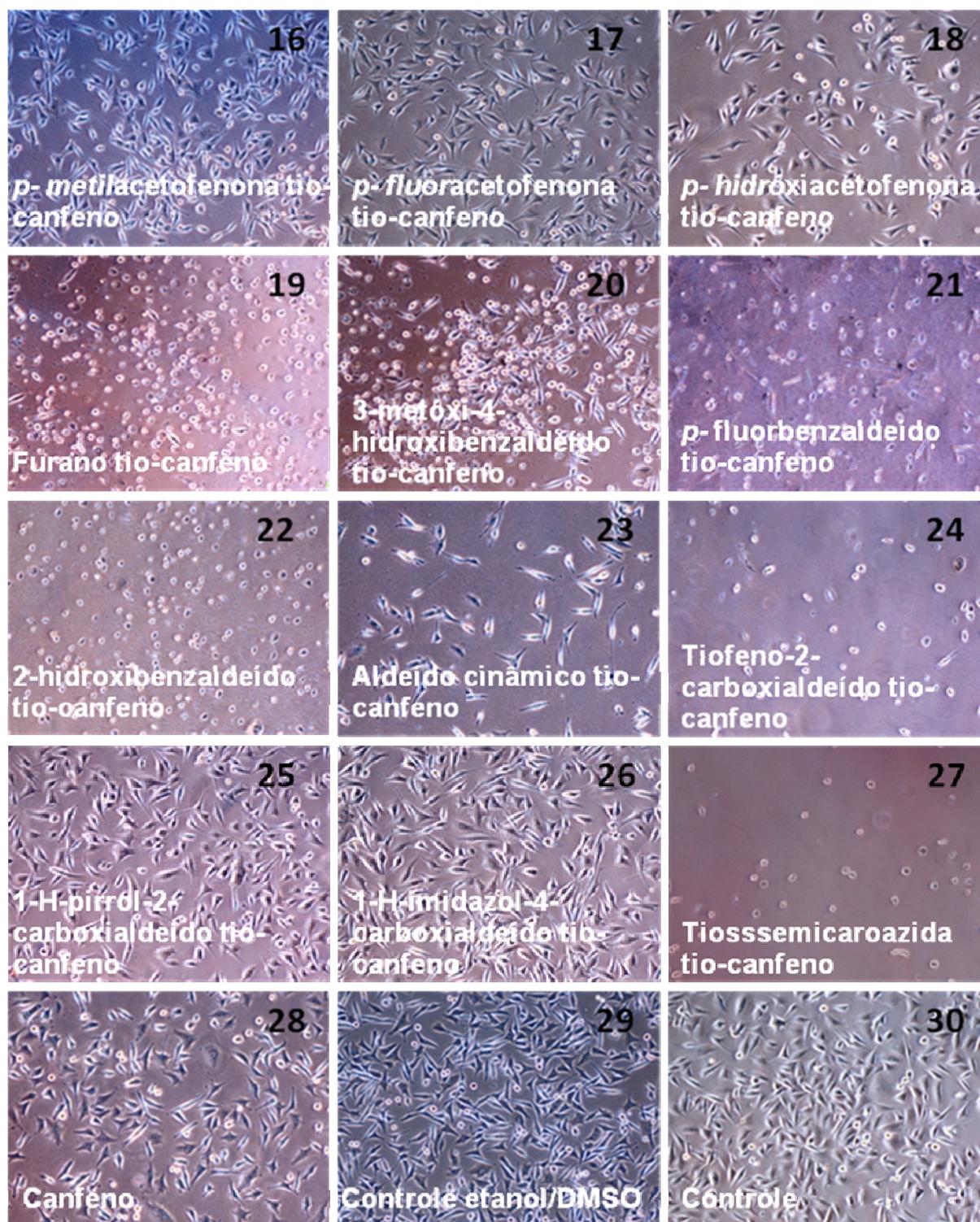
### **4.1- Pré-seleção dos compostos**

Foi feita uma análise preliminar aos ensaios de MTT para selecionar, de forma rápida, os compostos que apresentaram atividade anti-proliferativa. Nessa análise, as células foram submetidas ao tratamento com uma concentração única de 100  $\mu\text{M}$  de cada um dos vinte e sete compostos utilizados nesse estudo. Após o tratamento, as células foram acompanhadas ao microscópio óptico por um período de no máximo 72 horas de incubação com o composto. Durante o acompanhamento foi observado o desprendimento do fundo do frasco de mais de 85% das células tratadas, todos os compostos que produziram esse efeito foram selecionados para os ensaios de MTT que envolveram a determinação do valor de  $\text{IC}_{50}$ .

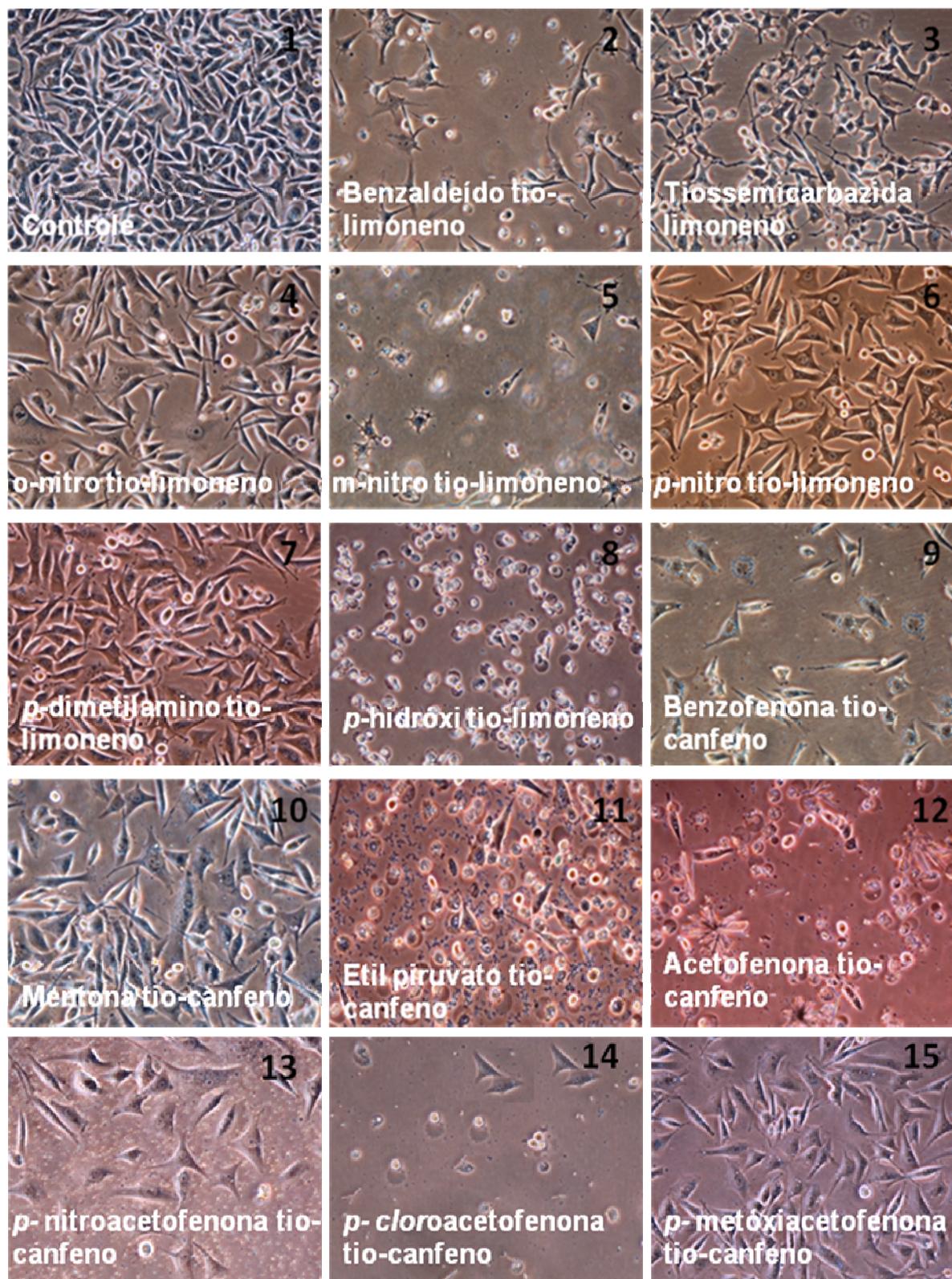
Dentre os vinte e sete compostos derivados de tiossemicarbazonas estudados, catorze provocaram o desprendimento total das células do fundo do frasco na concentração de 100  $\mu\text{M}$ . Treze desses compostos causaram esse efeito em apenas 24 horas de incubação (Figura 6: 2, 3, 5, 8, 11, 12,14, 19, 20, 21, 22, 24 e 27). O efeito só foi visível após 48 horas para o composto 16 (Figura 6). O aspecto das culturas ao final de 72 horas de tratamento permaneceu idêntico ao mostrado para 48 horas.



**Figura 5:** - Aspecto visual da cultura de células de melanoma SK-MEL-37 após 24 horas de tratamento com uma concentração de 100  $\mu$ M dos diversos DT estudados: (1) Controle, (2) benzaldeído tio-limoneno, (3) tiossemicarbazida limoneno, (4) o-nitro tio-limoneno, (5) m-nitro tio-limoneno, (6) p-nitro tio-limoneno, (7) p-dimetilamino tio-limoneno, (8) p-hidróxi tio-limoneno, (9) benzofenona tio-canfeno, (10) mentona tio-canfeno, (11) etil piruvato tio-canfeno, (12) acetofenona tio-canfeno, (13) p-nitroacetofenona tio-canfeno, (14) p-cloroacetofenona tio-canfeno e (15) p-metoxiacetofenona tio-canfeno. As células foram observadas e fotografadas com microscópio óptico invertido no próprio frasco de cultivo. Ampliação 100x.



**Figura 5:** Aspecto visual da cultura de células de melanoma SK-MEL-37 após 24 horas de tratamento com uma concentração de 100  $\mu$ M dos diversos derivados de tiossemicarbazonas estudados: DT estudados: (16) *p*-metilacetofenona tio-canfeno, (17) *p*-fluoracetofenona tio-canfeno, (18) *p*-hidroxiacetofenona tio-canfeno, (19) furano tio-canfeno, (20) 3-metóxi-4-hidroxibenzaldeído tio-canfeno, (21) *p*-fluorbenzaldeído tio-canfeno, (22) 2-hidroxibenzaldeído tio-canfeno, (23) aldeído cinâmico tio-canfeno, (24) tiofeno-2-carboxialdeído tio-canfeno, (25) 1-H-pirrol-2-carboxialdeído tio-canfeno, (26) 1-H-imidazol-4-carboxialdeído tio-canfeno, (27) tiossemicarozida tio-canfeno, (28) canfeno (29) controle etanol/DMSO (10%/90%) e (30) controle. As células foram observadas e fotografadas com microscópio óptico invertido no próprio frasco de cultivo. Ampliação 100x.



**Figura 6** - Aspecto visual da cultura de células de melanoma SK-MEL-37 após 24 horas de tratamento com uma concentração de 100  $\mu$ M dos diversos DT estudados: (1) Controle, (2) benzaldeído tio-limoneno, (3) Tiossemicarbazida limoneno, (4) o-nitro tio-limoneno, (5) m-nitro tio-limoneno, (6) p-nitro tio-limoneno, (7) p-dimetilamino tio-limoneno, (8) p-hidróxi tio-limoneno, (9) benzofenona tio-canfeno, (10) mentona tio-canfeno, (11) etil piruvato tio-canfeno, (12) acetofenona tio-canfeno, (13) p-nitroacetofenona tio-canfeno, (14) p-cloroacetofenona tio-canfeno e (15) p-metóxiacetofenona tio-canfeno. As células foram observadas e fotografadas com microscópio óptico invertido no próprio frasco de cultivo. Ampliação 200x.