

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE BENZALDEÍDO
CANFENO TIOSSEMICARBAZONAS EM CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO
(SK-MEL-37)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal de Goiás, para obtenção do título de Mestre em Biologia.

PAULA ROBERTA OTAVIANO SOARES

ORIENTADORA: PROF^a DR^a LÍDIA ANDREU GUILLO
CO-ORIENTADORA: PROF^a DR^a CECÍLIA MARIA OLIVEIRA

Goiânia
2008

*Aos meus pais, maiores amigos e
incentivadores. Vocês são os melhores
presentes que Deus poderia me dar e
sempre estarão juntos em cada escolha,
conquistas e vitórias da minha vida. Amo
vocês!*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que me proporcionou a vida, me fortalece e me guia, por seus milagres a cada dia em minha vida e por me surpreender sempre.

À minha orientadora e amiga Prof^a Dr^a Lídia Andreu Guillo, que abriu as portas de seu laboratório, pela paciência e dedicação, pela orientação, ensinamentos e toda ajuda na realização desse trabalho. Serei eternamente grata!

À Prof^a Dr^a Cecília Maria Oliveira, do Instituto de Química da UFG, por me ajudar com os ensinamentos de química, pelo incentivo e dedicação a este trabalho e à Prof^a Dr^a Lucília Kato pelo carinho e atenção.

À Prof^a Dr^a Cleuza C. da Silva e sua equipe da UEM, pela disponibilização dos compostos para a realização desse trabalho.

Aos meus pais Paulo Roberto Soares e Eliana Otaviano Soares pelo carinho, amor e orações, pelos ensinamentos de vida e alegrias, pela compreensão. Mesmo distantes vocês estiveram presentes em cada etapa da minha vida e deste trabalho!!! Amo vocês ... incondicionalmente... sempre!! Aos meus irmãos, José Henrique e Rafael Henrique, pelo carinho e pelas orações!! Amo vocês!!!

À Família Monteiro Oliveira: Edson, Renata, Felipe, Rafael, Rodrigo e Débora, pelo carinho, pelas orações, pela “adoção”, amor, amizade e risadas, enfim, por cada momento que me ajudaram e me fizeram bem. Serei eternamente grata!! Vocês são inesquecíveis!!!

À Marcela Lemos Bretas Carneiro e Vanessa Guimarães F. C. D'Ávila, minhas primeiras amigas e companheiras no laboratório de Bioquímica Celular. Obrigada pelo incentivo e pelos primeiros ensinamentos na pesquisa.

Às minhas amigas, companheiras e pesquisadoras do Laboratório de Bioquímica Celular:

- Débora Teixeira Duarte, pela paciência, pelos ensinamentos, pelas “palavras elegantes”, pelo incentivo, sempre pronta a ajudar;

- Érika Regina Leal Freitas, pelo exemplo de dedicação, pelos conselhos, compreensão e ensinamentos;

- Larissa Matuda pelas aulas de farmacologia, pela companhia no ônibus e almoços, pelas orações;

- Zenilda Pateis França, pelo carinho e por estar sempre pronta a ajudar e servir;

Além, é claro, por cada uma das conversas, risadas, canções, motivações mútuas, conselhos, assessorias e estudos. Vocês foram essenciais para mim!!!

À minha amiga Petra Mello, pelo carinho, por cada ligação e pelos ensinamentos didáticos e de vida. E também à sua família, Dn^a Regina e Sr^o Marcos e a vovó Darcy, obrigada pelo carinho!!

À Aline Cristina da Silva, de Paulínia, pelo carinho e, mesmo estando muito distante, me ajudou a superar a ansiedade pelas conversas no MSN!! Amiga, muito obrigada!!!

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

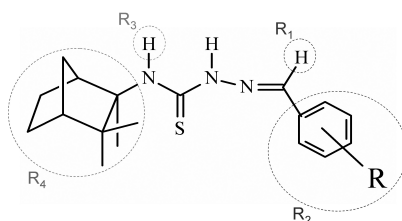
Obrigada!!!

“E apliquei o meu coração a esquadrinhar, e a informar-me com sabedoria de tudo quanto sucede debaixo do céu; esta ocupação deu Deus aos filhos dos homens, para nela os exercitar.”

Eclesiastes 1:13

RESUMO

As tiossemicarbazonas são compostos de considerável interesse científico devido às suas importantes propriedades biológicas, tais como antitumoral, antimicrobiana, antiviral, antiprotozoária, dentre outras. Os compostos estudados apresentam o monoterpreno natural canfeno na posição **R₄** e o benzaldeído em **R₂**, com substituição no anel por diferentes grupos (R), o que confere ao presente trabalho um caráter inédito.

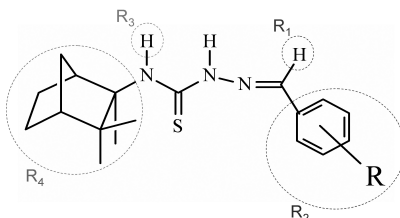


Dessa forma, foram apresentados para este estudo onze diferentes compostos derivados de benzaldeído canfeno tiossemicarbazona: benzaldeído canfeno tiossecarbazona, *p*-metil benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, *p*-metóxi benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, *o*-cloro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, *m*-cloro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, *p*-cloro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, *o*-nitro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, *m*-nitro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, *p*-nitro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, *p*-dimetilamino benzaldeído canfeno tiossemicarbazona e *p*-hidróxi benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, além de isotiocianato canfeno e canfeno tiossemicarbazida. Os experimentos foram realizados *in vitro* utilizando-se células de melanoma humano (SK-Mel-37), visto que o melanoma é o tipo mais grave de câncer de pele devido à sua alta possibilidade de metástase e resistência à indução de apoptose por drogas antineoplásicas. Inicialmente, realizamos um *screening* visual observando-se o desprendimento de mais de 85% do total das células, após tratamento com a concentração única de 100 µM. Dessa análise, foram selecionados seis compostos: benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, *m*-cloro-benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, *m*-nitro-benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, *p*-dimetilamino-benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, *p*-hidróxi-benzaldeído canfeno tiossemicarbazona e *p*-metóxi benzaldeído canfeno tiossemicarbazona. A análise morfológica das células tratadas e coradas com Giemsa e observadas através de microscópio óptico invertido em contraste de fase demonstrou intensa vacuolização celular e fragmentação nuclear. Na análise da viabilidade celular, através do ensaio colorimétrico do MTT, os compostos apresentaram valores de IC₅₀ (Concentração Inibitória para 50% das células) entre 12,84 µM e 32,18 µM, valores que se encontram abaixo do descrito na literatura para compostos com ação antineoplásica. A análise da fragmentação nuclear através de microscopia de fluorescência foi realizada pela incorporação de iodeto de propídio. Observamos, em diferentes tempos, o aumento progressivo dos danos celulares e a fragmentação nuclear pronunciada após o desprendimento das células. A análise de fragmentação de DNA por eletroforese em gel de agarose revelou de maneira inequívoca que a ação citotóxica observada ocorre por apoptose. Os resultados obtidos demonstraram que seis compostos derivados do benzaldeído canfeno tiossemicarbazonas apresentaram atividade citotóxica em células de melanoma humano (SK-Mel-37) *in vitro*, e são candidatos promissores para as análises futuras visando à sua aplicação terapêutica.

Palavras-chave: Benzaldeído canfeno tiossemicarbazonas, melanoma, MTT, apoptose, citotoxicidade

ABSTRACT

The thiosemicarbazones are chemical compounds of considerable scientific interest due to their important biological properties, such as antitumoral, antibacterial, antiviral, and antiprotozoal, among others. The studied compounds have the natural monoterpene camphene in the **R**₄ position and the benzaldehyde in **R**₂, with the substitution in the ring for different (R) groups, making this work unique.



In this way, thirteen different compounds were derived from the benzaldehyde camphene thiosemicarbazone: camphene isotyioscyanate, camphene thiosemicarbazide, benzaldehyde camphene thiosemicarbazone, *p*-methyl benzaldehyde camphene thiosemicarbazone, *p*-methoxy benzaldehyde camphene thiosemicarbazone, *o*-chloro benzaldehyde camphene thiosemicarbazone, *m*-chloro benzaldehyde camphene thiosemicarbazone, *p*-chloro-benzaldehyde camphene thiosemicarbazone, *o*-nitro-benzaldehyde camphene thiosemicarbazone, *m*-nitro-benzaldehyde camphene thiosemicarbazone, *p*-nitrobenzaldehyde camphene thiosemicarbazone, *p*-dimethylamino benzaldehyde camphene thiosemicarbazone and *p*-hydroxy benzaldehyde camphene thiosemicarbazone. The experiments were conducted *in vitro* using human melanoma cells (SK-Mel-37), because the melanoma is the most serious type of skin cancer due to its high possibility to metastasize and its resistance to the induction of apoptosis by antineoplastic drugs. We first performed a visual screening to observe if there was detachment of more than 85% of the total number of cells, after treatment with the sole concentration of 100 μ M. Thus, six compounds were selected: benzaldehyde camphene thiosemicarbazone, *m*-chloro benzaldehyde camphene thiosemicarbazone, *m*-nitro-benzaldehyde camphene thiosemicarbazone, *p*-dimethylamino benzaldehyde camphene thiosemicarbazone, *p*-hydroxy benzaldehyde camphene thiosemicarbazone e *p*-methoxy benzaldehyde camphene thiosemicarbazone. The morphological analysis of the treated cells, by inverted phase contrast microscope and Giemsa stain, showed intense cellular vacuolization and nuclear fragmentation. In the cellular viability test, through the MTT colorimetric assay, the compounds showed IC₅₀ (inhibitory concentration for 50% of the cells) values between 12, 84 μ M and 32, 18 μ M, which are below of those described in the literature for compounds with antineoplastic action. The analysis of nuclear fragmentation by fluorescence microscopy was performed by the incorporation of propidium iodide, and it was observed, at different time points, a progressive increase of cellular damage and a pronounced nuclear fragmentation after the cellular detachment. The analysis of the DNA fragmentation by agarose gel electrophoresis revealed that the unequivocal cytotoxic action of the compounds occurred by apoptosis. Our results showed that six compounds derived from the benzaldehyde camphene thiosemicarbazones had cytotoxic activity in human melanoma cells (SK-Mel-37) *in vitro*, and constitute potential candidates for future analysis aiming its therapeutic application.

Key-words: Benzaldehyde camphene thiosemicarbazones, melanoma, *in vitro*, MTT, apoptosis, cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula estrutural das tiossemicarbazonas.	16
Figura 2: Reação de obtenção direta de tiossemicarbazonas através da reação de aldeídos ou cetonas com tiossemicarbazidas.	17
Figura 3: Fórmula estrutural do composto 3-aminopiridina-2-carboxaldeído-tiossemicarbazona (Triapina® ou 3-AP).	17
Figura 4 : Fórmula estrutural do composto Dp44mT (di-2-piridilcetona 4-metil-3-tiossemicarbazona) testado em células de neuroepitelioma (SK-N-MC) que apresentou IC ₅₀ de 0,03 µM.	14
Figura 5: Fórmula estrutural das tiossemicarbazonas estudadas em linhagens de células neoplásicas <i>in vitro</i> com IC ₅₀ entre 0,3 µ M e 5 µM.	15
Figura 6: Tiossemicarbazonas derivadas dos aldeídos naturais.	16
Figura 7: Fórmula estrutural da tiossemicarbazona.	17
Figura 8: Caracterização do aspecto clínico do melanoma.	21
Figura 9: Mudanças morfológicas em células de carcinoma oral humano linhagem KB) tratadas com ricina, uma substância tóxica que desencadeia apoptose.	23

Figura 10 : Mudanças morfológicas características de apoptose induzidas por 10 μ M AST e TEF durante 8 horas em células de melanoma (A375).	24
Figura 11: Esquema dos processos apoptóticos intrínseco e extrínseco da apoptose.	25
Figura 12: Painel do aspecto visual da cultura de células de melanoma SK-Mel-37 após 24 horas de tratamento com uma concentração de 100 μ M diversos derivados de tiossemicarbazonas estudados.	41
Figura 13: Painel do aspecto visual da cultura de células de melanoma SK-Mel-37 após 48 horas de tratamento com uma concentração de 100 μ M dos diversos derivados de tiossemicarbazonas estudados.	42
Figura 14: Aspecto morfológico de células de melanoma SK-Mel-37 em cultura tratadas por 24 horas na concentração de 100 μ M com derivados de benzaldeído canfeno tiossemicarbazonas.	44
Figura 15: Aspecto morfológico de células de melanoma humano (SK-Mel-37), tratadas com 50 μ M de benzaldeído canfeno tiossemicarbazona.	45
Figura 16: Células de melanoma humano da linhagem celular SK-Mel-37 tratadas por 24 horas com 50 μ M de benzaldeído canfeno tiossemicarbazona.	46

Figura 17: Gráfico dose-resposta do tratamento das células de melanoma humano SK-Mel-37 por 24, 48 e 72 horas.	49
Figura 18: Viabilidade celular de todos os compostos estudados.	52
Figura 19: Células de melanoma humano (SK-Mel-37) em cultura tratadas com <i>m</i> -cloro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona na concentração de 50 µM em diferentes tempos de incubação.	54
Figura 20: Eletroforese em gel de agarose a 2% do DNA de células de melanoma tratadas com compostos derivados de canfeno tiossemicarbazonas (100 uM) após 72 horas.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Peso molecular, fórmula química e estrutural dos compostos derivados de benzaldeído canfeno tiossemicarbazonas.	32
Tabela 2: Valores de IC ₅₀ obtidos através do ensaio do MTT.	50
Tabela 3: Valores de IC ₅₀ e desvio padrão (DP) de três experimentos independentes.	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μL - Micro litros

μM - Micro molar

AST – Astemizol

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucléico

EDTA - “Ethylenediamine tetraacetic acid”, ácido etilenodiamino tetra-acético

H1, H2, H3 e H4 – Histaminas

IC₅₀ - Concentração Inibitória para 50% das células

INCA - Instituto Nacional do Câncer

MEM - “Minimum Essential Médium”

MTT – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

PBS - Phosphate buffered saline, tampão salina fosfatada

PI - Propidium Iodide, Iodeto de propídio

rpm -rotações por minuto

TBE - Tris borato EDTA

t_d - Tempo de duplicação

TE -Tris- HCl EDTA

TEF – Terfenadina

TNFR1 - Tumor necrosis factor

TRAIL – Fator de necrose tumoral

UFG - Universidade Federal de Goiás

UV - ultravioleta

MAPK- proteína quinase ativada por mitógeno

SUMÁRIO

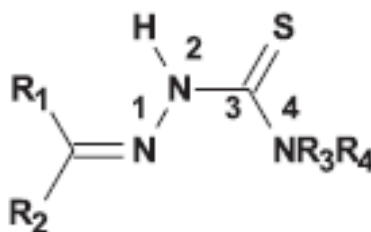
1. INTRODUÇÃO	16
Importância biológica de tiossemicarbazonas	16
Compostos derivados de benzaldeído canfeno tiossemicarbazona	17
Avaliação de citotoxicidade <i>in vitro</i>	18
Melanoma cutâneo: origem incidência e progressão	20
Vias de morte celular em tumores	22
Mecanismo de resistência em cânceres	26
2. OBJETIVOS	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
Preparo das principais soluções-estoques	29
Cultura e manutenção da linha celular	30
Determinação dos parâmetros de proliferação celular	30
Compostos derivados do benzaldeído canfeno tiossemicarbazona	31
Avaliação do potencial citotóxico dos derivados de tiossemicarbazonas	34
Análise morfológica	35
Avaliação de viabilidade celular (ensaio de MTT)	35
Análise por microscopia de fluorescência	37
Análise da fragmentação do DNA	37
4. RESULTADOS	39
Pré-seleção dos compostos	39
Análise morfológica	43
Determinação da concentração inibitória (IC ₅₀)	47
Marcação “ <i>staining live</i> ” de núcleos apoptóticos com iodeto de propídeo	52
Análise de fragmentação de DNA (Apoptose)	55
5. DISCUSSÃO	57
Benzaldeído canfeno tiossemicarbazonas apresentam atividade citotóxica em células de melanoma humano (SK-Mel-37)	57
Benzaldeído canfeno tiossemicarbazonas apresentam IC ₅₀ baixo	58
Benzaldeído canfeno tiossemicarbazonas induzem a apoptose	61

6. CONCLUSÃO	63
7. PERSPECTIVAS	64
8. BIBLIOGRAFIA	65

1. INTRODUÇÃO

Importância biológica de tiossemicarbazonas

Tiossemicarbazonas (Figura 1) são compostos sintéticos que apresentam inúmeras propriedades biológicas. As atividades antimicrobiana, antiviral, antifúngica e antimalárica têm despertado o interesse da indústria farmacêutica, mas a atividade mais estudada atualmente tem sido a antitumoral. Igualmente importantes, são os complexos formados com tiossemicarbazonas e metais, bem como a descrição de preparação e as atividades biológicas desses compostos (TENÓRIO & GÓES, 2005).



R₁, R₂, R₃ e R₄ = H, Alquil e aril

Figura 1: Fórmula estrutural das tiossemicarbazonas. Apresentam a estrutura básica C=N-NH-CS-NH₂. Os radicais (R) podem ser substituídos, por exemplo, podemos citar R₂= benzaldeído, citronelal, citral; R₄= canfeno, limoneno. (Fonte: TENÓRIO & GÓES, 2005).

Estes compostos são sintetizados por duas diferentes rotas: a obtenção direta pela reação de aldeídos ou cetonas com tiossemicarbazidas (Figura 2) e a obtenção indireta, através da preparação prévia das tiossemicarbazidas utilizando-se hidrazina seguida da condensação com aldeídos ou cetonas (HANG, 2001). Essas reações apresentam baixo custo de síntese, além de grande economia de átomos, uma vez que, com exceção da água que é liberada na sua síntese, todos os outros átomos dos compostos reagentes estarão presentes na molécula final (DU et al., 2002).

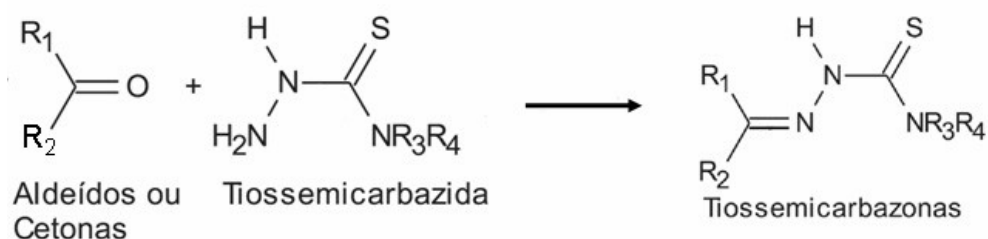


Figura 2: Reação de obtenção direta de tiossemicarbazonas através da reação de aldeídos ou cetonas com tiossemicarbazidas. (Fonte: Adaptado de TENÓRIO & GÓES, 2005).

As tiossemicarbazonas têm sido estudadas há mais de cinquenta anos. Domagk et al. (1948) e Hamre et al. (1950), estudaram a atividade biológica de benzaldeído tiossemicarbazonas como agente anti-tuberculose e mostraram que estes compostos são ativos contra infecções de vírus *vaccinia* e *neurovaccinia*. A partir desses estudos, cada vez mais novas atividades vêm sendo alvos de pesquisas.

Atualmente, algumas tiossemicarbazonas têm sido amplamente estudadas por serem potentes inibidores de ribonucleotídeo redutase (enzima responsável pela manutenção da síntese e reparo do DNA). Dentro deste contexto pode-se ressaltar o efeito do composto 3-aminopiridina-2-carboxaldeído-tiossemicarbazona (Triapina® ou 3-AP) (Figura 3), que quando comparado à hidroxiuréia, substância atualmente em uso clínico no tratamento do câncer, apresenta IC₅₀ (Concentração Inibitória para 50% das células) duas vezes menor em uma linhagem de células humanas (células de carcinoma nasofaríngeo, resistentes a hidroxiuréia) (FINCH, 2000).

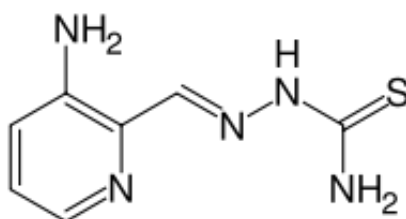


Figura 3: Fórmula estrutural do composto 3-aminopiridina-2-carboxaldeído-tiossemicarbazona (Triapina® ou 3-AP), testado em células de carcinoma nasofaríngeo, apresentando IC₅₀ duas vezes menor que a hidroxiuréia, substância muito utilizada em uso clínico. (Fonte: FINCH, 2000).

Yuan et al. (2004) estudaram tiossemicarbazonas investigando os efeitos antitumoral e o mecanismo de ação desses compostos em fibroblastos humanos (MCR-5), células de neuroepitelioma (SK-N-MC), melanoma humano (SK-Mel-28) e células de câncer de mama (MCF-7). Neste estudo, foram sintetizados sete compostos, dos quais quatro mostraram um pronunciado efeito antiproliferativo, entre eles o composto Dp44mT (di-2-piridilcetona 4-metil-3-tiossemicarbazona) (Figura 4), que apresentou IC₅₀ de 0,03 µM em células de neuroepitelioma.

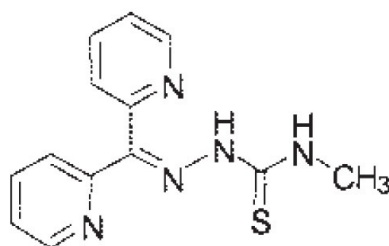


Figura 4: Fórmula estrutural do composto Dp44mT (di-2-piridilcetona 4-metil-3-tiossemicarbazona) testado em células de neuroepitelioma (SK-N-MC) que apresentou IC₅₀ de 0,03 µM. (Fonte: YUAN et al., 2004).

Trabalhos recentes, como o de Dilovié et al. (2008), demonstram a potencialidade antiproliferativa das tiossemicarbazonas frente a diferentes tipos de células neoplásicas *in vitro*. Este estudo avaliou quatro derivados de tiossemicarbazonas, análogos a dois compostos de referência (2-hidróxi-naftaldeído tiossemicarbazona e salicialdeído tiossemicarbazona, Figura 5 A e C), em culturas celulares de HeLa (carcinoma cervical), MCF-7 (câncer de mama), SW620 (carcinoma de cólon), MiaPaCa-2 (carcinoma pancreático) e Hep-2 (carcinoma laringeal), apresentando resultados de ação antiproliferativa com IC₅₀ entre 0,3 µM e 5 µM.

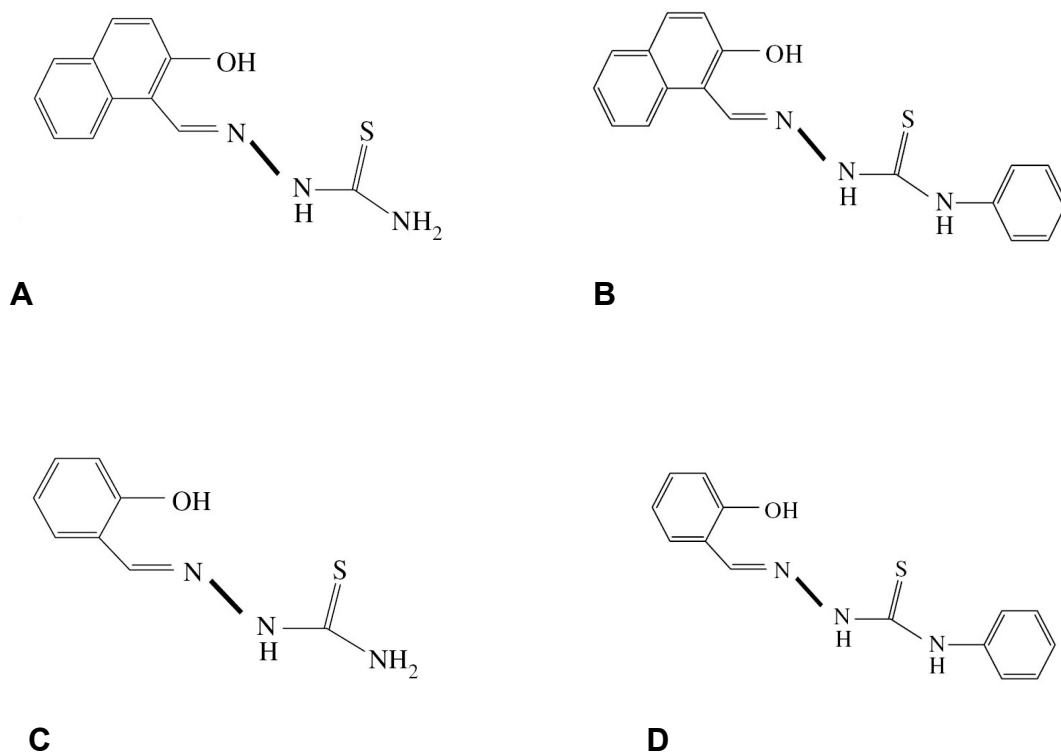


Figura 5: Fórmula estrutural das tiossemicarbazonas estudadas em diferentes linhagens de células neoplásicas *in vitro* com IC₅₀ entre 0,3 μ M e 5 μM. (A) Composto 2-hidróxi-naftaldeído tiossemicarbazona e seu composto análogo (B) 2-hidróxi-naftaldeído- 4-fenil-tiossemicarbazona. (C) Composto salicialdeído tiossemicarbazona e seu composto análogo (D) salicialdeído 4-fenil tiossemicarbazona. Podemos observar as substituições feitas nos compostos A e C no radical **R**₂ de dois anéis benzênicos em (A) e um anel em (C) os dois com a presença de hidroxila. Além da substituição em **R**₂, também temos substituições no radical **R**₄ por outro anel aromático, nos compostos B e D. (Fonte: DILOVIÉ et al., 2008).

Tiossemicarbazonas derivadas de aldeídos naturais como citronelal (Figura 6 A), citral (Figura 6 B) ou uridina (Figura 6 C) e seus respectivos complexos de cobre (II) e níquel (II) foram capazes de inibir o crescimento de células de leucemia humana U937. Complexos de cobre (II) da tiossemicarbazona derivada de ácido α-cetoglutarico induziram apoptose em linhagens de células de leucemia U937 e K562 (FERRARI et al., 2002).

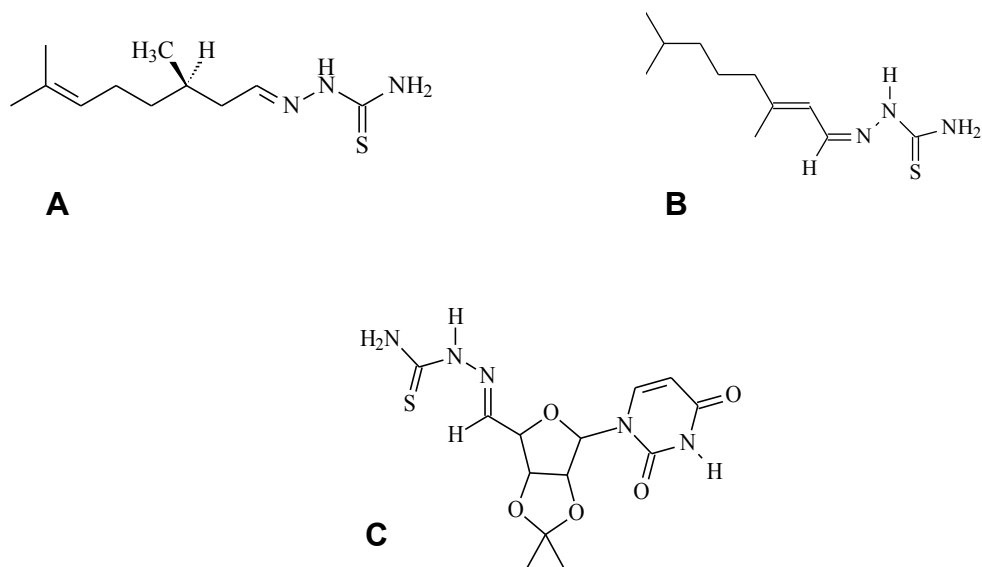


Figura 6: Tiossemicarbazonas derivadas dos aldeídos naturais. Podemos observar a substituição do radical R_2 com as moléculas de aldeídos naturais (A) citronelal, (B) citral e (C) uridina, as quais foram ensaiadas *in vitro* contra células tumorais leucêmicas (U937). (Fonte: FERRARI et al., 2002).

Além da atividade antitumoral, as tiossemicarbazonas vêm sendo testadas pela sua ação antimicrobiana e antifúngica. A ação desses compostos foi estudada por Mendes et al. (2007) em culturas de *Candida albicans* e *Salmonella typhimurium*, apresentando atividade citotóxica *in vitro* e morfológica, na inibição do crescimento desses organismos. As tiossemicarbazonas e seus complexos metálicos também apresentaram ação anti-fúngica frente às culturas de *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *Amathia alternata*, *Paecilomyces variotii* (BERALDO, 2004).

Compostos derivados de benzaldeído canfeno tiossemicarbazonas

Seguindo a estratégia de combinar moléculas ativas para estudar o efeito citotóxico de novas compostos com atividade antitumoral, o grupo de Química Orgânica Sintética do IQ/UFG, em cooperação com pesquisadores do Departamento de Química da UEM (Universidade Estadual de Maringá) sintetizaram uma série de tiossemicarbazonas derivadas do monoterpene natural (-) – canfeno (Figura 7 A), o qual é amplamente encontrado na natureza.

As tiossemicarbazonas, moléculas com amplo perfil farmacológico, apresentam variações estruturais principalmente nos substituintes **R₁** e **R₂** (Figura 1), sendo raras as variações no substituinte **R₄**, e quando ocorrem, geralmente são por grupos alquila (metila, etila) ou arila, não havendo na literatura relatos da presença de grupos terpênicos nesta posição.

Neste estudo foram utilizados compostos inéditos apresentando substituição na posição **R₄** do monoterpene natural canfeno e substituição em **R₂** do grupo benzaldeído com vários substituintes no anel aromático, conforme especificados nas Figuras 7 A e 7 B.

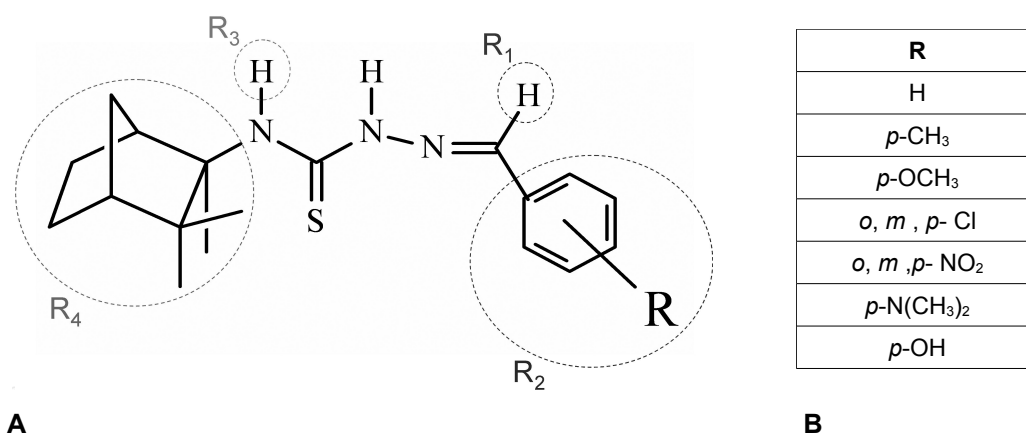


Figura 7: Fórmula estrutural da tiossemicarbazona utilizada neste estudo. (A) estrutura indicando a adição em **R₄** do monoterpene canfeno e em **R₂** do benzaldeído substituído; (B) substituintes do anel benzênico.

Tentando correlacionar os resultados experimentais e a atividade biológica desses novos compostos, foram realizados ensaios de inibição da atividade proliferativa buscando-se elucidar o possível mecanismo de ação. Os compostos foram testados em células de melanoma humano (linhagem SK-Mel-37), contribuindo-se assim para os estudos de novos compostos com atividade sobre esse tipo de câncer.

Avaliação de citotoxicidade *in vitro*

Com o controle cada vez mais rigoroso em relação o 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. De acordo com a Organização Internacional de Padronização (International Standard Organization) o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste de avaliação de compostos, e depois da comprovação da sua toxicidade, o estudo do produto pode ter continuidade realizando-se os ensaios necessários em animais de laboratório. Os testes *in vitro* empregam material vivo, geralmente cultura de células, mas não envolve o uso de animais, exceto como doadores de tecidos ou células.

Os métodos *in vitro* apresentam uma série de vantagens em relação aos métodos *in vivo* tais como: ilimitação do número de variáveis experimentais, obtenção de dados significativos mais facilmente, além do período de testes serem em muitos casos, mais curto. O problema de extrapolação dos dados obtidos *in vitro* para a aplicação clínica pode ser alcançado pelo uso de compostos de referência, atualmente já em uso em clínicas (ROGERO, 2003).

Outras vantagens dos testes *in vitro* são: o uso de células de origem humana, o baixo custo (pois apesar de geralmente precisarem de aparelhos laboratoriais para a sua execução, são mais baratos do que os testes *in vivo*) e o número de réplicas de um mesmo experimento ser maior do que em testes com animais. A simplicidade desses testes também facilita a interpretação e a elucidação dos mecanismos de ação a nível celular e molecular, o que se torna muito complexo no organismo como um todo (GRUBER & HARTUNG, 2004). Estudos com estes métodos 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 (CRUZ et al., 1987; ROGERO, 2000). Seguindo esta estratégia de testes *in vitro*, GANESH et al., (2004) demonstraram, de forma reprodutiva, a ação citotóxica do composto Taxol (derivado de um diterpenóide natural) em culturas de células de câncer de ovário (linhagem A2780).

Para a medida da viabilidade e de proliferação celular, um dos ensaios *in vitro* mais utilizados, tem sido o ensaio de MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). Este ensaio consiste na redução do sal tetrazolium MTT por atividade metabólica celular, em parte por ação de enzimas desidrogenases, presentes na mitocôndria, resultando no formazan, um composto de cor roxa que pode ser solubilizado e quantificado por espectrofotometria (570 nm), Dessa forma, os eventos metabólicos de apoptose ou necrose que levam a uma diminuição na viabilidade da cultura celular, podem ser quantificados. O formazan produzido pelas células está diretamente correlacionado com o número de células viáveis (BERHARD, 2003). Este método é um ensaio 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, 1987). Este tipo de teste *in vitro* representa uma alternativa à pressão imposta pela sociedade contra o uso indiscriminado de animais por indústrias farmacêuticas na busca por novos compostos com atividade antitumoral.

Melanoma cutâneo: origem, incidência e progressão

O melanoma cutâneo pode ser definido como um tumor maligno devido à transformação atípica dos melanócitos. Os melanócitos são células especializadas pela pigmentação e são encontrados predominantemente na pele e nos olhos, onde ocorre a produção de melanina, pigmento responsável pela cor da pele, olhos e cabelos. Na pele, os melanócitos ficam na camada basal da epiderme e nos fios de cabelo, na base dos folículos pilosos (SLOMINSKI et al., 2004). Em resposta à radiação ultravioleta (UV), os queratinócitos secretam fatores de regulação para a sobrevivência, diferenciação, proliferação e movimentação dos melanócitos, provocando o escurecimento da pele (bronzeamento) como resposta ao aumento da produção de melanina. Assim, os melanócitos têm o papel de proteger a pele dos danos causados pela radiação UV. Pessoas com carência funcional dessas células ou doenças pigmentares, como o vitiligo e o albinismo, são hipersensíveis a radiação UV (BOISSY, 1997).

A incidência de melanoma está aumentando nas populações ocidentais, e apesar de representar apenas 3% a 4% dos tumores cutâneos malignos, é o câncer de pele mais agressivo, devido a suas elevadas taxas de metástase e mortalidade. Segundo a Organização Mundial da Saúde, cerca de 2 a 3 milhões de casos de câncer de pele são registrados em todo mundo por ano, e desses casos, 132 mil são da forma mais agressiva, o melanoma. No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (Inca), a estimativa para 2008 é de 115.010 novos casos de câncer de pele, sendo 2.950 novos casos de melanoma em homens e 2.970 novos casos em mulheres. As maiores taxas estimadas encontram-se na região Sul do país.

Recentemente, Hanahan & Weinberg (2000) propuseram que os genes associados ao tumor estariam envolvidos na aquisição de pelo menos uma de seis principais características da célula cancerosa: 1. auto-suficiência nas vias de proliferação celular; 2. resistência a sinais de bloqueio das vias de proliferação; 3. evasão da resposta apoptótica; 4. potencial ilimitado de replicação; 5. indução sustentada de angiogênese e 6. invasão tecidual e metástase.

Clinicamente, a progressão do melanoma dá-se por pequenas máculas pigmentares que progridem para uma lesão caracterizada por variação assimétrica,

bordas irregulares, diversidade de cores e aumento do diâmetro (Figura 8) (VAN DEN OORD. et al., 2007).

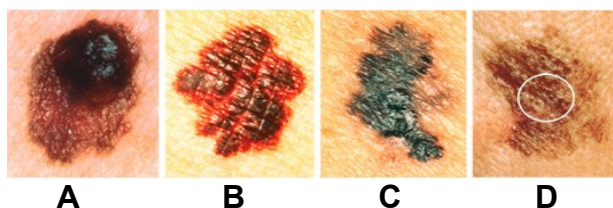


Figura 8: Caracterização do aspecto clínico do melanoma. Observamos (A) variação assimétrica, (B) bordas irregulares, (C) colorações diversas e (D) diâmetro maior que 6mm. (Fonte: Adaptada de INCA, 2008)

Existem quatro subtipos de melanoma (CLARK, 1984): 1. melanoma nodular, que consiste no aumento de nódulos na porção superficial da pele; 2. melanoma lentiginoso acral, que tende a ser encontrado nas palmas das mãos, sola dos pés e no canto das unhas e não é associado com a exposição à radiação UV e é diagnosticado em 50% dos casos em pessoas não caucasianas (KUCHELMEISTER, 2000); 3. melanoma lentigo maligno, que geralmente aparece de forma superficial e ocorre em pessoas de mais idade e é associado pela exposição ao sol durante toda a vida; 4. o melanoma extensivo superficial, que é o tipo mais comum, geralmente superficial, mas com um componente intra-epidermal particularmente nas bordas, está ligado a graves queimaduras de sol e é o terceiro câncer de pele mais comum entre jovens.

Quando o diagnóstico é feito no estágio inicial, o melanoma pode ser curado através de cirurgia em 80% dos casos. O melanoma metastático, entretanto, raramente responde às terapias disponíveis atualmente, com uma taxa de sobrevivência de seis meses a cinco anos após o diagnóstico da doença (CUMMINS et al., 2006). Recentemente, descobertas em sinalização celular têm ajudado a entender melhor o processo de surgimento e progressão do melanoma, permitindo assim a exploração de novos alvos para drogas e novas terapias contra esta neoplasia.

As células de melanoma têm demonstrado pequenos níveis de apoptose espontânea *in vivo* se comparado com outros tipos celulares, e são relativamente resistentes à indução de apoptose *in vitro*. Muitas drogas quimioterápicas que induzem apoptose em células cancerosas em geral, não têm efeitos significativos em melanoma (SOENGAS & LOWE, 2003). Essa resistência à quimioterapia,

radioterapia e imunoterapia tem sido a maior barreira para o sucesso do tratamento do melanoma.

Dentre as drogas usadas como terapia auxiliar para o melanoma podemos citar o Interferon- α , a Interleucina 2 e a Dacarbazida. O mais utilizado é o Interferon- α , empregado como adjuvante na imunoterapia para melanoma em estágio avançado. A Interleucina-2 também tem sido usada, mas a sua toxicidade e pouca resposta ao tratamento têm restringido a sua utilização. A Dacarbazina tem sido o agente quimioterápico de referência para o tratamento de melanoma avançado. Outras drogas, tais como carmustina, paclitaxel (Taxol), temozolomide e cisplatina estão sendo estudados, e têm demonstrado atividade antiproliferativa em testes *in vitro* de melanoma metastático (TARHINI & AGARWALA, 2006).

Vias de morte celular em tumores

Existem basicamente dois tipos de morte celular: apoptose (morte celular programada) e necrose.

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 hipertermia, 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 dos 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, 2007).

Ao contrário disso, a apoptose é uma forma de morte celular planejada, com energia-dependente, ocorrendo de forma sistemática e bem caracterizada por uma sequência de mudanças morfológicas e bioquímicas. Estas mudanças incluem alterações mitocondriais, redução da massa celular, condensação da cromatina, fragmentação nuclear, “*blebbing*” da membrana, ativação de caspases, a presença

de fosfatidilserina na superfície celular e a formação de vesículas membranas denominadas de corpos apoptóticos, como podemos observar na Figura 9. Neste processo ocorre uma interação dinâmica de várias moléculas com propriedades de regulação “*up-stream* e *down-stream*”, os quais dependem do tipo celular e a forma de estresse celular (HUERTA et al., 2007).

O processo apoptótico é fundamental para a eliminação de fatores indesejados, como danos ou infecção por microorganismos na célula. Também é um mecanismo essencial no controle de morte celular e de proliferação de células no desenvolvimento normal do organismo (GHOBRIAL, 2005). Entretanto, a inibição da apoptose pode ocasionar o desenvolvimento de várias doenças, incluindo o câncer, tornando-se um mecanismo bastante abordado em diversas pesquisas para o tratamento dessas patologias.

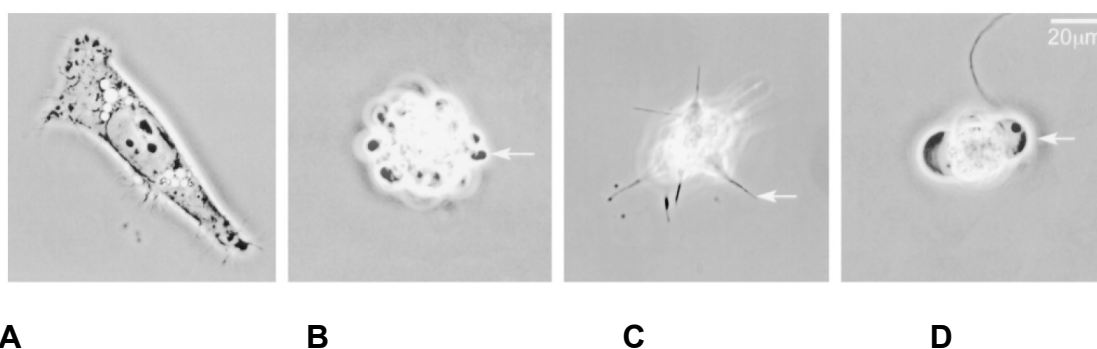


Figura 9: Mudanças morfológicas em células de carcinoma oral humano (linhagem KB) tratadas com ricina, uma substância tóxica que desencadeia apoptose. As imagens mostram as características das células em processo apoptótico em microscópio de contraste de fase. (A) Célula normal; (B) “*blebs*”; (C) “*spikes*” e (D) “*blisters*”. (Fonte: WILLINGHAM, 1999)

Jangi et al. (2006) estudaram o efeito de várias drogas em linhagens celulares de melanoma, entre elas histaminas (H1, H2, H3 e H4), terfenadina (TEF), e astemizol (AST). A TEF e AST induziram a apoptose em células de melanoma humano (linhagem A375) tratadas na concentração de 10 μ M, em oito horas de tratamento (Figura 10).

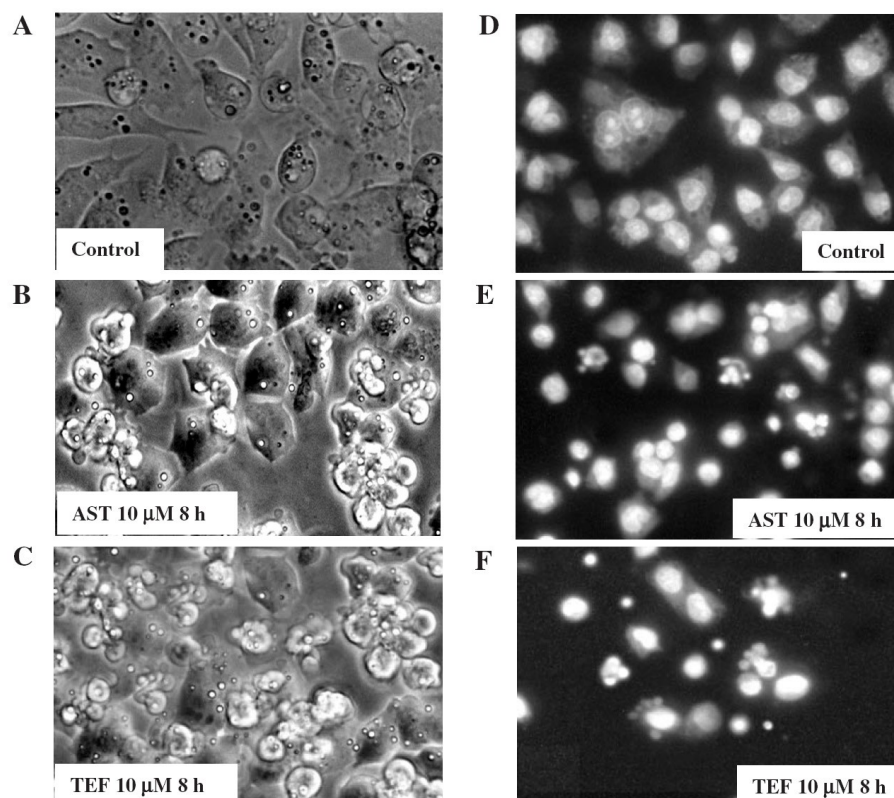


Figura 10 : Mudanças morfológicas características de apoptose induzidas por 10 μ M AST e TEF durante 8 horas de tratamento em células de melanoma (A375). As imagens mostram o arredondamento das células, formação de “*blebs*”, condensação nuclear e fragmentação em resposta ao tratamento. (A-C) Características morfológicas em microscópio de contraste de fase. (D-F) Mudanças nucleares observadas por marcação com Iodeto de Propídio (PI). Aumento 100x. (Fonte: JANGI, 2005).

O processo de apoptose celular envolve vários genes, tais como p53, Bcl-2, Bax, p16, p15, p19, p27, e p57, que desempenham papéis críticos na regulação desse tipo de morte celular programada. Algumas proteínas, produtos destes genes, que regulam a proliferação celular encontram-se ativadas, com seus níveis aumentados, ou reduzidos, no caso de moléculas inibitórias do ciclo celular. As células tumorais escapam à apoptose devido às alterações que ocorrem na regulação de proteínas transcritas por esses genes (WARD, 2002).

A ativação da apoptose é iniciada por dois processos principais: o processo extrínseco ou citoplasmático ativado por receptores de morte celular presentes na superfície da membrana, como por exemplo o Fas, resultando na ativação das caspases 8 e 10, e/ou o processo intrínseco ou mitocondrial, estimulando a liberação do citocromo-c e fatores pró-apoptóticos, por exemplo o Smac/DIABLO, associados

com a ativação da caspase 9 e ativando o sinal de morte. Ambos os processos convergem para um final comum, envolvendo a ativação de uma cascata de proteases chamadas caspases, culminando na morte celular (GHOBRIAL, 2005), esquematizados na Figura 11, a seguir.

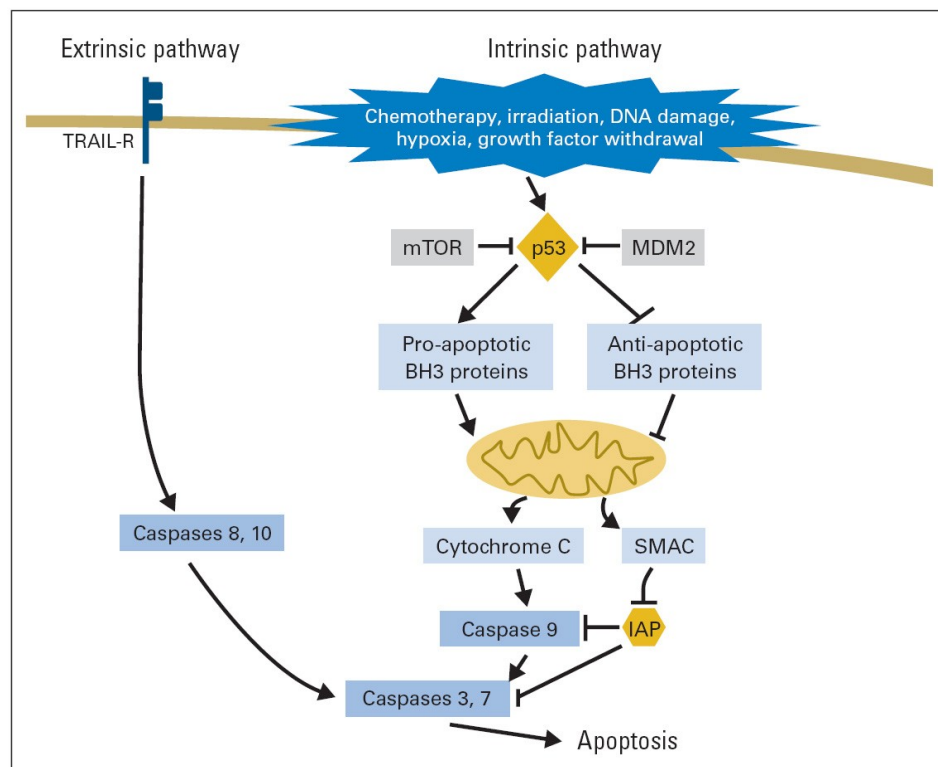


Figura 11: Esquema dos processos intrínseco e extrínseco da apoptose. A ativação extrínseco é mediada pela membrana plasmática e ocorre quando algum ligante, por exemplo, TRAIL-R ou Fas, liga-se ao seu receptor na superfície da membrana, ativando assim as caspases 8, que por sua vez induz a ativação das caspases 3 e 7 e por fim a morte celular por apoptose. Já o processo intrínseco da apoptose, acionada por estresse, por exemplo, quimioterapias, irradiação e danos no DNA, induz a liberação do citocromo c, através da mitocôndria e a caspase 9, que por sua vez induz as caspases 3 e 7 e a morte celular por apoptose. (Fonte: ZIEGLER et al., 2008).

O processo extrínseco (Figura 11) inicia-se na membrana plasmática através de receptores de membranas. Existem seis tipos de receptores de morte caracterizados, como por exemplo, o receptor Fas, membro da superfamília de fatores de necrose tumoral (TNFs), o TNF-R e o TRAIL-R. Cada um desses seis receptores de morte tem um domínio que funciona como uma proteína-ligante de modulação. Seguido pelo recrutamento e sinalização de várias moléculas

adaptadoras, ocorre a clivagem e ativação da iniciação das caspases 8 ou 10, isto conduz a execução das caspases 3, 6 e 7, culminando em fragmentação do DNA (KRAMMER, 2000; WALCZAK, 2000).

O processo intrínseco da apoptose (Figura 11) é ativado pela liberação do citocromo-c da intermembrana mitocondrial no citosol. Uma vez liberado, o citocromo-c interage com Apaf-1, ATP e pro-caspase 9 formando o apoptossomo. O apoptossomo cliva e ativa a caspase 9, ativando as caspases 3, 6 e 7, estimulando a apoptose (HUERTA et al., 2007).

Mecanismo de resistência em cânceres

Para a seleção de compostos com ação anti-neoplásica, os critérios mais utilizados são a inibição da proliferação celular *in vitro* e o indução de morte celular por apoptose em resposta a esses compostos.

O processo de ativação da apoptose pode ocorrer com a ativação de receptores de membrana, como por exemplo o Fas, e a caspase 8, como mediadores da ação citotóxica (GHOBRIAL, 2005). Conseqüentemente, a inibição da apoptose (por uma mutação no gene p53, ou super expressão da Bcl2 ou ainda inibição de caspases) pode ocasionar a resistência a drogas em células de câncer (RINCHEVAL et al., 2002). Desta forma, a resistência a drogas é um problema encontrado no tratamento do câncer, principalmente em melanomas (SOENGAS & LOWE, 2003), câncer de pulmão e de pâncreas (GOTTESMAN et al., 2002).

A resistência a drogas e a desregulação de mecanismos moleculares envolvidos com a apoptose celular são aspectos muito importantes na biologia tumoral. Em virtude destes aspectos influenciarem na eficácia terapêutica, é necessário elucidar os mecanismos moleculares a fim de que, tumores quimiorresistentes como o melanoma, se tornem mais susceptíveis à ativação da morte celular programada (ZHENG et al., 2004). Portanto, a busca por novos quimioterápicos que exerçam sua atividade antitumoral através do mecanismo de apoptose celular deve ser continuamente estimulada.

2. OBJETIVOS

Geral

Avaliar a ação biológica dos compostos derivados de benzaldeído canfeno tiossemicarbazonas em cultura de células de melanoma humano (SK-Mel-37).

Específicos

Utilizando como modelo experimental células de melanoma humano (SK-Mel-37), pretendemos:

- ✓ Elucidar a atividade citotóxica e antiproliferativa dos compostos derivados de benzaldeído canfeno tiossemicarbazonas;
- ✓ Analisar através de microscopia de contraste de fase as mudanças morfológicas tratadas com os diferentes compostos;
- ✓ Avaliar a viabilidade celular através do ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) dos treze derivados de benzaldeído canfeno tiossemicarbazonas apresentados para, bem como obtermos os valores de IC_{50} (Concentração Inibitória para 50% das células);
- ✓ Analisar por microscopia de fluorescência (marcação com iodeto de propídio) e eletroforese em gel de agarose a fragmentação nuclear para tentar elucidar o possível mecanismo de ação de morte celular.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Preparo das principais soluções-estoque

PBS sem Ca^{++} e Mg^{++} (136 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 6,4 mM Na_2HPO_4 , 1,46 mM KH_2PO_4 , pH 7,4): preparada por dissolução de massa adequada em água Milli-Q. Após ajuste do pH, a solução foi autoclavada e mantida a 4 °C até o uso.

PBS com Ca^{++} e Mg^{++} (*Solução A*: 136 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 6,4 mM Na_2HPO_4 , 1,46 mM KH_2PO_4 . *Solução B*: 0,69 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. *Solução C*: 0,49 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). As três soluções foram preparadas por dissolução de massa adequada em água Mili-Q separadamente, o pH foi ajustado para o valor de 7.4 e as soluções foram autoclavadas a 110 °C por 10 minutos. Após o completo resfriamento, as soluções foram misturadas e armazenadas a 4 °C até o uso.

PBS-EDTA (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , 1 mM EDTA, pH 7,2): preparada por dissolução de massa adequada em água Milli-Q. Após ajuste do pH, a solução foi autoclavada e mantida a 4 °C até o uso.

Solução corante de Giemsa: foi dissolvido 1 g de azul de metileno em 54 mL de glicerol, com agitação e aquecimento (60 °C) por 2 horas. Após o completo resfriamento, adicionou-se 84 mL de metanol. A solução foi filtrada e estocada à temperatura ambiente.

Solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT): a solução estoque de MTT (Calbiochem, USA) foi preparada por dissolução de massa adequada em solução PBS sem Ca^{++} e Mg^{++} na concentração de 5 mg/mL e mantido a 4 °C protegido de luz até a utilização.

Solução de Iodeto de Propídeo (PI): a solução estoque de Iodeto de Propídeo (Invitrogen, USA) foi preparada por dissolução de massa adequada em solução PBS sem Ca^{++} e Mg^{++} na concentração de 1 mg/mL e mantido a -20 °C protegido da luz até sua utilização.

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 cm² (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 CO₂ e 37 °C.

As células eram repicadas quando atingiam a confluência, da seguinte maneira: após a remoção do meio, as células eram lavadas duas vezes com solução PBS-EDTA e desprendidas do frasco por ação proteolítica, com uma solução de tripsina (0,25%)-EDTA (1 mM) (Cultilab, Campinas, Brasil).

Determinação dos parâmetros de proliferação celular

O estudo da citotoxicidade dos compostos derivados de benzaldeído canfeno tiossemicarbazonas foi realizado na fase exponencial de crescimento, caracterizado pela duplicação do número de células. Assim, a curva de proliferação foi determinada através de contagens do número de células em diferentes tempos de incubação, com o hemocítômetro.

Para o cálculo do tempo de duplicação (t_d), foi utilizada a seguinte equação (1):

$$N = 2^Z \times N_0$$

onde:

N= número de células ao final do período de incubação

N₀= número de células no início da semeadura

Z= número de gerações, sendo que:

$$Z = \frac{T(\text{horas})}{t_d (\text{tempo de duplicação})}$$

onde, T= tempo total de incubação.

Desse modo, a taxa de crescimento está relacionada com o número de gerações que ocorrem por unidade de tempo numa cultura em crescimento exponencial. De fato, quanto maior a taxa de crescimento, mais rapidamente se divide a população, maior é o número de gerações que ocorrem no mesmo período de tempo e menor é o tempo de duplicação de cada geração. Então tempo de duplicação é (t_d) é dado pela equação (3):

$$t_d = \frac{T}{Z}$$

Compostos derivados do benzaldeído canfeno tiossemicarbazona

A síntese dos treze compostos derivados do benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, utilizados neste estudo, foi realizada pelo grupo de Química Orgânica Sintética do IQ/UFG, em cooperação com pesquisadores do Departamento de Química da UEM (Universidade Estadual de Maringá). Os detalhes da rota sintética são descritos por Silva et al., 2005.

Todos os compostos foram inicialmente solubilizados em 10 µL de DMSO, seguindo-se da adição de etanol absoluto para a obtenção da concentração estoque de 20 mM. A partir dessa solução, preparamos uma série de concentrações através de diluições seriadas (1:1) da solução-estoque em etanol absoluto. As novas concentrações 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 das canfeno tiossemicarbazonas utilizadas neste estudo são apresentadas na tabela a seguir:

Tabela 1: Peso molecular, fórmula química e estrutural dos compostos derivados de benzaldeído canfeno tiossemicarbazonas.

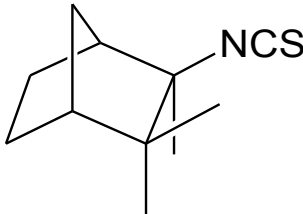
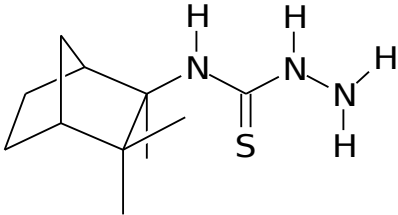
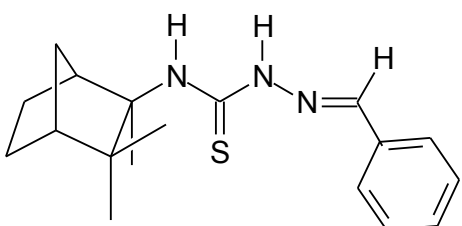
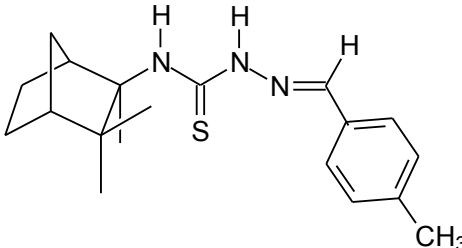
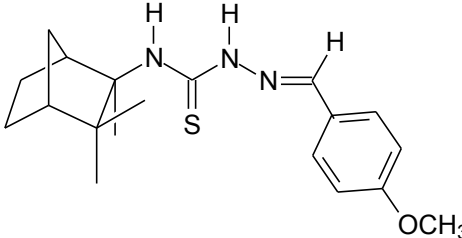
Nome: isotiocianato canfeno Fórmula Molecular: $C_{10}H_{15}NS$ Massa Molar (g/mol): 181,09	
Nome: canfeno tiossemicarbazida Fórmula Molecular: $C_{10}H_{19}N_3S$ Massa Molar (g/mol): 227,371	
Nome: benzaldeído canfeno tiossemicarbazona Fórmula Molecular: $C_{17}H_{22}N_3S$ Massa Molar (g/mol): 315,477	
Nome: <i>p</i>-metil benzaldeído canfeno tiossemicarbazona Fórmula Molecular: $C_{18}H_{27}N_3S$ Massa Molar (g/mol): 329,504	
Nome: <i>p</i>-metóxi benzaldeído canfeno tiossecarbazona Fórmula Molecular: $C_{19}H_{27}N_3SO$ Massa Molar (g/mol): 345,503	

Tabela 1 (continuação): Peso molecular, fórmula química e estrutural dos compostos derivados de benzaldeído canfeno tiossemicarbazonas.

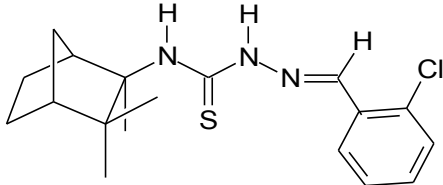
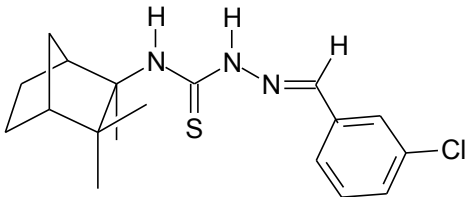
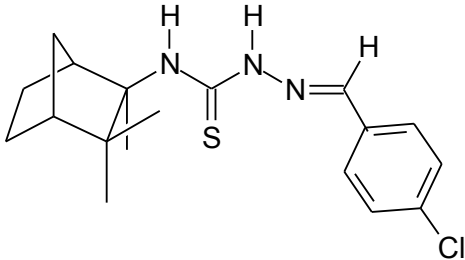
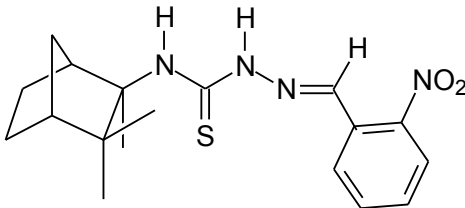
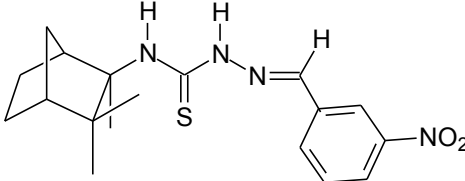
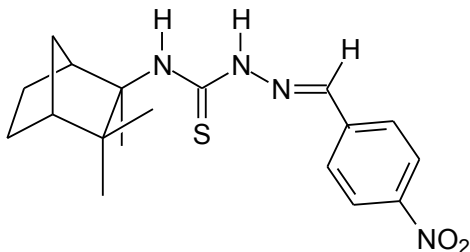
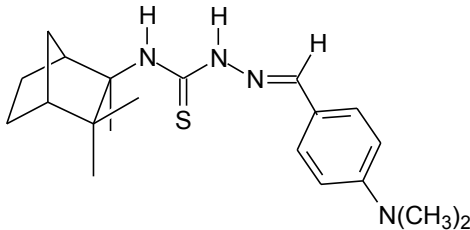
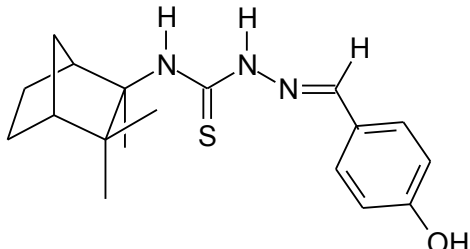
Nome: <i>o</i>-cloro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona Fórmula Molecular: C₁₇H₂₂ClN₃S Massa Molar (g/mol): 349,922	
Nome: <i>m</i>-cloro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona Fórmula Molecular: C₁₇H₂₂ClN₃S Massa Molar (g/mol): 349,922	
Nome: <i>p</i>-cloro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona Fórmula Molecular: C₁₇H₂₂ClN₃S Massa Molar (g/mol): 349,922	
Nome: <i>o</i>-nitro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona Fórmula Molecular: C₁₈H₂₄N₃SNO₂ Massa Molar (g/mol): 360,475	
Nome: <i>m</i>-nitro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona Fórmula Molecular: C₁₈H₂₄N₃SNO₂ Massa Molar (g/mol): 360,475	

Tabela 1 (continuação): Peso molecular, fórmula química e estrutural dos compostos derivados de benzaldeído canfeno tiossemicarbazonas.

Nome: <i>p</i>-nitro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona Fórmula Molecular: C₁₈H₂₄N₃SNO₂ Massa Molar (g/mol): 360,475	
Nome: <i>p</i>-dimetilamino benzaldeído canfeno tiossemicarbazona Fórmula Molecular: C₂₀H₃₀N₄S Massa Molar (g/mol): 358,545	
Nome: <i>p</i>-hidróxi benzaldeído canfeno tiossemicarbazona Fórmula Molecular: C₁₈H₂₅N₃OS Massa Molar (g/mol): 331,477	

Avaliação do potencial citotóxico dos derivados de tiossemicarbazona

Com a obtenção da curva de crescimento exponencial e o cálculo do tempo de duplicação das células, foi possível acompanhar o efeito do tratamento das células com os compostos estudados, lembrando que as células permaneciam em crescimento exponencial durante todo o período do tratamento.

A fim de pré-selecionarmos apenas os compostos com atividade antiproliferativa significativa, na concentração máxima de 100 µM, realizamos inicialmente uma seleção visual do efeito do tratamento na cultura celular. Para isso,

analisamos o grau de desprendimento das células do fundo do frasco, fato indicativo da citotoxicidade do tratamento. Neste procedimento as células de melanoma (SK-Mel-37) foram semeadas em placas de Petri de 8,8 cm² (Nunc Brand Products, USA) e tratadas com uma concentração constante de 100 µM de cada composto. Após 24 horas ou 48 horas de incubação, as placas foram diretamente observadas ao microscópio óptico. Os compostos que provocaram visualmente 85% ou mais de desprendimento das células, foram selecionados para os experimentos de análise morfológica, viabilidade celular, e determinação do perfil de fragmentação de DNA.

Análise morfológica

Para estes experimentos, as células foram semeadas em placas de 8,8 cm² de área e, no dia seguinte, foram tratadas com os diversos compostos na concentração única de 50 µM. Esta concentração foi escolhida com base nos resultados de viabilidade celular. Após 24 horas de tratamento adicionou-se metanol absoluto gelado na proporção 1:1 ao meio de cultura, incubando-se por 10 minutos à temperatura ambiente. Com o término do período de incubação, o meio foi retirado e acrescentou-se a solução corante de Giemsa, suficiente para cobrir a placa, incubando-se por 30 minutos à temperatura ambiente. A seguir, a solução foi removida e as células foram lavadas com tampão PBS, observadas e fotografadas ainda úmidas em microscópio óptico.

Avaliação de viabilidade celular (ensaio de MTT)

Após a seleção visual dos compostos que provocaram o desprendimento de mais de 85% das células, como descrito acima, procedemos à avaliação da viabilidade celular através do ensaio de MTT. Este ensaio baseia-se na medida da atividade da enzima desidrogenase mitocondrial, a qual é capaz de metabolizar o reagente brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (conhecido como MTT) em um composto colorido denominado formazan (de cor roxa). Este ensaio foi originariamente proposto por MOSMANN (1996) e tem sido ligeiramente modificado no sentido de estabilizar a solução do formazan. Em nosso laboratório, o melhor

solvente para a solubilização do formazan e estabilidade dessa solução foi o metanol, como veremos a seguir. O ensaio se baseia na proporcionalidade entre o número de células e a absorvância do formazan.

Para este ensaio, as células foram cultivadas em placas de 24 poços. O número de células semeadas foi calculado de tal forma que as células atingissem a confluência ao término de 100 horas. Após 24 horas da semeadura (tempo suficiente para adesão das células ao fundo do frasco), as células foram tratadas com diferentes concentrações dos derivados de benzaldeído canfeno tiossemicarbazonas, através da adição direta ao meio de cultura, das soluções-estoque previamente preparadas e descritas anteriormente. As concentrações finais foram: 3,125 μ M, 6,25 μ M, 12,5 μ M, 25 μ M, 50 μ M e 100 μ M em triplicatas. Utilizamos dois tipos de controles: em um deles, adicionamos o solvente empregado na diluição das drogas (DMSO/etanol) e em outro controle, nenhum tipo de droga ou solvente foi adicionado. Os controles também foram analisados em triplicatas.

A seguir, as células foram incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ por 24, 48 e 72 horas. Ao término de cada período de incubação, acrescentou-se 50 μ L da solução-estoque de MTT (Calbiochem, USA) diretamente ao meio de cultura, incubando-se novamente por 1 hora e 30 minutos a 37 °C e 5% de CO₂. Após esses procedimentos, o meio foi totalmente descartado, acrescentando-se 300 μ L de metanol gelado (Vetec) para a solubilização do formazan formado. Alíquotas de 100 μ L foram transferidas para uma placa de 96 poços, seguindo-se a leitura da absorvância a 570 nm 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 IC₅₀ (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). Os valores de absorvância obtidos no tratamento com os compostos (A), foram normalizados 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.

Análise por microscopia de fluorescência

As células de melanoma (SK-Mel-37) foram semeadas em placas de Petri de 8,8 cm² 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 os compostos estudados, apenas na concentração única de 100 µM. Após 4 horas de tratamento, adicionou-se uma solução de iodeto de propídio (PI) (Invitrogen, USA) diretamente ao meio de cultura. As células foram mantidas vivas e foram monitoradas e fotografadas em microscópio invertido de fluorescência (Eclipse TE 2000S, NIKON) com o filtro apropriado, ao longo das 20 horas restantes da seguinte forma: no momento da adição do corante, 8 horas ou 24 horas após o tratamento das células.

Análise da fragmentação do DNA

As células de melanoma humano (SK-Mel-37) foram semeadas em placas de Petri (Nunc, USA) de 64 cm² de área. Após a confluência total da placa, foram tratadas com uma única concentração de 100 µM (a mesma concentração utilizada para a seleção visual, descrita anteriormente) e esperou-se desprendimento total das células (morte celular). As células foram recolhidas em tubos *ependorfs* e lavadas com PBS sem Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺ (três vezes). A seguir, acrescentou-se 30 µL de uma solução de SDS 0,5% (sulfato de dodecil sódico) e 400 µL de uma solução de homogeneização (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 0,5% Triton X-100). O extrato celular foi tratado com 2 µL de uma solução de RNase (100 µg/mL, Sigma) incubando-se por 30 minutos e logo a seguir com 2 µL de uma solução de proteinase (200 µg/µL, Sigma) incubando-se por mais 30 minutos a 37 °C em banho-maria. Ao lisado celular acrescentou-se 400 µL de solução fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) (Sigma-Aldrich, USA) seguido da centrifugação por 30 minutos a 12000 rpm (rotações por minuto) em centrífuga refrigerada.

A solução aquosa contendo o DNA (camada superior) foi retirada e transferida para outro tubo *ependorf*, no qual se acrescentou volume correspondente a 1/10 do volume da solução aquosa, de NaCl 5 M e 2 volumes de etanol absoluto gelado para

a precipitação do DNA. Os tubos foram mantidos a -20 °C por 12 horas para facilitar a precipitação do DNA.

A seguir, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 30 minutos, descartando-se a seguir o sobrenadante. Para remoção dos sais, o precipitado foi incubado com 500 µL de etanol 70% por 10 minutos à temperatura ambiente. Após centrifugação a 12000 rpm por 30 minutos, o sobrenadante foi descartado e o material precipitado foi deixado à temperatura ambiente para secagem do etanol residual. Após completa secagem, adicionou-se 30 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl e 50 mM EDTA) incubando-se *overnight* à temperatura ambiente para completa solubilização do DNA.

Para a visualização da fragmentação do DNA, o material foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2% contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL). Utilizou-se o marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen, USA). As bandas foram visualizadas em transluminador UV e fotografadas com câmera digital e filtro adequado.

4. RESULTADOS

Pré-seleção dos compostos

A determinação do tempo de duplicação de uma linhagem em cultura é um passo importante em estudos envolvendo o efeito de drogas na viabilidade celular, pois permite determinar com precisão o momento em que a cultura atingirá a confluência no frasco de cultivo. Também é possível garantir que as células permaneçam em contato com a droga apenas durante seu crescimento exponencial, tornando o tratamento mais efetivo.

O valor do tempo de duplicação (t_d) é facilmente obtido aplicando-se a equação 1, descrita em Material e Métodos. Assim, concluímos que o tempo de duplicação das células de melanoma humano (SK-Mel-37) é de aproximadamente 30 horas.

A observação visual do efeito citotóxico foi uma análise preliminar aos ensaios de MTT (determinação do valor do IC_{50}) para selecionar, de forma rápida, os compostos que apresentaram atividade anti-proliferativa na concentração máxima de 100 μ M. Assim, se ao final de no máximo 48 horas de incubação com a droga, na concentração máxima, não se observou o desprendimento das células do fundo das placas, o composto não foi selecionado para a próxima etapa que envolve a determinação do valor de IC_{50} .

Este procedimento simplifica bastante o estudo envolvendo um grande número de compostos a serem avaliados, pois permite descartar com base na visualização do desprendimento das células, aqueles compostos que não apresentam potencial antiproliferativo significativo. De acordo com o U.S. National Cancer Institute, apenas compostos de extratos naturais com valor de IC_{50} igual ou menor do que 50 μ g/mL (aproximadamente 150 μ M), merecem ser submetidos a análises de citotoxicidade mais detalhadas (MANS et al., 2000).

Dentre os treze compostos (ver Tabela 1) derivados de benzaldeído canfeno tiossemicarbazonas estudados, apenas seis provocaram o desprendimento total das células do fundo do frasco na concentração de 100 μ M. Quatro desses compostos causaram esse efeito em apenas 24 horas de incubação (Figura 12 E, I, L e O). O efeito só foi visível após 48 horas para o composto N (Figura 13) e após 72 horas para o composto G (dados não mostrados). O aspecto das culturas ao final de 72

horas de tratamento permaneceu idêntico ao mostrado para 48 horas, à exceção do composto *p*-metóxi benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, por isso não foi apresentado.

Observamos que células não tratadas (Figuras 12 A e 13 A) ou tratadas apenas com o solvente DMSO/etanol (Figuras 12 B e 13 B) apresentam-se aderidas à placa de cultura, bem distribuídas e com prolongamentos irregulares em várias direções, aspectos característicos do melanoma (SK-Mel-37) em cultura. Ao contrário, as células tratadas com compostos que induziram citotoxicidade (Figuras 12 E, I, L, O , 13 G e N) apresentam-se arredondadas e em suspensão no meio de cultura, indicando intensa morte celular.

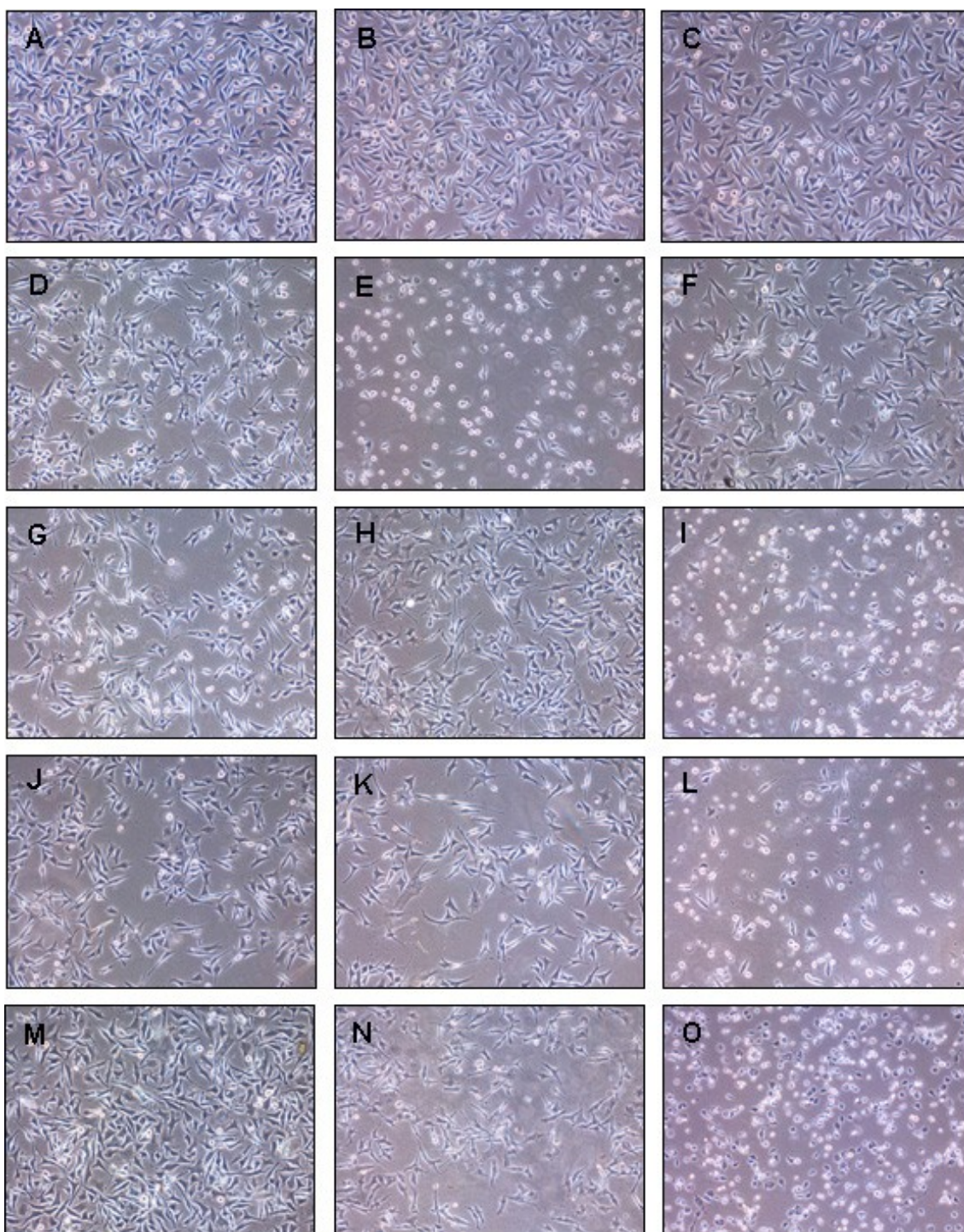


Figura 12: Pannel do aspecto visual da cultura de células de melanoma SK-Mel-37 após 24 horas de tratamento com uma concentração de 100 μ M dos diversos derivados de tiossemicarbazonas estudados: (A) Controle, (B) DMSO/etanol, (C) isotiocianato canfeno, (D) canfeno tiossemicarbazida, (E) benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, (F) *p*-metil benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, (G) *p*-metóxi benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, (H) *o*-cloro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, (I) *m*-cloro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, (J) *p*-cloro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, (K) *o*-nitro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, (L) *m*-nitro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, (M) *p*-nitro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, (N) *p*-dimetilamino benzaldeído canfeno tiossemicarbazona e (O) *p*-hidróxi benzaldeído canfeno tiossemicarbazona. As células foram observadas e fotografadas com microscópio óptico invertido no próprio frasco de cultivo. Ampliação 100x.

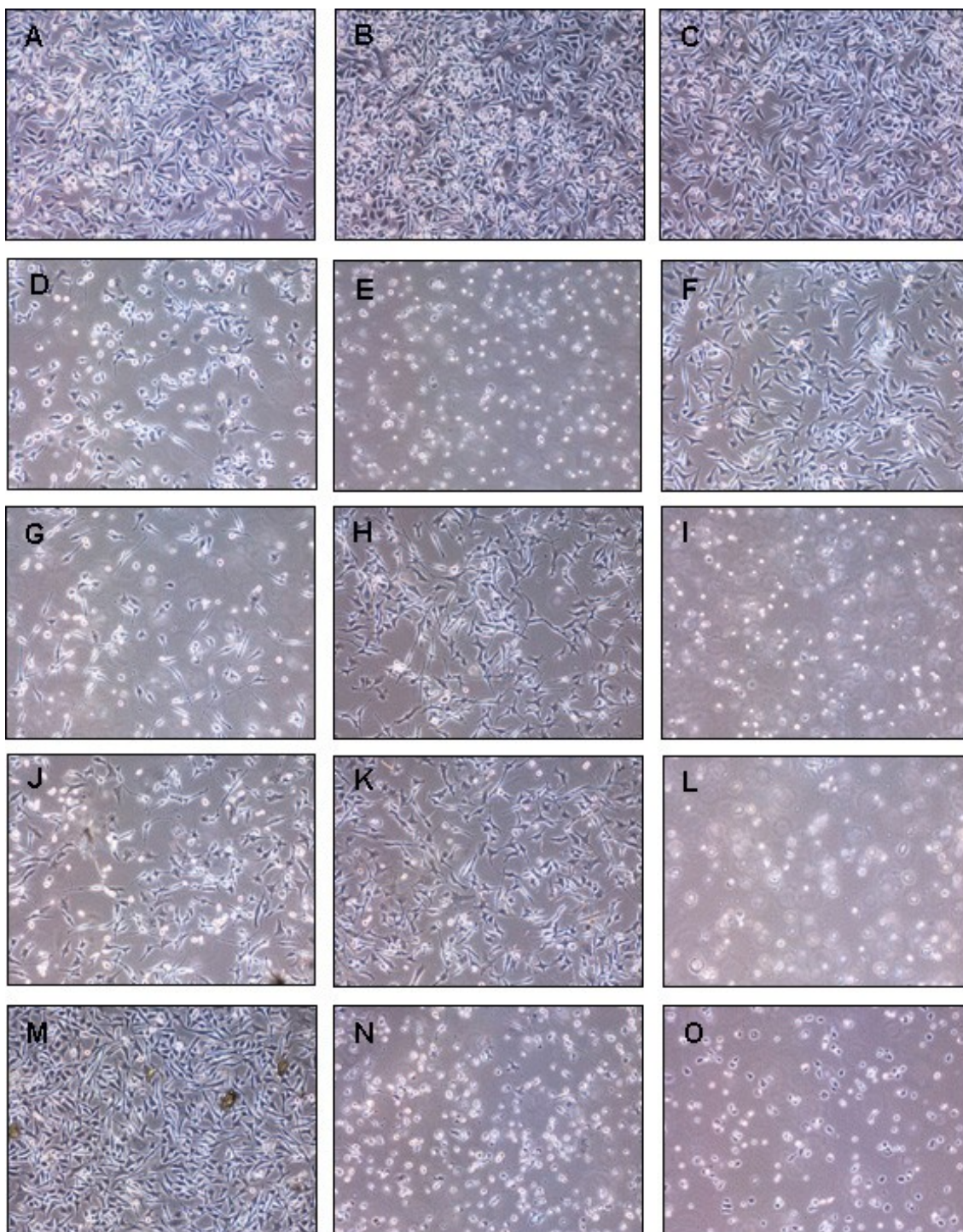


Figura 13: Paineis do aspecto visual da cultura de células de melanoma SK-Mel-37 após 48 horas de tratamento com uma concentração de 100 μ M dos diversos derivados de tiossemicarbazonas estudados: (A) Controle, (B) DMSO/etanol; (C) isotiocianato canfeno, (D) canfeno tiossemicarbazida, (E) benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, (F) *p*-metil benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, (G) *p*-metóxi benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, (H) *o*-cloro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, (I) *m*-cloro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, (J) *p*-cloro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, (K) *o*-nitro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, (L) *m*-nitro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, (M) *p*-nitro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, (N) *p*-dimetilamino benzaldeído canfeno tiossemicarbazona e (O) *p*-hidróxi benzaldeído canfeno tiossemicarbazona. As células foram observadas e fotografadas com microscópio óptico invertido no próprio frasco de cultivo. Ampliação 100x.

Análise morfológica

Para melhor visualização dos efeitos provocados pelos diferentes compostos selecionados, aumentamos a ampliação microscópica para 400x e os resultados são apresentados na Figura 14, a seguir. Assim, alterações morfológicas nas células, em relação ao controle, e mudanças citoplasmáticas associadas a apoptose ficaram mais evidentes. Observamos alterações no citoesqueleto (Figura 14 D e E), prolongamentos dendríticos muito acentuados (Figura 14 D e E), presença de vacúolos (Figura 14 B, C e D) e fragmentação nuclear (Figura 14 F), indicando a ação de processos apoptóticos.

A fim de acompanharmos ao longo do tempo os efeitos provocados pelo tratamento, as células foram tratadas com benzaldeído canfeno tiossemicarbazona na concentração de 50 μ M e os efeitos analisados em microscópio óptico após 6 e 8 horas de incubação. Observamos assim, o aparecimento de pequenos vacúolos e fragmentação dos núcleos (indicativo de morte celular por apoptose) em apenas 6 horas de tratamento (Figura 15 A, B e C). Estes efeitos ficaram mais pronunciados após 8 horas de tratamento (Figura 15 D, E e F) com o aumento da vacuolização e aumento no número de células apresentando fragmentação nuclear.

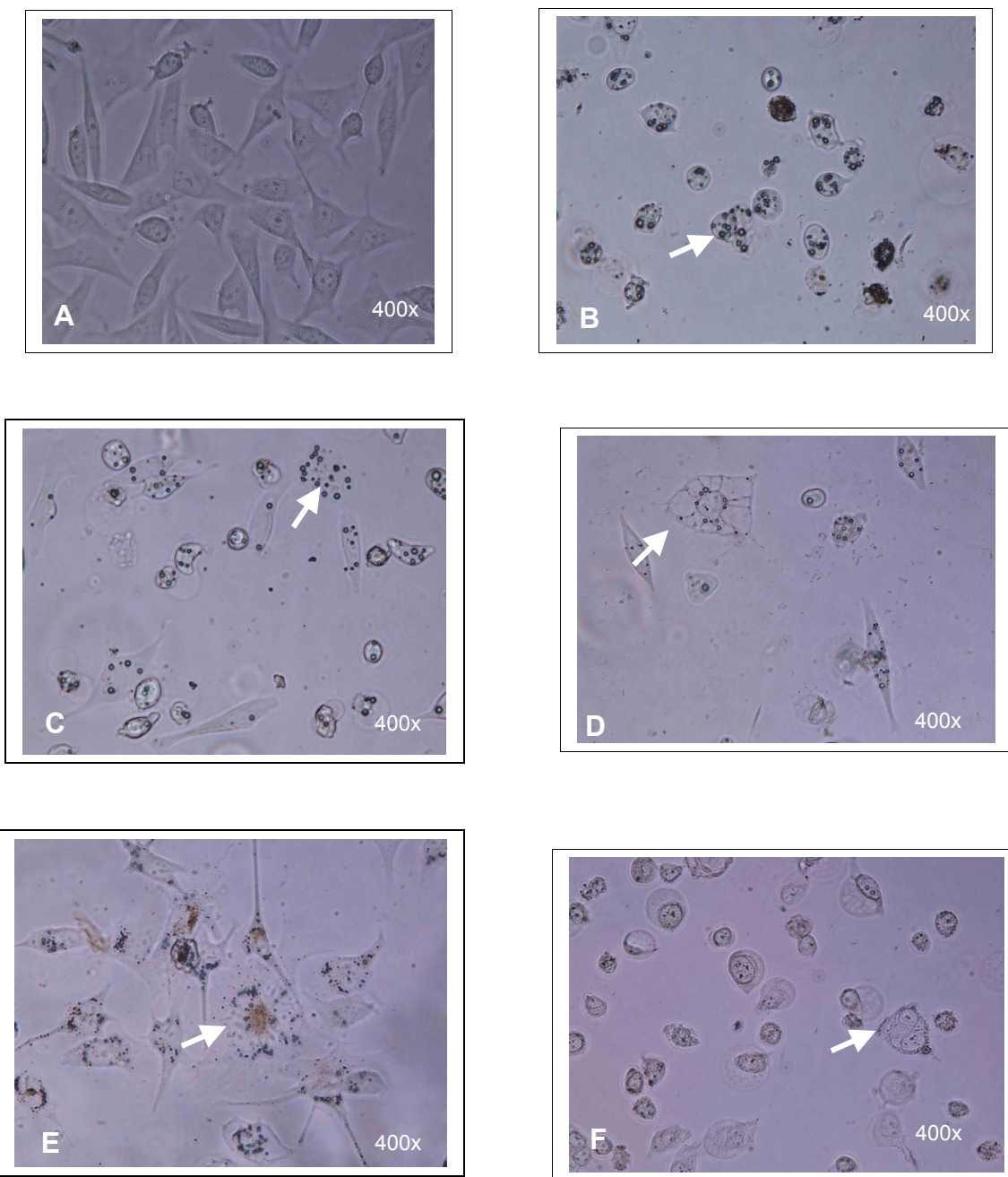


Figura 14: Aspecto morfológico de células de melanoma SK-Mel-37 em cultura tratadas por 24 horas na concentração de 100 μ M com derivados de benzaldeído canfeno tiossemicarbazonas. Podemos observar alterações no citoesqueleto, na morfologia celular e intensa vacuolização (setas). (A) Controle, (B) benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, (C) *m*-cloro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, (D) *m*-nitro-benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, (E) *p*-dimetilamino benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, (F) *p*-hidróxi benzaldeído canfeno tiossemicarbazona.

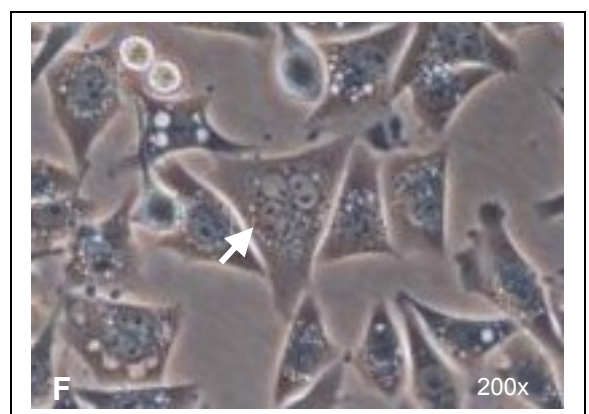
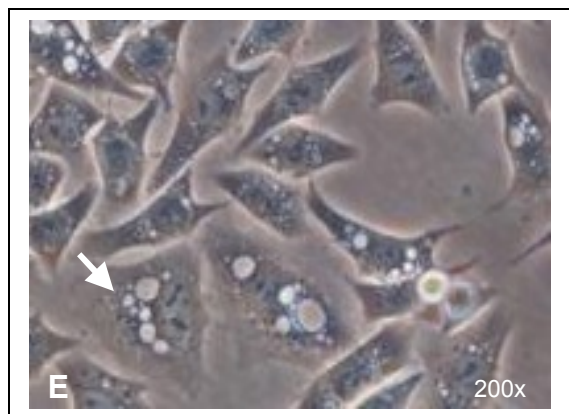
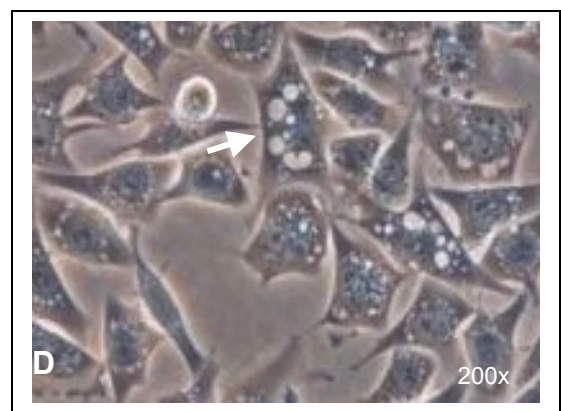
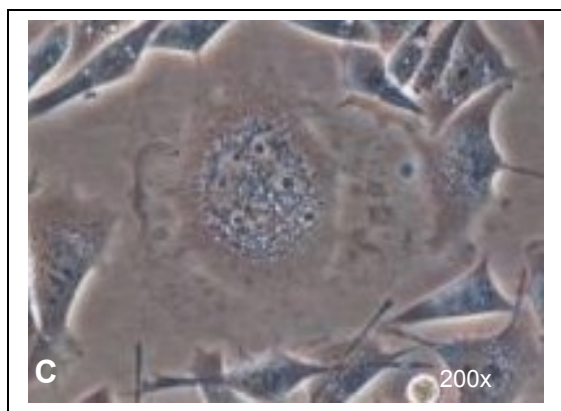
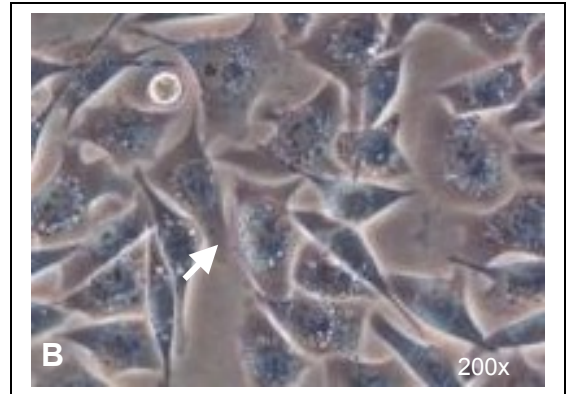
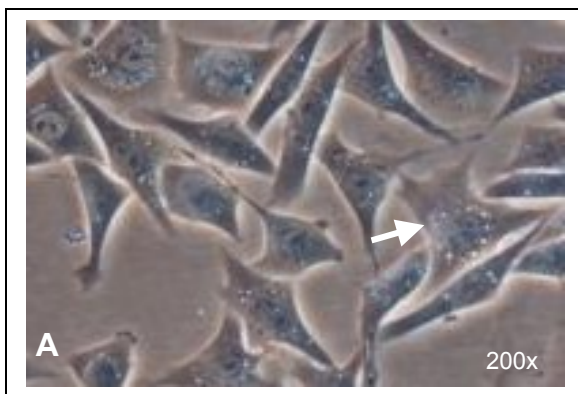


Figura 15: Aspecto morfológico de células de melanoma humano (SK-Mel-37), tratadas com 50 μ M de benzaldeído canfeno tiossemicarbazona. Após 6 horas de tratamento observa-se a formação de vacúolos que se concentram ao redor do núcleo (A e B) e fragmentação do núcleo (C). Ao final de 8 horas de tratamento o número e o tamanho dos vacúolos aumentam (D, E, F).

A fixação das células e coloração com Giemsa é uma técnica citoquímica que permite a estocagem do material para análises futuras e por isso decidimos utilizá-la para melhor avaliação dos resultados que observamos por ocasião da seleção visual, onde as células não foram coradas.

A título de simplificação, apresentaremos apenas os resultados do tratamento das células com o derivado benzaldeído canfeno tiossemicarbazona. As células foram tratadas com uma concentração de 50 μM por 24 horas e fixadas para coloração citoquímica com o corante de Giemsa. As células foram observadas ao final da coloração com microscópio óptico invertido. As placas foram estocadas indefinitivamente a 4 °C e protegidas da luz com papel alumínio para observações futuras. Os resultados podem ser vistos na Figura 16, a seguir.

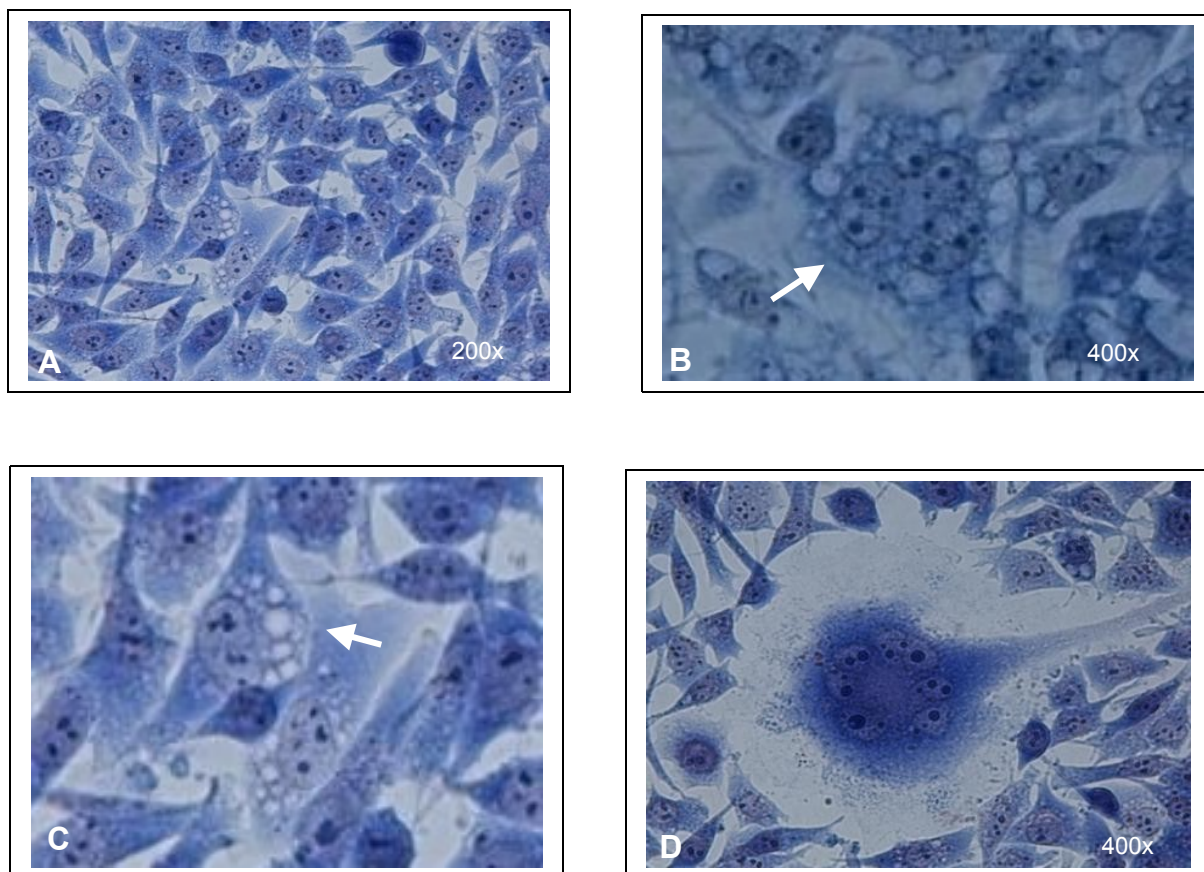


Figura 16: Células de melanoma humano da linhagem celular SK-Mel-37 tratadas por 24 horas com 50 μM de benzaldeído canfeno tiossemicarbazona. Ao final do tratamento, as células foram fixadas com metanol e coradas com solução de Giemsa, segundo descrito em Material e Métodos. (A) Aspecto geral da cultura celular em pouco aumento. (B) Intensa vacuolização e fragmentação nuclear (seta). (C) detalhe dos vacúolos ao redor do núcleo (seta). (D) fragmentação nuclear e colapso da membrana plasmática.

A análise das células coradas evidenciou, mais uma vez, intensa vacuolização e fragmentação nuclear. A concentração de 50 μM foi utilizada neste experimento para que as células não estivessem totalmente desprendidas do fundo da placa.

Determinação da concentração inibitória (IC_{50})

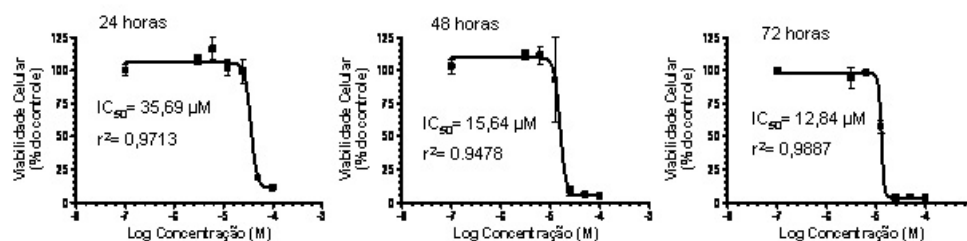
A determinação do valor de IC_{50} é uma etapa importante em estudos de citotoxicidade. Após a seleção visual dos compostos que provocaram o desprendimento das células na concentração de 100 μM , realizamos os ensaios de MTT, conforme descrito em Materiais e Métodos. Neste estudo as células foram submetidas a concentrações variadas dos compostos, para a determinação da concentração que provoque morte significativa em 50% do total de células. Esse valor de concentração é chamado de IC_{50} . Assim, quanto menor o valor de IC_{50} (na faixa de micromolar) mais citotóxica é a substância, e as chances de futuramente ser empregada terapeuticamente são grandes. Por exemplo, o taxol, a cisplatina e a doxorrubicina, apresentam valores de IC_{50} de 4 nM (GANESH, 2004), 56 μM (MENDES, 2007) e 15,1 μM (VAN BRACKEL, 2008), respectivamente e hoje são intensamente usados clinicamente no tratamento de diversos tipos de cânceres.

O ensaio de MTT foi realizado com seis concentrações diferentes (3,125 μM , 6,25 μM , 12,5 μM , 25 μM , 50 μM e 100 μM) dos compostos previamente selecionados. Os valores de absorvância foram obtidos diretamente do leitor de microplacas no comprimento de onda de 570 nm, que corresponde ao pico de absorção máxima do produto formazan. Para o cálculo de porcentagem da viabilidade celular, os valores da absorvância obtidos com o tratamento das células foram normalizados pelo valor da absorvância das células tratadas apenas com solvente (conforme descrito em Materiais e Métodos).

O valor do IC_{50} foi obtido através do cálculo de regressão não-linear das curvas obtidas nos gráficos de Porcentagem da viabilidade *versus* logaritmo da concentração molar dos compostos estudados. Os gráficos foram construídos com o programa GraphPad Prism, versão 4.00 para Windows, da GraphPad Software, San Diego, USA, (www.graphpad.com), e são apresentados na Figura 17, a seguir.

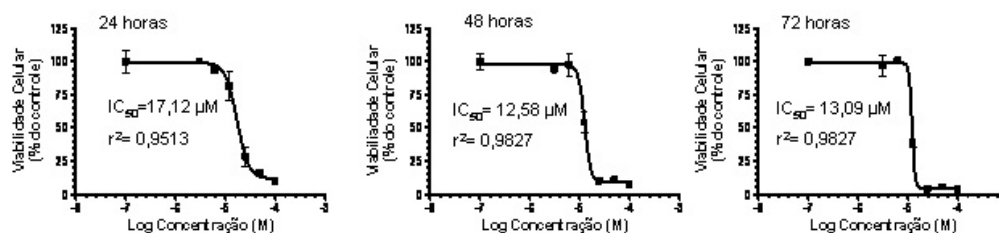
A

Benzaldeído canfeno tiossemicarbazona



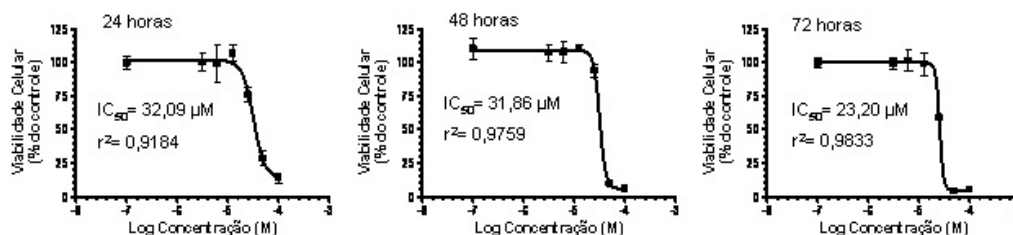
B

m-cloro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona



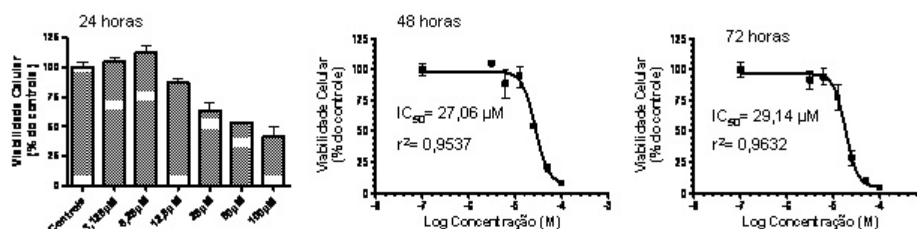
C

m-nitro benzaldeído tiossemicarbazona



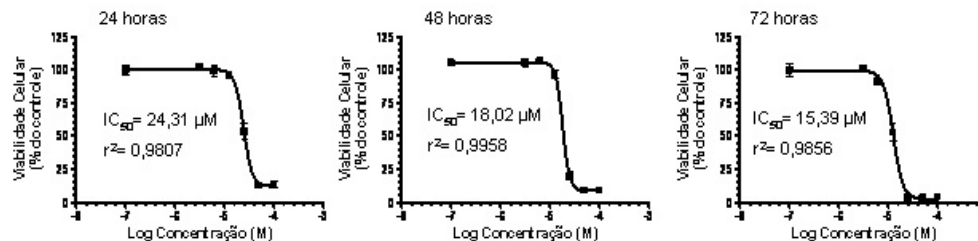
D

p-dimetilamino benzaldeído tiossemicarbazona



E

p-hidróxi benzaldeído tiossemicarbazona



F

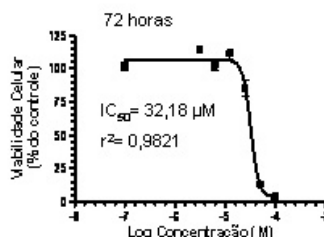
p-metóxi benzaldeído canfeno tiossemicarbazona

Figura 17: Gráfico dose-resposta do tratamento das células de melanoma humano SK-Mel-37 por 24, 48 e 72 horas, com diferentes concentrações dos compostos pré-selecionados visualmente por desprendimento das células do fundo do frasco. Os valores da absorvância obtidos com o tratamento das células foram normalizados pelo valor da absorvância das células tratadas apenas com solvente (conforme descrito em Materiais e Métodos). (A) benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, (B) *m*-cloro-benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, (C) *m*-nitro-benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, (D) *p*-dimetilamino-benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, (E) *p*-hidróxi-benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, (F) *p*-metóxi benzaldeído canfeno tiossemicarbazona. O valor do IC₅₀ apresentado foi obtido por regressão não-linear da curva obtida utilizando-se o programa GraphPad Prism e representa a média ± desvio padrão de três experimentos independentes realizados em ocasiões diferentes.

O composto *p*-dimetilamino benzaldeído canfeno tiossemicarbazona não apresentou citotoxicidade significativa em 24 horas, atuando apenas em 48 horas (comparar aspectos visuais nas Figuras 12N e 13N), por esta razão na Figura 17 D acima, foi apresentado um gráfico de barras para o tempo de 24 horas de incubação, observando-se que os valores de IC₅₀ só foram obtidos para 48 e 72 horas de incubação. Outra exceção foi o composto *p*-metóxi benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, cuja ação em 24 horas não foi significativa (ver aspectos visuais nas figuras 12G e 13G). Por essa razão é que apenas apresentamos o gráfico de porcentagem *versus* concentração na Figura 17 F acima, a partir do qual se obteve um valor de IC₅₀ em 48 horas.

Como vemos na Figura 17, foi possível obtermos valores de IC₅₀ para 24 e 48 e 72 horas de tratamento para os compostos pré-selecionados visualmente. Os resultados são apresentados nas Tabelas 2 e 3, a seguir.

Afim de compararmos os valores de IC₅₀ dos compostos estudados com o de uma substância utilizada clinicamente, decidimos utilizar como controle positivo a doxorrubicina. Realizamos o ensaio de MTT e o valor obtido foi de 34,13 µM.

Tabela 2: Valores de IC₅₀ obtidos através do ensaio do MTT. As células de melanoma humano (SK-Mel-37) foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos pré-selecionados visualmente, e incubadas por 24, 48 horas ou 72 horas, dependendo do composto. Os valores de IC₅₀ assim como o intervalo de confiança foram obtidos através do programa Prism da GraphPad Software, conforme descrito em Material e Métodos.

Compostos	IC ₅₀ (μM) (Intervalo de confiança)		
	24 horas	48 horas	72 horas
Benzaldeído canfeno tiossemicarbazona	35,69 (28,79 – 44,24)	15,64 (11,40 – 21,47)	**
<i>m</i> -cloro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona	17,12 (13,99 – 20,94)	12,58 (11,76 – 13,46)	**
<i>m</i> -nitro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona	32,09 (24,95 – 41,28)	31,86 (25,69 – 39,52)	**
<i>p</i> -dimetilamino benzalaldeído canfeno tiossemicarbazona	nd*	27,06 (19,85 – 36,89)	**
<i>p</i> -hidróxi benzaldeído canfeno tiossemicarbazona	24,31 (22,54 – 26,22)	18,02 (16,83 – 19,29)	**
<i>p</i> -metóxi benzaldeído canfeno tiossemicarbazona	nd*	nd*	32,18 (28,04 – 36,94)

* Valores não determinados, pois os compostos *p*-dimetilamino benzaldeído canfeno tiossemicarbazona não apresentou ação citotóxica significativa em 24 horas de tratamento e o *p*-metóxi benzaldeído canfeno somente apresentou ação citotóxica em 72 horas de tratamento.

** Valores apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Valores de IC₅₀ e desvio padrão (DP) de três experimentos independentes. As células de melanoma (SK-Mel-37) foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos indicados e incubadas por 72 horas. Os valores de IC₅₀ foram obtidos através do programa Prism da GraphPad Software, conforme descrito em Material e Métodos.

Compostos	Média do IC ₅₀	Desvio Padrão (DP)
benzaldeído canfeno tiossemicarbazona	12,84	± 1,14
<i>m</i>-cloro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona	13,09	± 0,77
<i>m</i>-nitro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona	23,20	± 1,74
<i>p</i>-dimetilamino benzaldeído canfeno tiossemicarbazona	29,14	± 9,40
<i>p</i>-hidróxi benzaldeído canfeno tiossemicarbazona	15,39	± 2,77

Para comprovação de que os compostos que não apresentaram citotoxicidade significativa na seleção visual também não apresentariam após 72 horas de tratamento, todos foram submetidos ao ensaio de MTT com a concentração máxima de 100 µM. Com os valores obtidos, na Figura 18 a seguir, podemos comparar as porcentagens da viabilidade celular de todos os compostos estudados.

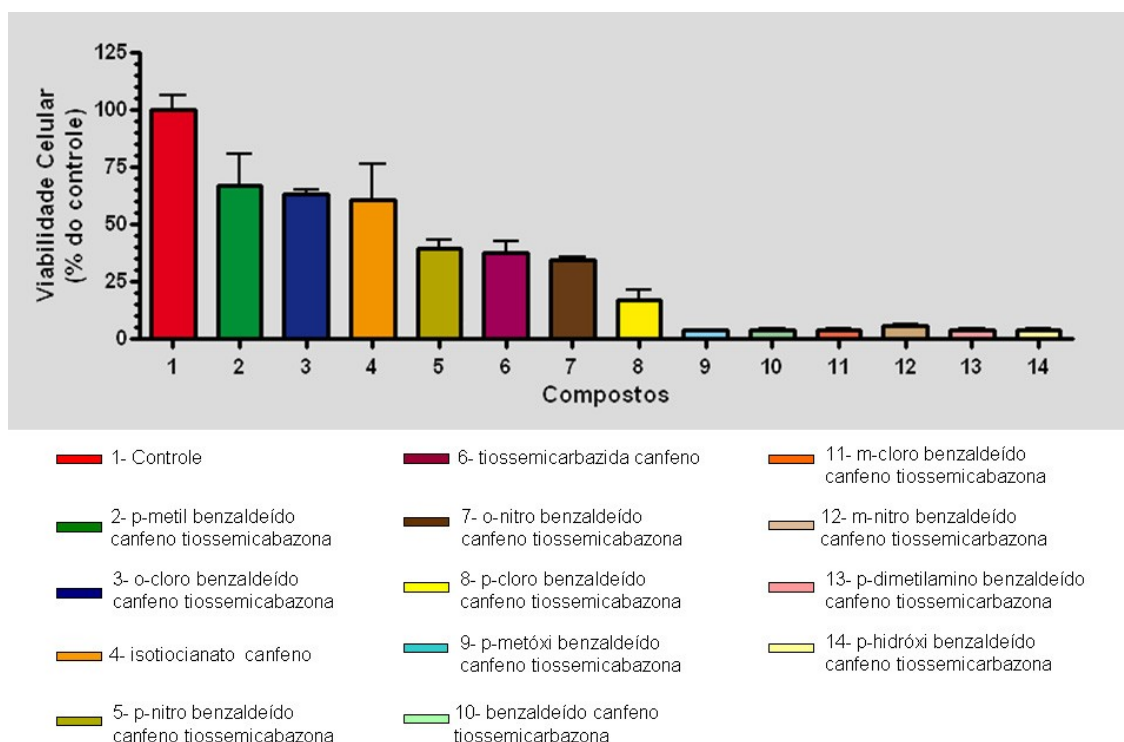


Figura 18: Viabilidade celular de todos os compostos estudados. As células de melanoma humano (SK-Mel-37) foram tratadas com os diferentes compostos derivados de benzaldeído canfeno tiossemicarbazonas, segundo o ensaio de MTT. Neste gráfico, apresentamos apenas o valor da viabilidade para a concentração de 100 μ M, para efeito de comparação com os resultados da seleção visual. Observamos claramente que os compostos 1 a 8 não apresentaram citotoxicidade significativa, ou seja abaixo de 85%, ao contrário do que se observou com os compostos 9 a 14, onde a ação anti-proliferativa foi bem intensa.

Marcação “*staining live*” de núcleos apoptóticos com iodeto de propídio

O dano celular observado pelo desprendimento das células também foi analisado através da fluorescência emitida pelo iodeto de propídio (PI), um composto capaz de atravessar membranas plasmáticas não íntegras e ligar-se aos ácidos nucleicos (MACKLIS & MADISON, 1990). O processo pode ser visualizado em microscópio de fluorescência com o filtro apropriado.

As células de melanoma (SK-Mel-37) foram tratadas com o composto *m*-cloro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona na concentração de 50 μ M. Após 4 horas de tratamento, adicionou-se a solução de PI e, imediatamente, observou-se ao microscópio de fluorescência.

Nas Figuras 19 A e B, podemos observar um pequeno número de células que incorporaram o PI, indicativo de pouca morte celular. As células que apresentavam fluorescência já estavam desprendidas e mostravam fragmentação nuclear. Após a incubação por mais 4 horas (totalizando 8 horas de tratamento), em uma nova observação, notamos o aumento do número de células em suspensão marcadas com PI (Figuras C e D). A cultura foi mantida em incubadora por até 24 horas após o tratamento com o composto na presença do corante. Após este período, uma última análise ao microscópio foi feita e houve um aumento significativo do número de células marcadas com PI e com fragmentação nuclear (Figuras 19 E e F). O controle utilizado neste experimento não apresentou número significativo de células marcadas com PI (não observamos fluorescência) indicando que a metodologia é capaz de demonstrar o potencial citotóxico dos compostos estudados.

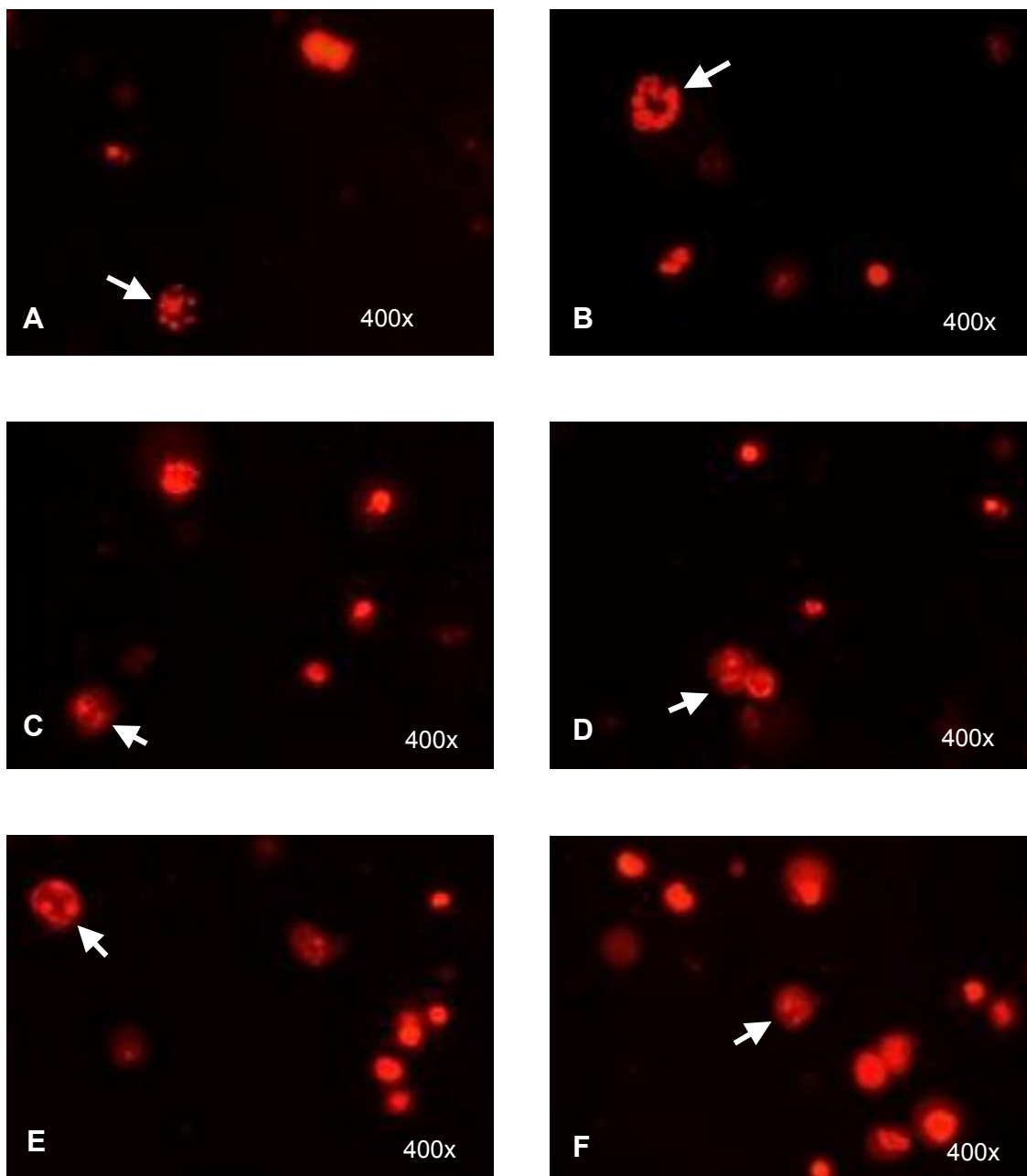


Figura 19: Células de melanoma humano (SK-Mel-37) em cultura tratadas com *m*-cloro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona na concentração de 50 μ M em diferentes tempos de incubação. As células foram incubadas com iodeto de propídio que permaneceu no meio de cultura durante todo o tempo de incubação da droga e foram visualizadas em microscópio invertido de fluorescência. (A) e (B) Cultura celular visualizada após 4 horas de tratamento com o composto e imediatamente após a adição do PI. Observa-se o aparecimento de fragmentação nuclear (seta); (C) e (D) Células visualizadas após 8 horas de tratamento. Observa-se o aumento no número de células que incorporaram o corante. (E) e (F) Células visualizadas após 24 horas de tratamento. Nota-se um aumento significativo no número de células marcadas com PI. O controle não apresentou número de células significativo marcadas com PI, de forma que não observamos nenhuma fluorescência (resultado não apresentado).

Análise de fragmentação do DNA (Apoptose)

A apoptose é uma forma de morte celular que ocorre de forma sistemática e bem caracterizada através de uma seqüência de mudanças morfológicas e bioquímicas. Uma dessas mudanças é a fragmentação nuclear, levando à fragmentação do DNA genômico. Esta fragmentação ocorre pela ação de endonucleases em regiões específicas do DNA, formando fragmentos múltiplos de 200 pares de base (pb) os quais podem ser visualizados em gel de agarose através da formação de “escada” de bandas.

As células de melanoma humano (SK-Mel-37) foram tratadas com os seis compostos pré-selecionados que apresentaram elevada citotoxicidade na concentração de 100 μ M em 24 horas e 48 horas de incubação.

Os experimentos com as células marcadas com PI indicaram que a fragmentação nuclear era mais pronunciada após o desprendimento das células, uma vez que só observamos fluorescência nas células em suspensão.

Assim, a fim de garantirmos um número elevado de células para a extração do DNA, utilizamos a concentração máxima de 100 μ M e incubamos os compostos por um período de 24 horas.

As células foram submetidas à extração do DNA (conforme descrito em Materiais e Métodos) e após os procedimentos, o material foi submetido à eletroforese de gel de agarose e fotografado em transluminador apropriado com luz UV.

Na Figura 20 podemos observar que os cinco compostos derivados de canfeno tiossemicarbazona pré-selecionados visualmente apresentaram as bandas características devido ao padrão de fragmentação do DNA em múltiplos de 200 pb, evidenciando a morte por apoptose das células SK-Mel-37.

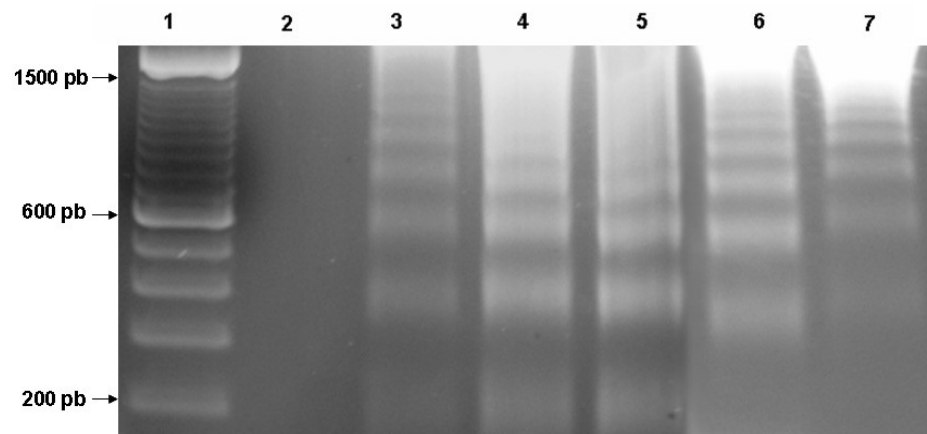


Figura 20: Eletroforese em gel de agarose a 2% do DNA de células de melanoma tratadas com compostos derivados de canfeno tiossemicarbazonas (100 uM) após 72 horas, mostrando a quebra do DNA genômico em múltiplos de 200 pb, indicando apoptose. 1: marcador de peso molecular Ladder (pb). 2: controle. 3: benzaldeído canfeno tiossemicarbazona. 4: *m*-cloro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona. 5: *m*-nitro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona. 6: *p*-dimetilamino benzaldeído canfeno tiossemicarbazona. 7: *p*-hidróxi benzaldeído canfeno tiossemicarbazona.

5. DISCUSSÃO

Benzaldeído canfeno tiossemicarbazonas apresentam atividade citotóxica em células de melanoma humano (SK-Mel-37)

As tiossemicarbazonas são compostos sintéticos que apresentam inúmeras propriedades biológicas como atividades antitumoral antimicrobiana, antiviral, antifúngica e antimalárica (TENÓRIO, 2005). A atividade antitumoral tem sido, sem dúvida, a mais estudada. Trabalhos recentes, como o de Dilovié et al. (2008), demonstraram a potencialidade antiproliferativa de algumas tiossemicarbazonas com grupos aldeídicos em **R**₂, tais como naftaldeído e salicialdeído frente a diferentes tipos de células neoplásicas *in vitro* (HeLa, carcinoma cervical; MCF-7, carcinoma de mama; SW620, carcinoma de cólon; MiaPaCa-2, carcinoma pancreático e Hep-2, carcinoma laringeal), realizando ensaios de MTT, o qual obtiveram valores de IC₅₀ entre 0,2 µM e 5 µM.

Os compostos utilizados neste estudo são inovadores enquanto sua estrutura química, apresentando o grupo benzaldeído na posição **R**₂ com vários substituintes neste anel e o monoterpeno canfeno na posição **R**₄ (Figura 7), sendo o grupo de Química Orgânica Sintética do IQ/UFG em cooperação com pesquisadores do Departamento de Química da UEM (Universidade Estadual de Maringá) responsáveis por tal síntese. Treze compostos de tiossemicarbazonas derivadas do monoterpeno natural canfeno foram testados *in vitro* em células de melanoma humano (SK-Mel-37), dando a este trabalho um caráter inédito.

Afim de pré-selecionarmos os compostos mais ativos, foi realizada uma observação visual do efeito citotóxico empregando-se a concentração máxima de 100 µM. Assim, se ao final de 48 horas de incubação com a droga, na concentração máxima, não fosse observado o desprendimento do fundo das placas de 85% do total das células, o composto não seria selecionado para os experimentos seguintes.

O composto isotiocianato canfeno (Tabela 1), não apresentou ação antiproliferativa sobre as células de melanoma na concentração máxima de 100 µM nos tempos de 24 ou 48 horas de incubação (Figura 12 C e 13 C), e por isso não foi selecionado para o ensaio de MTT. De modo semelhante, o composto canfeno tiossemicarbazida (Tabela 1), um dos produtos da rota sintética dos compostos estudados (dados não mostrados), não apresentou efeito antiproliferativo

significativo em 24 horas (Figura 12 D), somente após 48 horas começou a ser mais evidente sua ação, mas não chegou a ser suficiente para que fosse selecionado para o ensaio do MTT.

Na Figura 18 (6), após 72 horas de tratamento com a máxima concentração estudada (100 μ M), observamos a diferença destes compostos para com os outros seis que apresentaram ação antiproliferativa mais acentuada. Por esta razão sugerimos que a ação citotóxica dos compostos estudados não está diretamente correlacionada com a molécula do monoterpene canfeno, mas com a molécula de tiossemicarbazona e a substituição do grupo benzaldeído como **R₂**, como podemos visualizar na Figura 12 E, I, L, O e Figura 13 G e N, nas quais observamos o aspecto visual da cultura de células de melanoma SK-Mel-37 com uma concentração de 100 μ M em 24 e 48 horas de tratamento, respectivamente, e na Figura 14, onde observamos o aspecto morfológico de células de melanoma SK-Mel-37 em cultura tratadas com os compostos selecionados na concentração de 100 μ M por 24 horas.

Benzaldeído canfeno tiossemicarbazonas apresentam IC₅₀ baixo

Dentre os treze compostos estudados, seis apresentaram ação antiproliferativa significativa (ou seja, provocaram a morte de mais de 85% do total das células) e foram portanto, submetidos ao ensaio de MTT para o cálculo da Concentração Inibitória em 50% das células (IC₅₀).

A ação citotóxica mais eficaz foi a do composto benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, que apresenta o grupo benzaldeído na posição **R₂**, sem nenhum substituinte neste anel (ver Tabela 1). Os valores de IC₅₀ em 24, 48 e 72 horas foram de 35,69 μ M, 15,64 μ M e 12,84 μ M, respectivamente. Esses valores são menores do que o valor encontrado para a doxorrubicina, utilizada como controle. Como se observa, existe uma dependência com relação ao efeito do tempo de incubação. Sugerimos que os valores baixos encontrados seja devido à presença do grupo benzaldeídico, por ser um grupo lipofílico, pode atravessar mais facilmente a membrana plasmática celular e assim exercer sua ação citotóxica com mais eficiência.

O composto *m*-cloro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona apresenta substituição no grupo benzaldeído de um átomo de cloro (Cl) na posição *meta* (Tabela 1). Este composto também apresentou um valor de IC₅₀ baixo. Os ensaios de MTT em 24, 48 e 72 horas apresentaram IC₅₀ de 17,12 µM, 12,58 µM e 13,09 µM, respectivamente. Se compararmos estes resultados com o do composto não substituído, podemos dizer que sua ação é menos tempo-dependente, pois não houve uma variação significativa entre o valor de IC₅₀ para 24 horas e de 72 horas de incubação. Os compostos *o*-cloro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona e *p*-cloro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona não apresentaram ação antiproliferativa significativa (Figura 18).

Em comparação ao composto citado acima, o *p*-hidróxi benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, apresenta uma substituição no grupo benzaldeído na posição *para* (Tabela 1) e apresentou valores de IC₅₀ em 24, 48 e 72 horas de 24,31 µM, 18,02 µM e 15,39 µM, respectivamente, semelhantes aos valores do *m*-cloro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona. Dessa forma, podemos sugerir que a eficácia dos substituintes no grupo benzaldeído depende da sua posição no anel e também do tipo de grupo (doadores ou atratores de densidade eletrônica).

O composto *m*-nitro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, apresenta substituição no grupo benzaldeído do grupo nitro (-NO₂) na posição *meta* (Tabela 1), apresentou valores de IC₅₀ de 32,09 µM , 31,86 µM , 23,20 µM, nos tempos de 24 , 48 e 72 horas. Os compostos *o*-nitro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona e *p*-nitro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona não apresentaram ação antiproliferativa significativa (Figura 18). Quando comparamos este composto com o *m*-cloro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, podemos sugerir que o elemento cloro e o grupo nitro tem ação citotóxica na posição *meta*, e as posições *para* e *orto* desativam a atividade do composto.

Em relação ao composto *p*-dimetilamino benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, (Tabela 1), podemos dizer que a molécula provavelmente muda sua conformação tridimensional, dificultando a passagem pela membrana plasmática, fazendo com que a ação desse composto seja mais tempo-dependente que os demais, pois o composto começou a ter ação antiproliferativa significativa após 48 horas de tratamento, com valores de IC₅₀ de 27, 06 µM, após 72 horas de tratamento (29,14 µM).

O composto *p*-metóxi benzaldeído canfeno tiossemicarbazona começou a apresentar ação citotóxica em 72 horas de tratamento com a concentração máxima de 100 μM na pré-seleção (ver Figura 18), mas não foi incluído nos experimentos seguintes, pois em 48 horas não apresentou desprendimento de 85% das células (ver Figura 13). Entretanto, o composto apresentou valor de IC_{50} de 32,18 μM (valor semelhante ao da doxorrubicina, conforme discutido abaixo) no ensaio de MTT de 72 horas para todos os compostos envolvidos neste estudo.

Para a comparação dos valores obtidos com os compostos acima, realizamos o ensaio de MTT com doxorrubicina, utilizada clinicamente contra cânceres em geral (VAN BRACKEL, 2008). Este composto apresentou valor de IC_{50} de 34,13 μM em células de melanoma humano (SK-Mel-37). Assim, os compostos benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, *m*-cloro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona e *p*-hidróxi benzaldeído canfeno tiossemicarbazona que apresentaram valores de IC_{50} de 12,84 μM , 13,09 μM , e 15,39 μM , respectivamente, foram considerados mais eficazes na ação antiproliferativa contra células de melanoma humano (SK-Mel-37) do que a doxorrubicina. Os compostos *m*-nitro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona e *p*-dimetilamino benzaldeído canfeno tiossemicarbazona apresentaram valores de IC_{50} de 23,20 μM e 29,14 μM , respectivamente, ou seja, com ação antiproliferativa próxima à da observada para a doxorrubicina, e somente o composto *p*-metóxi benzaldeído canfeno tiossemicarbazona pode ser considerado como um composto de ação citotóxica similar à da doxorrubicina, por apresentar valor de IC_{50} na mesma faixa de concentração (32,18 μM).

Os resultados apresentados podem ser comparados aos observados para outras tiossemicarbazonas mencionadas na literatura. Compostos de 4-N-fenil-2-benzoilpiridina tiossemicarbazona complexados com estanho (Sn (IV)), mostraram-se muito eficientes em testes de citotoxicidade em células de câncer de mama (MCF-7) e carcinoma renal (TK-10) humano, apresentando valores de IC_{50} entre < 0,002 μM e 17,3 μM , respectivamente. Em células de melanoma humano (UACC-62) esses derivados apresentaram valores de IC_{50} entre <0,003 μM e 9,7 μM , (PEREZ-REBOLLEDO et al., 2005).

Ferrari et al. (2004) apresentou experimentos de derivados de piridoxal tiossemicarbazonas testados em células de leucemia humana (U937, CEM, e K562). Esses compostos apresentaram valores de IC_{50} entre 6,7 μM e 42 μM após 96 horas

de incubação Já o composto 3-amino-2-carboxialdeído tiossemicarbazona (Triapina) quando testado em culturas de câncer de ovário (linhagens CP 70, A2780 E SKOV3), apresentou valores de $IC_{50} \leq 10 \mu M$ (ALVERO et al., 2006). Este composto encontra-se atualmente em testes na fase clínica.

O composto *p*-metil benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, não apresentou ação antiproliferativa em células de melanoma (SK-Mel-37), como podemos observar na Figura 18.

Benzaldeído canfeno tiossemicarbazonas induzem a apoptose

A apoptose é um tipo de morte programada da célula. Este tipo de morte é caracterizado por arredondamento da célula, com formação de “*blebs*” na membrana celular, condensação da cromatina, fragmentação do DNA cromossômico e ativação de caspases (RELLO et al., 2005). Este processo é que permite aos organismos o controle no número de células e eliminar células prejudiciais. A desregulação do processo apoptótico pode levar a insuficiência fisiológica de morte celular, contribuindo para o aparecimento de várias doenças humanas, inclusive o câncer (HAJRA & LIU, 2004). A apoptose é considerada como um importante mecanismo de ação de drogas anticancerígenas.

Vários estudos recentes comprovam que derivados de 2-piridinaformamida-tiossemicarbazona, induzem a morte celular por apoptose em células de glioma maligno (linhagem RT-2), através de análises morfológicas (MENDES, 2007).

As células de melanoma (SK-Mel-37) foram tratadas com a concentração máxima de $100 \mu M$ e foi observado alterações no citoesqueleto celular, prolongamentos dendríticos muito acentuados, presença de vacúolos e fragmentação nuclear, indicando que a ação dos compostos estudados é por apoptose.

Na análise morfológica das células tratadas com o composto benzaldeído canfeno tiossemicarbazona por microscopia em contraste de fase (Figura 14 B e Figura 15) podemos observar o arredondamento das células e a formação de vacúolos, modificações que ficaram mais bem evidenciadas com a coloração de Giemsa (Figura 16). As células também foram tratadas com este composto para a

marcação “*staining live*” de núcleos com iodeto de propídio (Figura 19), onde podemos observar, em diferentes tempos, a fragmentação nuclear com a incorporação do PI e o aumento significativo do número de células marcadas.

Os demais compostos além de apresentarem vacuolização, também apresentaram alterações no citoesqueleto (*m*-nitro benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, Figura 14 D), prolongamentos dendríticos muito acentuados (*p*-dimetilamino benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, Figura 14 E) e formação de “*blebs*” (*p*-hidróxi benzaldeído canfeno tiossemicarbazona, Figura 14 F).

Os resultados da análise morfológica descritos acima, foram comprovados através da análise de fragmentação do DNA genômico por eletroforese em gel de agarose. Os cinco compostos selecionados apresentaram formação de “escada” de bandas, como mostra a Figura 20, semelhante aos resultados de Ferrari et al. (2003), em células de leucemia humana (U937 e CEM) tratadas com derivados de piridoxal tiossemicarbazonas, em eletroforese em gel de agarose. Assim como os estudos de Rebolledo et al. (2005) com compostos de 4-N-fenil-2-benzoilpiridina tiossemicarbazona complexados com estanho (Sn (IV)), que demonstrou morte por apoptose em células de melanoma humano (UACC-62), por meio de fragmentação de DNA em citometria de fluxo.

6. CONCLUSÃO

Diante de todos os resultados apresentados neste trabalho, concluímos que o composto tiossemicarbazona contendo na posição **R**₄ o monoterpeno canfeno, e na posição **R**₂ o grupo benzaldeído, apresenta ação antiproliferativa sobre células de melanoma (Figura 7). Além disso, observamos que as tiossemicarbazonas derivadas de benzaldeído substituídos pelos grupos doadores de densidade eletrônica: *p*-hidróxi, *m*-cloro, *p*-dimetilamino e *p*-metóxi e pelo grupo atrator *m*-nitro apresentaram ação antiproliferativa eficaz sobre células de melanoma humano. Entretanto as posições *o* e *p*-cloro, bem como *o* e *p*-nitro benzaldeído desativaram a molécula, pois tais compostos não apresentaram ação citotóxica como o observado com o composto não substituído. Da mesma forma, o derivado *p*-metil também não apresentou nenhuma atividade biológica, mas não pudemos verificar se o efeito se deve à posição do grupo ou ao próprio grupo em si.

Os seis compostos selecionados para os estudos mais detalhados, apresentaram ação antiproliferativa dose e tempo-dependente e morte celular por apoptose em células de melanoma humano (SK-Mel-37) *in vitro*, sendo promissores candidatos no tratamento de neoplasias e estes resultados são pioneiros para estes tipos de compostos derivados de benzaldeído canfeno tiossemicarbazona.

7. PERSPECTIVAS

Os compostos derivados de benzaldeído canfeno tiossemicarbazonas apresentam um grande potencial citotóxico para o melanoma. Entretanto, estudos rigorosos dos seus efeitos antitumorais em outras linhagens celulares e modelos *in vivo* são necessários para elucidar o mecanismo da via de morte celular por apoptose desencadeada por estes compostos. Assim, são necessários experimentos para esclarecer alguns dos alvos moleculares nas vias de sinalização, receptores de membrana, fatores de transcrição, proteínas como a Bcl-2, p53, MAPK, e a via das caspases. São importantes também a síntese de novos compostos derivados de benzaldeído canfeno tiossemicarbazona (como por exemplo, *o*-hidróxi e *m*-hidróxi, *o*-metil e *m*-metil, *o*-metóxi e *m*-metóxi, *o*-dimetilamino e *m*-dimetilamino) e experimentos para uma melhor compreensão da estrutura-atividades desses compostos. Estas análises, somadas aos estudos pré-clínicos em pacientes com melanoma, poderão tornar possível o uso clínico de compostos derivados de benzaldeído canfeno tiossemicarbazonas como agentes quimioterápicos.

8. BIBLIOGRAFIA

- ALVERO, A. B.; CHEN, W.; SARTORELLI, A. C.; SCHWARTZ, P.; RUTHERFORD, T.; MOR, G.; **Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone) induces apoptosis in ovarian cancer cells.** *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, v. 13, 145-52, 2006.
- BERALDO, H.; **Semicarbazonas e Tiosemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínico,** *Quim. Nova*, v.. 27,n. 3, 461-471, 2004.
- BERHARD, D.; SCHWAIGER, W.; CRAZZOLARA, R.; TINHOFFER, I.; KOFLER, R.; CSORDAS, A.; **Enhanced MTT-reducing activity under growth inhibition by resveratrol in CEM-C7H2 lymphocytic leukemia cells.** *Cancer Letter*, v.195, 193-199, 2003.
- BOISSY, R.E.; NORDLUND, J. J.; **Molecular basis of congenital hypopigmentary disorders in humans: a review.** *Pigment Cell Res.*, 12-24, 1997.
- CARMICHAEL, J., DeGraff, W. G., Gazdar A. F., Minna, J. D., Mitchell, J. B.; **Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay: Assessment of Chemosensitivity Testing.**; *Cancer Research*, n. 47, 936-942, 1987.
- CLARK, W.H. JR; ELDER, D. E.; GUERRY D.; EPSTEIN, M. N.; GREENE, M. H.; VAN HORN M.; **A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma.** *Hum Pathol.*; v.15, 1147-65,1984.
- CRUZ, A.S.; CUPPOLONI, K.M.; MARTINEZ, C.H.O.;GOMES, L.F.S.;**Culturas celulares na detecção da toxicidade de materiais médico-hospitalares e outros que entram em contato com o ser humano.** *Rev.Inst.Adolfo Lutz*, v. 47, n. 1/2, p. 51-57, 1987.
- CUMMINS, D. L.; CUMMINS, J. M.; PANTLE H.; SILVERMAN, M. A.; LEONARD, A. L.; CHANMUGAM, A.; **Cutaneous malignant melanoma.** *Mayo Clin Proc.*; v.81, 500-7; Review,2006.
- DILOVIĆ, I., RUBEIĆ, M., VRDOLJAK V., PAVELIĆ, S. K., KRALJ, M.; PIANTANIBA, I., **Novel thiosemicarbazone derivatives as potencial antitumor agents: Synthesis, physicochemical and structural properties, DNA interactions and antiproliferative activity.**, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 16, 5189-5198, 2008.
- DOMAGK, G.; BEHNISH, R.; MIETZCH, F.; SCHMIDT, H.; *Nordisk Medicin*, 39, 1322, 1948.

- DU, X.; GOU, C.; HANSELL, E.; DOYLE, P. S.; CAFFREY, C. R.; HOLLER, T. P.; MCKERROW, J. H.; COHEN, F. E.; **Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thio semicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain.** *J. Med. Chem.*, v.45, 2695-707, 2002.
- EDINGER, A. L.; & THOMPSON, C. B.; **Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy.** *Curr Opin Cell Biol.*; v.16, 663-9; Review, 2004.
- FERRARI, M. B.; BISCEGLIE, F.; PELOSI, G.; SASSI, M.; TARASCONI, P.; CORNIA, M.; CAPACCHI, S.; ALBERTINI, R.; PINELLIS, S.; **Synthesis, characterization and X-ray structures of new antiproliferative and proapoptotic natural aldehyde thiosemicarbazones and their nickel(II) and copper(II) complexes.** *J. Inorg. Biochem.*, v.90, 113, 2002.
- FERRARI, M. B.; BISCEGLIE, F.; PELOSI, G.; TARASCONI, P.; ALBERTINI, R.; DALL'AGLIO, P. P.; PINELLI, S.; BERGAMO, A.; SAVA, G.; **Synthesis, characterization and biological activity of copper complexes with pyrodoxal thiosemicarbazone derivatives. X-ray crystal structure of three dimeric complexes.** *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 98, 301-312, 2004.
- FERRARI, M. B.; FAVA, G. G.; LEPORATI, E.; PELOSI, G.; ROSSI, R.; TARASCONI, P.; ALBERTINI, R.; BONATTI, A.; LUNGHI, P.; PINELL, S.; **Synthesis, characterisation and biological activity of three copper (II) complexes with a modified nitrogenous base: 5-formyluracil thiosemicarbazone.** *J. Inorg. Biochem.*, v. 70, 145-54, 1998.
- FINCH, R. A.; LIU, M. C.; GRILL, S. P.; ROSE, W. C.; LOOMIS, R.; VASQUEZ, K.; CHENG, Y.; SARTORELLI, A. C.; **Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde- thiosemicarbazone): A potent inhibitor of ribonucleotide reductase activity with broad spectrum antitumor activity.** *Adv. Biochem Pharmacol.*, v.59, 983-91, 2000.
- GANESH, T.; GUZA, R. C.; BANE, S.; RAVINDRA, R.; SHANKER, N.; LAKDAWALA, A. S.; SNYDER, J. P.; KINGSTON, D. G. I.; **The bioactive Taxol conformation on β -tubulin: Experimental evidence from highly active constrained analogs.** *PNAS*, v.27, n.101, 6-11, 2004.
- GHOBRIL, I. M.; WITZING, T. E.; ADJEI, A. A.; **Targeting apoptosis pathways in cancer therapy.** *CA Cancer J Clin*, v.55, 178-194, Review 2005.
- GOTTESMAN, M. M., FOJO, T., BATES S. E.; **Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters.** *Nature*, v.2, 48-58, Review, 2002.
- GRUBER F. P. & HARTUNG T.; **Alternatives to animal experimentation in biomedical education.** *Altex*, v.21, 33-48, 2004.
- HAJRA, K.M. & LIU, J. R.; **Apoptosome dysfunction in human cancer.** *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, v. 9(6):691-704, 2004.

- HAMRE, D.; BERNSTEIN, J.; DONOVICK, R.; **The chemotherapy of experimental tuberculosis. II. Thiosemicarbazones and analogues in experimental tuberculosis in the mouse.** *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 73, 275-80, 1950.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A., **The hallmarks of cancer**, *Cell*; v.100, 57-70, 2000.
- HANG, H. C.; BERTOZZI, C. R.; **Chemoselective approaches to glycoprotein assembly.**, *Acc. Chem. Res.*, v.34, 727-736, Review, 2001.
- HUERTA, S.; GOULET, E. J.; HUERTA-YEPEZ, S.; LINVINGSTON, E. H.; **Screening and detection of apoptosis**, *Journal of Surgical Research*, v.139, 143-156, Review, 2007.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). 2008. [homepage na internet] Disponível em: <http://www.inca.gov.br>
- JANGI, Z. G.; LU, X. C. M.; NELSON, V.; YANG, X.; PAN, W.; CHEN, R.; LEBOWITZ, M. S.; ALMASSIAN, B.; TORTELLA, F.; BRADY, R. O.; E GHANBARI, H. A.; **A multifunctional cytoprotective agent that reduces neuro degeneration after ischemia.**, *PNAS*, v.103, n.5, 581–1586, 2006.
- KRAMMER, P. H.; **CD95's deadly mission in the immune system.** *Nature*, 407:789, 2000.
- KUCHELMEISTER, C.; SCHAUMBURG-LEVER, G.; GARBE, C.; **Acral cutaneous melanoma in caucasians: clinical features, histopathology and prognosis in 112 patients.** *Br J Dermatol.* ; v.143, 275-80, 2000.
- MAN, D. R., DA ROCHA, A. B., SCHWARTSMANN, G.; **Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds.** *The Oncologist*, v.5, 185-98, 2000.
- MACKLIS, J. D. & MADISON, R. D.; **Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity.** *Journal of Neuroscience Methods*, v. 31, 43-6, 1990.
- MENDES, I. C., MOREIRA, J. P., ARDISSON, J. D., SANTOS, R. G., SILVA, P. R. O., GARCIA, I., CASTIÑEIRAS, A., BERALDO, H.; **Organotin (IV) complexes of 2-pyridineformamide-derived thiosemicarbazones: Antimicrobial and citotoxic effects.** *Eur. J. Méd. Chem.*, 2007.
- MILLAN, A. & HUERTA, S.; **Apoptosis-inducing factor and colon cancer**, *Journal of Surgical Research*, Review, 2007.
- MOSMANN, T. R. E. SAD, S.; **The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more.** *Immunol Today*; v.17, 138-46. Review; 1996.

- PEREZ-REBOLLEDO, A.; AYALA, J. A.; LIMA, G. M.; MARCHINI, N.; BOMBIERI, G.; ZANI, C. L.; SOUZA-FAGUNDES, E. M.; BERALDO, H.; **Structural studies an cytotoxic activity of N(4)-phenyl-2-benzolylpyridine thiosemicarbazone Sn(IV) complexes.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 40, 467-472, 2005.
- RELLO, S.; STOCKERT, J. C.; MORENO, V.; GÁMEZ, A.; PACHECO, M.; JUARRANZ, A.; CAÑETE, M.; VILLANUEVA, A.; **Morphological criteria to distinguish cell death induced by apoptotic and necrotic treatments.** *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, v. 10, 201-8, 2005.
- RINCHEVAL, V.; RENAUD, F.; LEMAIRE, C.; GODEFROY, N.; TROTOT, P.; BOULO, V.; MIGNOTTE, B.; VAYSSIÈRE, J. L.; **Bcl-2 can promote p53-dependent senescence versus apoptosis without affecting the G1/S transition.** *Biochem Biophys Res Commun*; v.298, 282-8; 2002.
- ROGERO, S.O., LUGÃO A.B., IKEDA T.I., CRUZ A.S., **Testes *in vitro* de citotoxicidade, estudo comparativo entre duas metodologias,** *Material Research*, v. 06, n. 03, 317-320, 2003.
- ROGERO, S.O.; HIGA, O.Z.; SAIKI, M.; CORREA, O.V.; COSTA, I., **Cytotoxicity due to corrosion of ear piercing studs.** *Toxicology in Vitro*, v. 14, n. 6, 497-504, 2000.
- SILVA, C. C. ; SILVA, A. P. B. DA ; TANAKA, ABE, C. M. ; SILVA, E. L. ; CUNHA, S. D. ; VANDRESEN, F.; **Síntese e avaliação da toxicidade frente a Artemia salina de novas tiossemicarbazonas derivadas do limoneno.** In: 13a SBQSUL, Florianópolis. *Livro de resumos da 13a SBQSUL*, 2005.
- SLOMINSKI, A.; TOBIN, D. J.; SHIBAHARA, S.; WORTSMAN, J.; **Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation.** *Physiol Rev.*; 84(4):1155-228; Review; 2004.
- SOENGAS, M. S., & LOWE, S. W.; **Apoptosis and melanoma chemoresistance.** *Nature Onceogene*, v.22, 3138-3151, 2003.
- TARHINI, A.A. & AGARWALA, S. S.; **Cutaneous melanoma: available therapy for metastatic disease.** *Dermatol Ther.*; v.19, 19-25, Review; 2006
- TENÓRIO R. P. & GÓES A. J. S., **Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica,** *Quim. Nova*, v. 28, n. 6, 1030-1037, 2005.
- VAN BRAKEL, R.; VULDERS, R. C.; BOKDAM, R.J.; GRÜLL, H.; ROBILLARD, M. S.; **A doxorubicin prodrug activated by the staudinger reaction.** *Bioconjug Chem.*, v.19, 714-8, 2008.
- VAN DEN OORD, J. J.; SARASIN, A.; WINNEPENNINCKX, V.; SPATZ, A.; **Expression profiling of melanoma cell lines: in search of a progression-related molecular signature.** *Future Oncol*; v.3, 609-11, 2007.

- WALCZAK, H.; KRAMMER, P.H.; **The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems.** *Exp Cell Res.*; v.256, 58-66. Review; 2000.
- WARD, I. S.; **Entendendo o processo molecular da tumorigênese.** *Arq Bras Endocrinol Metab*, v. 46, n. 4, 2002.
- WILLINGHAM, M. C.; **Cytochemical Methods for the Detection of Apoptosis.** *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v.47, 1101–1109, 1999.
- YUAN J., LOVEJOY D. B., e RICHARDSON D.R.; **Novel di-2-pyridyl–derived iron chelators with marked and selective antitumor activity: in vitro and in vivo assessment.** *Blood*, v.104, n.5, 2004.
- ZHENG, M.; Ekmekcioglu, S.; Walch T. E.; Tang, C. H.; **Inhibition of nuclear factor- κ B and nitric oxide by curcumin induces G₂/M cell cycle arrest and apoptosis in human melanoma cells.** *Melanoma Research*; v.14, 165–171, 2004.
- ZIEGLER, D.; KUNG, A. L.; KIERAN, M. W., **Anti-Apoptosis Mechanisms in Malignant Gliomas.** *Journal of Clinical Oncology*, v. 26, 493-500, 2008.