



**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas**

BRUNO IRAQUITAN MIRANDA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE NOVOS COMPOSTOS
DERIVADOS DE FURANOS E TIOFENOS 2-SUBSTITUÍDOS**

**RECIFE
2017**

BRUNO IRAQUITAN MIRANDA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE NOVOS COMPOSTOS
DERIVADOS DE FURANOS E TIOFENOS 2-SUBSTITUÍDOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração farmacologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Jaciana dos Santos Aguiar

**RECIFE
2017**

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Bruno Iraquitan Miranda da
Avaliação da atividade antitumoral de novos compostos derivados de
furanos e tiofenos 2-substituídos / Bruno Iraquitan Miranda da Silva. - 2017.

96 folhas: il, fig., tab.

Orientadora: Teresinha Gonçalves da Silva

Coorientadora: Jaciana dos Santos Aguiar

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas, Recife, 2017.

Inclui referências e anexos.

1. Quimioterapia 2. Compostos heterocíclicos 3. Câncer I. Silva,
Teresinha Gonçalves da (orient.) II. Aguiar, Jaciana dos Santos
(coorient.) III. Título

615.58

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017- 638

BRUNO IRAQUITAN MIRANDA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE NOVOS COMPOSTOS
DERIVADOS DE FURANOS E TIOFENOS 2-SUBSTITUÍDOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração farmacologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 24/02/2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Teresinha Gonçalves da Silva - (Orientadora)
Departamento de Antibióticos da UFPE

Dra. Maria Tereza dos Santos Correia – Membro interno
Departamento de Bioquímica da UFPE

Dr. Jefferson Luiz Princival – Membro externo
Departamento de Química Fundamental da UFPE

DEDICATÓRIA

Dedico

Primeiramente a Deus por ter me
concedido os dons necessários para
enfrentar os obstáculos, aos meus
familiares, em especial minha mãe, por
todo apoio e carinho e a todos que de
alguma forma contribuíram com minha
formação e conclusão deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me concedido as virtudes necessárias para alcançar meus objetivos.

A minha mãe Eliane Ana de Miranda, por estar sempre presente na minha vida, me apoiando e aconselhando.

A minha família por me apoiar e ajudar em todos os momentos, principalmente, minha avó Josefa Ana e minha irmã Bruna Priscila que sempre foram muito próximas.

A pessoa a quem tenho enorme admiração e carinho, que ama me dar bronca, porque deseja que eu esteja sempre progredindo como pesquisador e também como pessoa. Também por toda força e dedicação a que tem me dado. Profa. Jaciana dos Santos Aguiar, obrigado.

A minha orientadora profa. Teresinha Gonçalves da Silva, por ter me recebido na graduação e desde então tem se dedicado ao meu crescimento profissional. Também pela paciência e carinho que sempre demonstrou.

A Julyanne Cunha de Assis Correia, por estar sendo bastante importante nessa etapa de minha vida, ainda que há pouco tempo, têm me incentivado e dado forças em momentos difíceis.

Ao Dartagnan de Sá Pires e Jefferson Luiz Princival, não só por terem fornecido as substâncias testadas nesse trabalho, mas, por terem me orientado e auxiliado sempre que necessário.

Aos amigos do BIOFARMATOX pelos momentos de apoio e descontração, especialmente, Tatiane Bezerra, Isla Bastos, Jéssica Barbosa, Marllon Alex, Lais Nerys, Larissa Cardoso, Anne Cecília, Elizabeth Fernanda, Jhonatta Alexandre e Sandrine Arruda com quem eu sempre pude contar.

Aos professores e alunos colaboradores por cederem de seus equipamentos e tempo para que esta pesquisa fosse realizada.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FACEPE que custearam este trabalho.

E a cada um que de forma direta ou indireta contribuíram para minha formação pessoal, profissional e acadêmica.

EPÍGRAFE

“Não é o mais forte que sobrevive,
nem o mais inteligente, mas o que
melhor se adapta às mudanças”

Charles Darwin

RESUMO

O câncer é responsável por mais de 8,2 milhões de mortes em todo mundo, tornando-se um grave problema de saúde pública mundial. Embora seja vasta a lista de fármacos utilizados na quimioterapia, os efeitos colaterais e a baixa eficácia decorrente da resistência por células tumorais, restringem o uso dos quimioterápicos existentes. Além disso, compostos quirais podem ser tóxicos por parte de um de seus enantiômeros. Alternativamente, compostos aromáticos heterocíclicos, tais como furanos e tiofenos, vêm sido descritos como interessantes substâncias com atividades antimicrobiana, antifúngica e antitumoral, deste modo, é relevante a prospecção de novos compostos a fim de melhorar as estratégias farmacológicas atuais. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo investigar a atividade antitumoral de dezoito compostos contendo a função furano ou tiofeno em suas estruturas. Para isso, foi avaliada a citotoxicidade dos compostos em células tumorais (NCI-H292, HT-29, MCF-7, Hep-2, MOLT-4, HL-60 e K562) e em células saudáveis (PBMC) através do método do MTT. Hemácias humanas foram utilizadas para avaliar a atividade hemolisante. Ainda, foram avaliadas morfologia, potencial apoptótico e potencial de membrana mitocondrial em células HL-60 para verificação da via de morte celular e teste de toxicidade aguda em camundongos. Do total de compostos testados, dois derivados de furano (**3e** e **3g**) mostraram citotoxicidade para quatro ou mais linhagens cancerígenas, sendo, a substância **3g** citotóxica para todas as linhagens celulares, em mistura racêmica (**rac-3g**) ou em resolução enantiomérica *r* (**r-3g**), com valores de CI_{50} variando entre 4,09 $\mu\text{M/mL}$ (HL-60) e 27,67 $\mu\text{M/mL}$ (NCI-H292). Os valores de CI_{50} em diferentes tempos de tratamento (24, 48 e 72 h) demonstram a ação tempo-dependente da substância **3g** tanto em células tumorais (HL-60 e K-562) quanto em células saudáveis PBMC. Em ambas as conformações, **3g** apresentou CI_{50} em PBMC superior ao fármaco padrão doxorrubicina, dessa forma, mostrou ser menos citotóxica para esse tipo celular. O composto **3g** também não causou danos a membrana de hemácias, apresentando CE_{50} superior a 2047 $\mu\text{M/mL}$. Os resultados obtidos por citometria de fluxo indicam que **rac-3g** induz necrose celular a depender da concentração, no entanto, indícios de apoptose foram observados na análise morfológica em HL-60. O ensaio de toxicidade em camundongos mostrou toxicidade aos órgãos fígado e rins, que provavelmente pode ter sido causado pelo metabolismo do furano. Tendo em vista os dados observados foi possível concluir que **rac-3g** é uma promissora substância antiproliferativa com ação tempo e dose-dependente, podendo agir por via necrótica ou apoptótica, sendo, ainda tóxica na dose de 50 mg/kg para fígado e rins de camundongos. Porém, ainda são necessários ensaios de maior poder discriminativo para confirmação da via de morte celular induzida por **rac-3g**. Também é interessante que seja realizada intervenção química de forma que o centro furano seja protegido da ação enzimática, assim, espera-se que haja diminuição de seus efeitos colaterais.

Palavras-chaves: Compostos heterocíclicos. Citotoxicidade. Substância Racêmica. Toxicidade e Morte Celular.

ABSTRACT

Cancer is responsible for more than 8.2 million deaths worldwide, making it a serious public health problem worldwide. Despite the list of drugs used in chemotherapy is vast, have been observed side effects and low efficacy due to tumor cell resistance restrict the use of existing chemotherapeutic agents. In addition, compounds chiral may be toxic to one of their enantiomers. In contrast, heterocyclic aromatic compounds, such as furans and thiophenes have been described as interesting molecules with antimicrobial, antifungal and antitumor activities. In this regard, it is relevant the prospection of new compounds in order to improve the actual pharmacological strategies. This work aimed to investigate the antitumor activity of eighteen compounds containing the furan and thiophene function in their structures. Thus, the cytotoxicity activity of the molecules was tested in tumor cells (NCI-H292, HT-29, MCF-7, Hep-2, MOLT-4, HL-60 and K562) and healthy cells (PBMC) MTT. Human blood cells were used to evaluate the hemolytic activity. On the other hand, morphology, apoptotic potential and mitochondrial membrane potential of HL-60 cells were assessed for cell death pathway and the acute toxicity assay in mice. From the total compounds evaluated, two furan derivatives (**3e** and **3g**) showed a cytotoxic effect in four or more carcinogenic strains. The substance named **3g** was cytotoxic in all cell lines, in a racemic mixture (**rac-3g**) or in enantiomeric resolution *r* (**r-3g**), with IC₅₀ values ranging from 4.09 μ M/mL (HL-60) to 27.67 μ M/mL (NCI-H292). The IC₅₀ values at different treatment times (24, 48 and 72 h) demonstrated the time-dependent action of **3g** on both tumor cells (HL-60 and K-562) and on healthy PBMC cells. In both conformations **3g** presented IC₅₀, in PBMC, superior to the standard drug doxorubicin, inn this way, it was shown to be less cytotoxic for this cellular type. It also did not damage the erythrocyte membrane, presenting EC₅₀ greater than 2047 μ M/mL. The results obtained from flow cytometry indicated that **rac-3g** induced cell necrosis depending on concentration. However, evidence of apoptosis was observed in the morphological analysis of HL-60. Furthermore, the toxicity test in mice showed toxicity to the liver and kidneys, which suggests the influence of furan on metabolism. Thus, it was possible to conclude that **rac-3g** is a promising antiproliferative substance with time and dose-dependent action, being able to act either necrotically or apoptotically. Also, it was detected its toxic effect at doses between 5 and 50 mg/kg for liver and kidneys of mice. However, further discriminatory power assays for confirmation of the **rac-3g** induced on cell death pathway are still required. In addition, future studies related to the chemical intervention of furan center preserving its enzymatic action center would be interesting as alternative to decrease its side effects.

Keywords: Heterocyclic Compounds. Cytotoxicity. Racemic Substance. Toxicity and Cell Death.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Estimativas dos tipos câncer de maior incidência no mundo em ambos os sexos, em homens e em mulheres, em 2012.....	18
FIGURA 2 - Dez tipos de câncer mais frequentes, por sexo, estimados para 2016 no Brasil, excerto câncer de pele não-melanoma.....	19
FIGURA 3 - Fase da carcinogênese: iniciação, promoção e progressão.....	20
FIGURA 4 - Fases do ciclo celular. Pontos de atividade regulatória do complexo ciclina-CDK e seus respectivos inibidores.....	24
FIGURA 5 - Reação de oxidação do furano catabolizada pelo citocromo P450.....	30
FIGURA 6 - Fármacos contendo núcleo tiofeno.....	31

LISTA DE FIGURAS - ARTIGO 1

FIGURA 1 - Estrutura química das substâncias derivadas de furanos e tiofenos.....	38
FIGURA 2 - Valores de CI_{50} da substância 3g em linhagens tumorais e PBMC após incubação de 72h.....	44
FIGURA 3 - Análise morfológica de HL-60 após 48 h de incubação com rac-3g, coradas por panótico rápido.....	46
FIGURA 4 - Percentual de células apoptóticas após tratamento com rac-3g, por 48 h.....	48
FIGURA 5 - Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (PPM) de células tratadas com rac-3g durante 48 h.....	50
FIGURA 6 - Peso relativo dos órgãos dos animais tratados em dose única com rac-3g.....	52

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Classes de carcinógenos químicos, tipos de cânceres induzidos, onde podem ser encontrados e riscos por exposição aguda.....	22
TABELA 2 - Agentes carcinógenos biológicos indutores de câncer humano.....	23
TABELA 3 - Tipos de morte celular e suas características.....	27
TABELA 4 - Classe de quimioterápicos e respectivos mecanismos de ação farmacológica..	28
TABELA 5 - Fármacos quimioterápicos e seus respectivos efeitos colaterais.....	29

LISTA DE TABELAS - ARTIGO 1

TABELA 1 - Percentual de Inibição do Crescimento Celular (IC%) em linhagens tumorais, realizadas através do ensaio do MTT.....	43
TABELA 2 - Valores de CI_{50} da substância 3g nas linhagens de células HL-60, K-562 e PBMC após incubação por 24, 48 e 72 h.....	44
TABELA 3 - Ganho de peso corporal e consumo diário de ração e água dos animais tratados com a substância rac-3g, acompanhados durante 14 dias.....	51
TABELA 4 - Parâmetros bioquímicos no sangue dos animais tratados com dose única de rac-3g.....	52
TABELA 5 - Avaliação dos parâmetros hematológicos dos animais tratados com dose única de rac-3g.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

7-AAD	- 7-amino actinomicina D
ALT	- Alanina aminotransferase
AST	- Aspartato aminotransferase
BDA	- Cis-2-buten-1,4-dial
CE ₅₀	- Concentração efetiva 50%
CHCM	- Concentração de hemoglobina corpuscular média
CI ₅₀	- Concentração que inibe 50% do crescimento celular
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DOX	- Doxorrubicina
HCM	- Hemoglobina corpuscular média
HEP-2	- Linhagem celular de carcinoma epidermóide de laringe
HL-60	- Linhagem celular de leucemia promielocítica aguda
HT-29	- Linhagem celular de adenocarcinoma de cólon
IC 95%	- Intervalo de confiança 95%
IC%	- Percentual de inibição do crescimento celular
IP	- Iodeto de propídeo
JC-1	- 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolcarbocianina iodeto
K-562	- Linhagem celular de leucemia mielocítica crônica
MCF-7	- Linhagem celular de adenocarcinoma de mama
MOLT-4	- Linhagem celular de leucemia limfoblástica aguda
MTT	- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NCI-H292	- Linhagem celular de carcinoma mucoepidermoide de pulmão
PBMC	- Células mononucleares de sangue periférico
PPM	- Potencial de membrana mitocondrial
R-	- Enantiômero r da substância
RAC-	- Mistura racêmica da substância
RDW	- Variação de tamanho das hemácias
S-	- Enantiômero s da substância
SBCAL	- Sociedade brasileira de ciência em animais de laboratório
VCM	- Volume corpuscular médio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 GERAL	16
2.2 ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 CÂNCER	17
3.1.1 Epidemiologia	17
3.1.2 Carcinogênese	19
3.2 CICLO CELULAR	23
3.3 MORTE CELULAR E CÂNCER	25
3.4 QUIMIOTERAPIA	27
3.5 FURANOS	29
3.6 TIOFENOS	30
3.7 COMPOSTOS QUIRAIS E IMPLICAÇÕES FARMACOLÓGICAS	31
4 ARTIGO 1	34
5 CONCLUSÕES GERAIS	71
REFERÊNCIAS	72
ANEXO A – NORMAS DA REVISTA BMC CANCER	83

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um termo genérico usado para descrever mais de 100 enfermidades, cujas principais características são crescimento desordenado de células e seu potencial invasivo e metastático, sendo apontado como a segunda maior causa de morte no mundo. Com base nas estimativas realizadas pelo projeto GLOBOCAN da IARC (*International Agency for Research on Cancer*), 14,1 milhões de novos casos e 8,2 milhões de casos de morte por câncer ocorreram em 2012 no mundo, ademais, 65% desses casos ocorreram nos países em desenvolvimento (STEWART; WILD, 2014).

Embora seja vasta a lista de quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer, muitos deles apresentam graus variados de toxicidade, seja por atuarem em mecanismos básicos comuns a células saudáveis, e/ou por apresentarem distribuição não específica no organismo (FERNANDES et al., 2016). Em pacientes submetidos à quimioterapia, são frequentes os efeitos colaterais como, por exemplo: mielodepressão, alopecia e alterações gastrintestinais (náuseas, vômitos e diarreia) o que muitas vezes comprometem o tratamento (INCA, 2016). Isto posto, ainda é necessário que novas pesquisas sejam realizadas com propósito de somar novas estratégias terapêuticas com maior efeito antitumoral e menos danos aos pacientes.

Uma interessante alternativa quimioterápica é a utilização de compostos heterocíclicos aromáticos como ponto de partida para síntese de novas moléculas bioativas, uma vez que já foram descritos derivados com alta atividade biológica, por exemplo: atividade antibacteriana, fungicida, anticâncer e antimalárica dos derivados furanílicos (AJIBOYE et al., 2016; ALNABULSI et al., 2016; LOGOGLU et al., 2010), atividade fungicida *in vitro* e *in vivo* de derivados de furanos e tiofenos (WANG et al., 2015), atividade anti-*Trypanossoma cruzi* de derivados de tiofenos (SILVA-JÚNIOR et al., 2016) e aumento da atividade antiproliferativa de derivado de triazol quando acrescido de núcleo furano ou tiofeno (ZHANG et al., 2015).

Membros da classe dos compostos heterocíclicos aromáticos, os furanos são constituídos por quatro átomos de carbono e um oxigênio, enquanto os tiofenos apresentam um enxofre na posição do oxigênio. Os furanos podem ser formados a partir do processamento térmico de alguns componentes alimentares tais como carboidratos, alguns aminoácidos e ácido ascórbico (SEOK et al., 2015), ocorrerem naturalmente como base estrutural de produtos naturais e farmacêuticos (CAO et al., 2013), ou ainda, podem ser encontrados em materiais sintéticos como corantes, cosméticos, compostos aromatizantes e fragrâncias (SAYAHİ et al., 2015). Já os tiofenos podem ser naturalmente encontrados em

combustíveis fósseis, derivados de petróleo ou como metabólitos secundários de plantas pertencentes à família *Asteraceae* (IBRAHIM et al., 2016).

Neste estudo, 18 compostos contendo núcleo furano ou tiofeno foram avaliados quanto a sua atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais humanas. O composto mais ativo (derivado furanílico **3g**) foi escolhido para estudos adicionais sobre morte celular e possíveis efeitos tóxicos em animais, de modo a contribuir para o desenvolvimento de uma nova alternativa terapêutica no combate ao câncer.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Investigar a atividade antitumoral de dezoito compostos derivados de furano e tiofeno, a toxicidade e modos de ação do composto mais ativo.

2.2 ESPECÍFICOS

- Determinar a citotoxicidade dos dezoito compostos em linhagens de células tumorais humanas;
- Avaliar a citotoxicidade dos enantiômeros furanílicos **3g** em células tumorais humanas e em células humanas saudáveis (PBMC e hemácias);
- Analisar morfologia celular de HL-60 após tratamento com o composto **3g**;
- Avaliar o mecanismo de morte celular induzido pelo composto **3g**;
- Avaliar potencial da membrana mitocondrial em células HL-60 após tratamento com o composto **3g**;
- Determinar a toxicidade aguda do composto **3g** em camundongos albinos *swiss*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CÂNCER

O câncer abrange mais de 100 tipos de patologias diferentes que são agrupadas por apresentarem divisão celular desordenada e invasão a órgãos e tecidos (INCA, 2015). Hanahan e Weinberg (2011) descreveram dez atributos os quais definem toda a diversidade patológica do câncer, a saber: autossuficiência em sinais proliferativos, evasão de supressores de crescimento, capacidade de invasão tecidual e metástase, instabilidade genômica e mutação, potencial replicativo ilimitado, indução de angiogênese e evasão da apoptose.

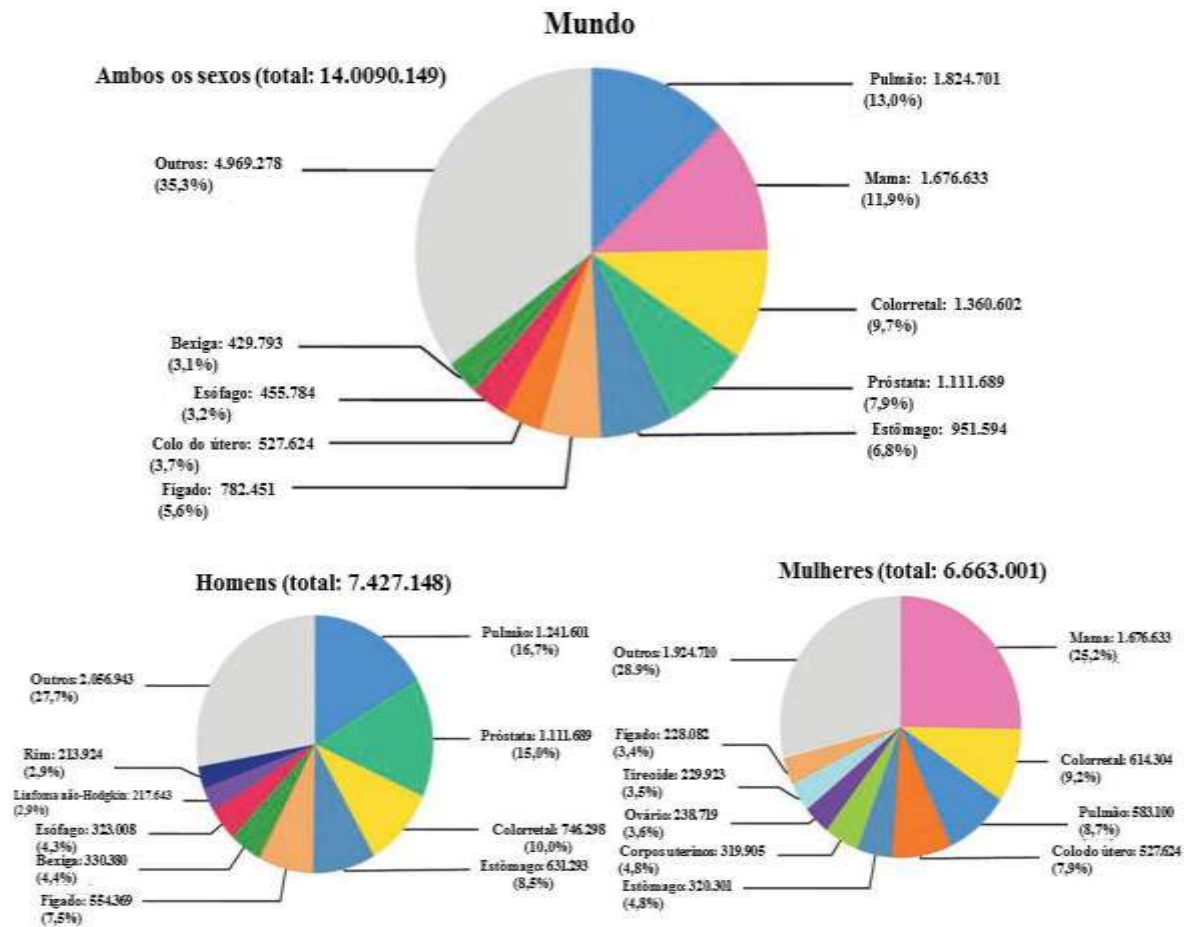
O câncer é consequência de múltiplas mutações celulares, as quais provocam disfunção dos reguladores do crescimento, seja por inativação de genes supressores de tumor ou intensificação de proto-oncogenes (ERDEM et al., 2014). As mutações celulares que dão origem a uma massa tumoral, processo conhecido como carcinogênese, podem ser iniciadas por diversos fatores endógenos ou exógenos ao organismo, tais como, mutações hereditárias, fatores epigenéticos e fatores químicos, físicos e biológicos.

3.1.1 Epidemiologia

Segundo, *International Agency for Research on Cancer* (IARC), a agência especializada em câncer da Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é uma enfermidade cuja ocorrência vem crescendo em ritmo alarmante, sendo extremamente necessárias novas estratégias de prevenção e contenção do câncer. Como consequência do crescimento da população idosa nos países desenvolvidos, há um aumento desproporcional do número de casos de cânceres, enquanto que em países em desenvolvimento o câncer causa mais vítimas fatais, devido à falta de detecção precoce e acesso ao tratamento (IARC, 2014).

De acordo com o último relatório realizado pelo projeto GLOBOCAN, houve 14,1 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes por câncer em todo mundo, em 2012, sendo os três tipos mais frequentes, os cânceres de pulmão, mama e colorretal. Entretanto, analisando separadamente por sexo, as enfermidades que mais acometem homens são os cânceres de pulmão, próstata e colorretal e em mulheres mama, colorretal e pulmão, respectivamente, são os tipos de câncer mais incidentes no mundo (Figura 1).

Figura 1: Estimativas dos tipos câncer de maior incidência no mundo em ambos os sexos, em homens e em mulheres, em 2012.



Fonte: STEWART; WILD, 2014.

Os tipos de câncer que mais causam morte em homens no mundo são pulmão, fígado e estômago, com 23,6%, 11,2% e 10,1% das mortes registradas por câncer, respectivamente. Por outro lado, os cânceres de mama e pulmão são responsáveis por 14,7% e 13,8% das mortes por câncer em mulheres (STEWART; WILD, 2014).

No cenário brasileiro, o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) é o órgão vinculado ao Ministério da Saúde responsável por ações de prevenção e controle do câncer no país. Em última edição o INCA estima para o biênio 2016-2017 a ocorrência de aproximadamente 600 mil novos casos de câncer no território nacional. Onde os tipos mais frequentes serão próstata, trato respiratório inferior e colorretal em homens, e em mulheres mama, colorretal e colo do útero (Figura 2) (INCA,2016).

Figura 2: Dez tipos de câncer mais frequentes, por sexo, estimados para 2016 no Brasil, excerto câncer de pele não-melanoma.

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%			Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

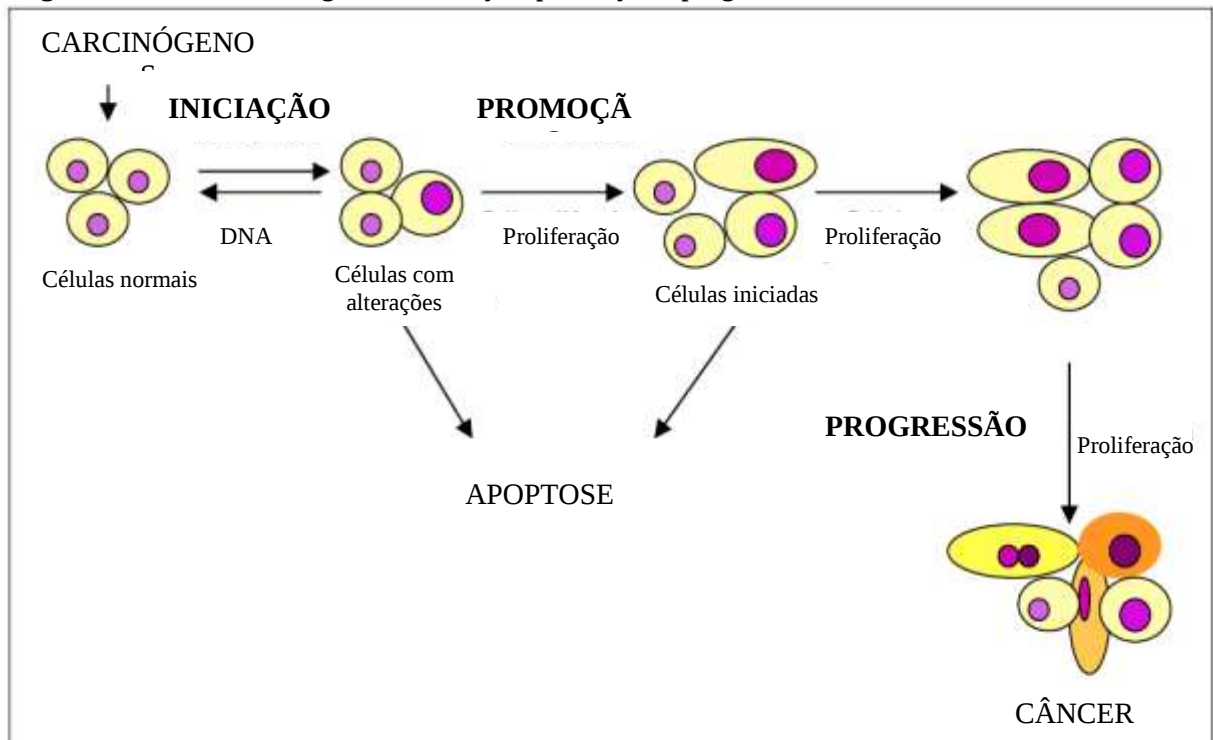
Fonte: INCA, 2015.

3.1.2 Carcinogênese

A carcinogênese ou oncogênese são termos que designam o processo de desenvolvimento de uma neoplasia, desde as alterações no genoma até a formação do tumor maligno. Este processo é consequência de progressivas de alterações na capacidade proliferativa e diferenciativa que conduzem à transformação de células normais em derivadas altamente malignas (ERDEM et al., 2014). A carcinogênese é virtualmente dividida em três fases: iniciação, promoção e progressão (Figura 3).

A iniciação é marcada por alterações permanentes no ácido desoxirribonucleico (DNA) provocadas por agentes carcinogênicos ou fatores epigenéticos. Já a promoção é caracterizada por proliferação clonal das células, além disso, ocorrem mutações que beneficiam a proliferação das células iniciadas e o desenvolvimento de células pré-neoplásicas. No decorrer da iniciação e promoção, apoptose e proliferação celular ocorrem em taxas equilibradas. Durante a progressão este equilíbrio é modificado e as células multiplicam-se de forma descontrolada, nessa fase também se inclui a forma agressiva e metastática da doença (OLIVEIRA et al., 2007; SAFARZADEH; SANDOGHCHIAN; BARADARAN, 2014).

Figura 3: Fase da carcinogênese: iniciação, promoção e progressão.



Fonte: OLIVEIRA et al., 2007.

As causas de indução ao câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo. Mutações hereditárias intensificam as chances de o portador desenvolver tumor durante sua vida, por exemplo, mutações nos genes supressores de tumor *BRCA1* e *BRCA2* aumentam o risco do câncer de mama em 35-60% e 55-85%, respectivamente, além disso, desde a década de 1970 se sabe que variantes do gene *BRCA* estão associados ao câncer hereditário de ovário (CHANDLER; BILGILI; MERNER, 2016). Mutações no gene *HOXB13* são consideradas a principal causa genética do câncer de próstata hereditário, o qual representa 10% da incidência deste tipo de câncer (CHANDRASEKARAN et al., 2017).

Fatores epigenéticos influenciam a expressão gênica independentes de mutações nas sequências de bases do DNA. Alterações nesses fatores estão associadas a diversas doenças humanas, inclusive o câncer. Compreendem alterações epigenéticas: metilação do DNA, alterações estruturais das histonas e nucleossomos variantes (ERDEM et al., 2014; FANE et al., 2017; KOSCHMANN et al., 2017). A metilação do DNA é um evento bastante descrito na literatura. Em geral, quando ocorre a hipermetilação da região promotora de um gene sua expressão é encerrada, sendo este um evento fisiológico de controle de expressão gênica, no entanto, alterações nos níveis de metilação do DNA são associadas ao surgimento de diversos tumores (PARTIN et al., 2016). A hipermetilação do promotor *BRCA1* tem sido observada

nos carcinomas de mama e ovário (CHAN et al., 2002), de mesmo modo, hipermetilação do promotor *GSTP1* tem sido presenciado em 80%-90% dos casos de câncer de próstata (NESTE et al., 2012).

Os agentes carcinogênicos exógenos são divididos em três diferentes categorias: químicos, físicos e biológicos.

Os carcinógenos químicos constituem uma grande variedade de substâncias (naturais ou sintéticas) as quais apresentam dano ao DNA. Alguns desses, podem estar contidos no ambiente, sendo assim, evitáveis ou não. Por exemplo, carcinógenos originários da preparação de produtos químicos (organoclorados e pesticidas) podem ser evitados como riscos ocupacionais, no entanto, carcinógenos poluentes (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos), em altas concentrações no ar, dificilmente são evitáveis (SMITH; OERTLE; PRATO, 2014).

Substâncias químicas presentes em cigarros são amplamente apontadas como carcinógenos (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, benzeno, arsênico, cromo, níquel, etc), sendo indutores de diversos cânceres do trato respiratório, principalmente câncer de pulmão (PROCTOR, 2012). Algumas classes de carcinógenos químicos e os tipos de cânceres por eles induzidos estão dispostos na Tabela 1.

Radiação eletromagnética (luz ultravioleta, raios X e raios gama) e radiação ionizante (partículas α , β e γ) são consideradas carcinógenos físicos. A luz ultravioleta, especificamente o UVB, é um pré-requisito para produção de vitamina D pelo organismo, onde participa na regulação do metabolismo do cálcio e fosfato, mantendo a saúde esquelética, e ainda auxilia na prevenção de doenças cardiovasculares e alguns tipos câncer (WACKER; HOLICK, 2013). No entanto, raios UVA e UVB estão fortemente associados ao desenvolvimento de câncer de pele melanoma e não-melanoma (GRIGALAVICIUS et al., 2016; WACKER; HOLICK, 2013; MOAN et al., 2015). Os efeitos positivos ou nocivos relacionados à luz solar são dependentes de alguns fatores tais como: sazonalidade, tempo por dia, altitude e latitude, envelhecimento, poluição do ar, e pigmentação da pele (WACKER; HOLICK, 2013). Inclusive, pessoas com determinadas características fenotípicas são consideradas grupo de risco ao desenvolvimento de câncer de pele, como pessoas de pele clara, com histórico na família, cabelos ruivos, e tendências a queimaduras e sardas (GRIGALAVICIUS et al., 2016).

Tabela 1: Classes de carcinógenos químicos, tipos de cânceres induzidos, onde podem ser encontrados e riscos por exposição aguda.

Carcinógenos	Cânceres	Fonte	Exposição aguda
Organoclorados	Mama, colorretal, pancreático, próstata, pulmão, ora/nasofaríngeo, tireoide, adrenal, linfoma e vesícula biliar.	Pesticidas e solventes.	Náusea, vômito, tremores, coma, convulsões, tosse, falta de ar, letargia e inconsciência.
Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos	Mama, pele, pulmão, bexiga e gastrointestinal.	Fumaça de cigarro, emissão veicular, composições ocupacionais e farmacêuticas.	Náusea, cefaleia e irritação dermal.
Compostos orgânicos voláteis	Pulmão, leucemia, nasofaríngeo, linfomatomoiótico e sinonasal.	Ar, lençóis freáticos, fumaça de cigarro, emissão veicular e gasolina.	Náusea, tontura provocada por cefaleia, sonolência, irritação ocular e respiratória.
Pesticidas	Mama, colorretal, pancreático, próstata e vesícula biliar.	Ar, lençóis freáticos e vegetação.	Náusea, vômito, tremores, coma, convulsões, tosse, falta de ar, letargia e inconsciência.

Fonte: SMITH; OERTLE; PRATO, 2014.

Vários microrganismos têm se mostrado potenciais indutores de malignidade celular, em especial os vírus e bactérias, os quais utilizam de mecanismos que envolvem a inserção de material genético nos cromossomos humanos, favorecendo o surgimento de tumores. A associação entre o Papiloma Vírus Humano (HPV) e o desenvolvimento do câncer de colo de útero, já se tornou tão aceita, que em maio de 2011 a senadora Vanessa Grazziotin lançou o Projeto de Lei do Senado nº 238, no qual dispõe sobre a imunização de mulheres na faixa etária de nove a quarenta anos contra o HPV, com objetivo de prevenir o desenvolvimento do câncer de colo do útero no Brasil. Além disso, outros microrganismos carcinogênicos já estão bem estabelecidos na literatura, por exemplo, indivíduos com hepatite B crônica têm maior risco de desenvolver o carcinoma hepatocelular (MELCHARDT et al., 2013) e poliomavírus (Vírus BK, Vírus JC, SV40), HPV e Citomegalovírus humano (HCMV) são frequentemente encontrados em pacientes com câncer de próstata (MARTINEZ-FIERRO et al., 2010).

Em 2012, a IARC apresentou uma avaliação dos carcinógenos biológicos no mundo, onde, reuniu diversos agentes biológicos tais como vírus, bactérias e parasitas e seus respectivos riscos de cânceres humanos (IARC-MONOGRAPHS, 2012). Algumas destas associações, agente biológico e risco de câncer, estão representadas na Tabela 2.

Tabela 2: Agentes carcinógenos biológicos indutores de câncer humano.

Organismo	Espécie	Câncer
Vírus	Epstein-Barr vírus (EBV)	Nasofaríngeo, estômago e linfomas.
	Vírus da Hepatite B	Carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma e linfoma não-Hodgkin.
	Vírus da Hepatite C	Carcinoma hepatocelular.
	Herpesvirus do Sarcoma de Kaposi	Sarcoma de Kaposi e mieloma múltiplo.
	Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)	Sarcoma de Kaposi, linfoma de Hodgkin e não-Hodgkin, colo do útero, anogenital, pele, conjuntiva, pulmão e fígado.
	Papiloma Vírus Humano (HPV)	Colo do útero, anogenital, trato aerodigestivo superior e pele.
	Vírus linfotrópico de células T humano tipo 1 (HTLV-1)	Linfoma de células T.
Platelmintos	<i>Opisthorchis viverrini</i> / <i>Clonorchis sinensis</i>	Colangiocarcinoma e hepatocelular.
	<i>Schistosoma haematobium</i>	Bexiga.
Bactéria	<i>Helicobacter pylori</i>	Estômago, linfoma gástrico MALT e esôfago.

MALT: Tecido linfoide associado à mucosa. **Fonte:** Adaptado de SMITH; OERTLE; PRATO, 2014.

3.2 CICLO CELULAR

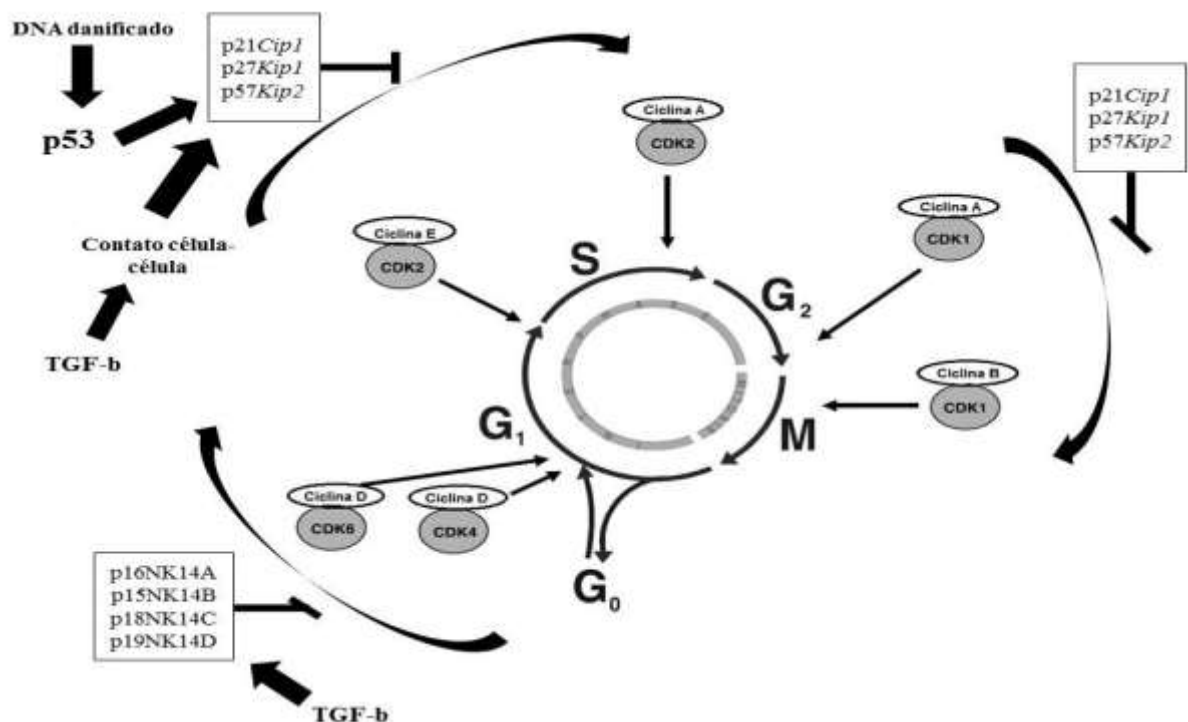
O ciclo celular é uma série de eventos sistemáticos que resultam na replicação celular. É caracterizado por três estádios interfásicos (G1, S e G2) e uma fase de divisão chamada mitose. Durante a interfase, a célula se prepara para divisão, promovendo uma intensa síntese de proteínas, a duplicação de suas organelas e aumento de seu tamanho. Especificamente na fase S ocorre a duplicação do material genético, nesse momento uma célula diploide (2N) se torna temporariamente quadriploide (4N) (WEINBERG, 2008).

A mitose basicamente é dividida em quatro fases prófase, metáfase, anáfase e telófase. Na prófase ocorre a condensação da cromatina, formando pequenos grânulos visíveis dentro do núcleo, no final dessa fase a membrana nuclear é degenerada. Na metáfase a cromatina está condensada em seu nível máximo, formando os cromossomos, estes se encontram ligados a microtúbulos (fuso acromático), de forma que os cromossomos permanecem alinhados no centro da célula. A anáfase é marcada por encurtamento do fuso acromático e consequente migração dos cromossomos para os lados opostos da célula. Por fim, na telófase os cromossomos chegam às extremidades da célula, a membrana nuclear é reestabelecida e por invaginação da membrana plasmática, a célula mãe é dividida em duas células filhas (citocinese) (WEINBERG, 2008).

Existe, ainda, uma fase do ciclo celular chamada G₀, onde as células se encontram indefinidamente em interfase. Esta fase pode ser transitória (quiescência) ou permanente (após diferenciação ou senescência celular). Na maioria dos tecidos adultos, as células se encontram diferenciadas, a fim de realizem funções específicas, essas são incapazes de se dividirem e são mantidas em G₀ (OTTO; SICINSKI, 2017).

A progressão pelo ciclo celular é altamente regulada por complexos proteicos compostos por ciclinas e quinases dependentes de ciclina (CDK). São conhecidos nove tipos diferentes de CDKs, no entanto, apenas cinco delas tem seu papel definido na progressão do ciclo celular: CDK4, CDK6 e CDK2 durante G₁, CDK2 em S e CDK1 em G₂ e mitose. Vale a pena ressaltar que os níveis de CDKs são constantes ao longo do ciclo celular, contudo, os níveis de ciclinas são alternados conforme fase do ciclo (VERMEULEN; BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003). As atividades das CDKs são controladas positivamente por aumento dos níveis de ciclinas (A, B, D e E) e negativamente por proteínas da família de Inibidores de CDK (p16, p15, p18 e p19) inibidores de CDK4/6 e (p57, p27 e p21) inibidores de CDK1/2 (OTTO; SICINSKI, 2017) (Figura 4). O complexo ativo ciclina D-CDK4/6 exerce papel

Figura 4: Fases do ciclo celular. Pontos de atividade regulatória do complexo ciclina-CDK e seus respectivos inibidores.



Elipses: Pontos de regulação positiva do ciclo celular através do complexo ativo ciclina-CDK; **Caixas:** regulação negativa exercida por proteínas Inibidoras de CDKs. A inibição proliferativa pode ser desencadeada por inibidores mitóticos como TGF-β, inibição de contato célula-célula ou por danos ao DNA. **Fonte:** adaptado de VERMEULEN; BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003.

chave na transição de G1 para S, por sequestro dos inibidores p21 e p27 e principalmente por fosforilação da proteína pRB, dessa forma, permite que o fator de transcrição E2F (antes ligado a pRB) ative a transcrição de diversos genes envolvidos para progressão para fase S, incluindo o gene da ciclina E. A ciclina E por sua vez ira ativar a CDK2 que também participara da fosforilação da pRB (OTTO; SICINSKI, 2017). A ativação aberrante de CDKs é frequentemente encontrada em cânceres humanos, de forma que proteínas reguladoras são frequentes alvos na terapia do câncer, por exemplo, o Fator de Crescimento Transformante β (TGF- β) impede a fosforilação de pRB e consequentemente mantém a célula em G1, da mesma forma, os inibidores p15, p16, p18 e p19 inibem a formação do complexo ciclina-CDK4/6 (SINGH et al., 2017). Em casos de danos ao DNA, as células possuem mecanismos de defesa chamados *checkpoints* ou pontos de checagem, onde o ciclo celular é bloqueado por um intervalo de tempo suficiente para que danos sejam reparados, em geral, atuam ao impedir a formação do complexo ciclina-CDK. A ativação da p53 é um mecanismo de defesa amplamente descrito na literatura (MCCLOY et al., 2014; OTTO; SICINSKI, 2017; SINGH et al., 2017), onde essa proteína induz a transcrição da p21, que por sua vez, impede a formação do complexo ciclina E-CDK2 impossibilitando a entrada na fase S (OTTO; SICINSKI, 2017) (Figura 4). No entanto, concluída checagem, a p53 pode tomar dois caminhos distintos: prosseguir com o ciclo celular, induzindo a transcrição da proteína MDM2, que então irá induzir a degradação da p53 (*feedback* negativo), ou dirigir a célula para morte programada (apoptose) através a transcrição da proteína pró-apoptótica BAX. Anomalias na proteína p53 acarretam na instabilidade genômica, acúmulo de mutações e proliferação celular desordenada, elementos que contribuem para o desenvolvimento do câncer (PINTO; BROSTEIN, 2008). p53 mutantes estão presentes em todos os tipos de câncer, com frequências variando de 5% a 90% (STEWART; WILD, 2014).

3.3 MORTE CELULAR E CÂNCER

O desenvolvimento e a homeostasia dos organismos são dependentes do equilíbrio entre proliferação e morte celular, interferências nesse tênue equilíbrio podem causar doenças graves em especial o câncer (BERGHE et al., 2014). Dessa forma, morte celular programada tem papel essencial na defesa do organismo, uma vez que impedem que células danificadas ou mutadas possam se proliferar (ZIMMERMAN et al., 2013).

A forma clássica de categorização de morte celular se restringia apenas a apoptose, autofagia e necrose. No entanto, a necrose que antes era vista unicamente como um processo

acidental ou patológico, foi recentemente retratada como um processo organizado controlado geneticamente, diferenciando em necrose acidental e necrose regulada ou necroptose (BERGHE et al., 2014; BERGHE et al., 2013).

A morte celular por autofagia, necrose e apoptose por terem sido descritas há mais tempo, são mais bem compreendidas quanto aos processos celulares e bioquímicos. A autofagia é caracterizada por um processo catabólico iniciado com a formação de autofagossomas, estruturas de membrana dupla que envolvem macromoléculas ou organelas destinadas a reciclagem. A princípio, autofagia representa um mecanismo de resistência celular a períodos de restrição de nutrientes ou estresse, entretanto, sob estresse excessivo pode acarretar em suicídio celular (OUYANG et al., 2012).

Células apoptóticas apresentam morfologia típica incluindo encolhimento celular, blebbing de membrana, condensação e marginalização da cromatina, perda de aderência a células adjacentes e matriz extracelular e formação de corpos apoptóticos (OUYANG et al., 2012). Células em apoptose também são conhecidas por alterações bioquímicas, como fragmentação do DNA cromossomal, exportação da fosfatidilserina para a fase externa da membrana plasmática, alterações na permeabilidade de membrana mitocondrial com conseguinte liberação de proteínas intermembranares, ativação de caspases, por fim fagocitose (BERGHE et al., 2013).

A morte celular por apoptose é uma das barreiras contra o surgimento do câncer. Como já mencionado, a morte programada é um sistema de defesa contra proliferação de células defeituosas. Nesse sentido, a proteína p53 exerce um papel chave na apoptose, uma vez que é capaz de bloquear temporariamente o ciclo celular, possibilitando a checagem e reparo do DNA. Quando não é possível o reparo, a p53 ativa a transcrição de proteínas pró-apoptóticas, por exemplo, Bax, provocando a desestabilidade da membrana mitocondrial e liberação de proteínas envolvidas na cascata das caspases (citocromo c e Smac/DIABLO) (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011; WEINBERG, 2008).

A necrose clássica é caracterizada por liberação do conteúdo citoplasmático provocando inflação local. Basicamente ocorre um aumento do volume citoplasmático (oncoses) que adquire um aspecto translúcido, agregação da cromatina formando estruturas pequenas e irregulares, inchaço das organelas citoplasmáticas e ruptura da membrana plasmática com consequente liberação do citosol (GALLUZI et al., 2015).

A necroptose representa uma forma alternativa de morte celular programada, um elo entre apoptose e necrose, sem a ativação de caspases detectáveis (VOIGT et al., 2014). Esta

modalidade de morte celular é muito comum em diversas formas de neurodegeneração e morte infringida por isquemia ou infecção (NIKOLETOPOULOU et al., 2013).

Com o avanço de estudos na área de morte celular, novas categorias de morte foram descritas como *ferroptosis*, piroptose, NETose, *entosis*, anoicose, excitotoxicidade e degeneração Walleriana (BERGHE et al., 2013). A elaboração de novas modalidades de morte celular foi necessária, pois pesquisas nessa área evidenciaram características a nível bioquímico, celular e fisiológico que não eram condicentes a nenhum dos tipos clássicos de morte celular (BERGHE et al., 2013). Uma breve descrição de alguns dos tipos de morte celular está presente na Tabela 3.

Tabela 3: Tipos de morte celular e suas características.

TIPOS DE MORTE CELULAR	CARACTERÍSTICAS	REFERÊNCIAS
<i>Ferroptosis</i>	Tipo de morte celular dependente de ferro controlada pela glutathione peroxidase 4 (GPX4).	GALLUZI et al., 2015
Piroptose	Está associada a uma inflamação intensa com liberação de conteúdos citoplasmáticos e citocinas pró-inflamatórias incluindo IL-1 β .	DOITSH et al., 2014
NETose	É caracterizada pela liberação de uma rede, composta de DNA associado a proteínas citrulinadas.	BERTHELOT et al., 2016
<i>Entosis</i>	Processo ativo onde uma célula invade outra adjacente, processo também chamado de canibalismo celular.	WEN et al., 2014
Anoicose	É provocada por perda da interação com a matriz extra-celular.	DEY et al., 2015
Excitotoxicidade	Tipo específico de neurotoxicidade mediada pelo glutamato.	LAI; ZHANG; WANG, 2014
Degeneração Walleriana	Designado para degeneração de axônios e suas bainhas de mielina após traumatismo do nervo.	CONFORTI; GILLEY; COLEMAN, 2014

3.4 QUIMIOTERRAPIA

Hoje há uma grande variedade de agentes quimioterápicos disponíveis no mercado, contudo, esses agentes agem em mecanismos celulares básicos, de forma que nem sempre discriminam células saudáveis das células tumorais, provocando os efeitos colaterais (FERNANDES et al., 2016; WU et al., 2013). A falta de especificidade pelos quimioterápicos convencionais tem sido o principal empecilho na eficiência do tratamento de câncer (TRANOY-OPALINSKI et al., 2014; TURKSON, 2017).

Alguns agentes quimioterápicos podem ser agrupados com base em seu mecanismo de ação. Por exemplo, a classe de agentes alquilantes é formada por fármacos que substituem átomos de hidrogênio por radical alquil, se ligam ao DNA e impedem a abertura da dupla hélice de forma a prejudicar replicação do DNA (TSE et al., 2017). Algumas classes de fármacos quimioterápicos e seus respectivos mecanismos de ação são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Classe de quimioterápicos e respectivos mecanismos de ação farmacológica.

Classe farmacológica	Fármacos quimioterápicos	Mecanismo de ação
Alquilantes	Mostarda nitrogenada, mostarda fenil-alanina, ciclofosfamida, bussulfam, nitrosuréias, cisplatina, carboplatina e ifosfamida.	Moléculas capazes de substituir H por um radical alquil. Se ligam ao DNA e impedem a abertura da dupla hélice.
Antimetabólitos	6-mercaptopurina, 6-tioguanina, 5-fluoruracil, metotrexato e citosina-arabinosídeo C.	Inibem a biossíntese de componentes essenciais ao DNA e RNA.
Antibióticos	Mitomicina C, actinomicina D, mitramicina, bleomicina, daunorrubicina, adriamicina, mitraxantona e epirubicina.	São substâncias antibióticas, que possuem anéis insaturados que permitem a incorporação de excesso de elétrons e consequente produção de radicais livres reativos.
Inibidores mitóticos	Vincristina, vimbrastina, vindesina, VP-16, etoposídeo, VM-26 e teniposídeo.	Paralisam a mitose na metáfase, devido sua ação nas tubulinas que constituem o fuso mitótico.

Fonte: INCA, 2016.

O uso isolado dos quimioterápicos convencionais causam graves efeitos colaterais (Tabela 5). Tendo isso em vista, estratégias farmacêuticas vêm sendo desenvolvidas ao longo dos anos com propósito de potencializar os efeitos antitumorais e prologar a expectativa de vida dos pacientes. O uso combinado de drogas quimioterápicas tem sido uma estratégia bastante eficaz, elevando significativamente a expectativa de vida de paciente que antes eram desenganados, por exemplo, o uso combinado de gencitabina e cisplatina (GC) ou metotrexato, vimblastina, doxorubicina e cisplatina (MVDC) são recomendados para o câncer de bexiga metastático (MAASE et al., 2000).

Tabela 5: Fármacos quimioterápicos e seus respectivos efeitos colaterais.

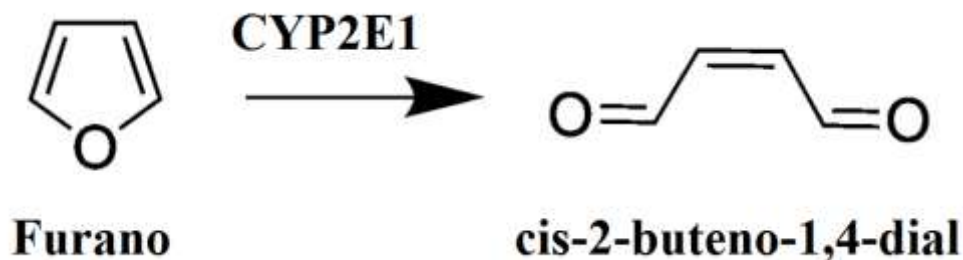
Fármacos quimioterápicos	Efeitos colaterais	Referências
Ciclofosfamida	Danos a bexiga (cistite hemorrágica), imunossupressão e alopecia.	Fraiser; Kanekal; Kehrer, 1991.
5-fluoruracil	Estomatite, esofagofaringite, diarreia, alterações dermatológicas, alopecia, depressão hematopoiética, febre, neurotoxicidade e cardiotoxicidade.	Kennedy, 1999
Metotrexato	Mucosite, mielossupressão e nefrotoxicidade.	Condit; Chanes; Joel, 1969; Ulrich et al., 2001.
Bleomicina	Toxicidade pulmonar e fibrose intestinal.	Rudders; Hensley, 1973; Jules-Elysee; White, 1990.
Vincristina	Grande potencial neurotóxico incluindo convulsões, alterações mentais, hipotensão ortostática, secreção inadequada de hormônios antidiuréticos e potencialização de doenças neurológica preexistente.	Rosenthal; Kaufman, 1974.

3.5 FURANOS

Furanos são compostos heterocíclico formados por um anel aromático de cinco membros (quatro carbonos e um oxigênio). A principal causa de sua formação está associada a processos térmicos, particularmente em tratamentos térmicos de alimentos, por exemplo, cozimento, torrefação, pasteurização e esterilização (SEOK et al 2015), além disso, são produtos resultantes de combustão, fumaça de cigarro, queima de matéria orgânica e exaustão de motores (GILL et al., 2011). Os furanos podem estar presentes em materiais sintéticos e agroquímicos, tais como biorreguladores, óleos essenciais, cosméticos, corante, fotossensibilizantes, compostos aromatizantes e fragrâncias, fibras têxteis, detergentes, retardadores de fogo, e materiais polímeros da indústria (SAYAH et al., 2015).

Tendo em vista a vasta ocorrência dos furanos em produtos e alimentos de uso cotidiano, estes foram muitas vezes alvo de estudos toxicológicos, de forma que já é bem conhecida a toxicidade do furano ao organismo (principalmente ao fígado) e seu efeito carcinógeno em roedores. A toxicidade do furano está intimamente ligada à ação da enzima citocromo P450 2E1 (CYP2E1), esta catalisa a reação de oxidação do anel furano, formando o α,β -dialdeído insaturado cis-2-buten-1,4-dial (BDA) (Figura 5). O DBA é o responsável por danos ao fígado e rins (SEOK et al., 2015, GATES; LUAND; PERTENSON, 2012; GATES et al., 2014).

Figura 5: Reação de oxidação do furano catabolizada pelo citocromo P450.



Fonte: GATES; LUAND; PERTENSON, 2012.

No entanto, derivados de furano têm sido propostos como promissores compostos bioativos dotados de variadas atividades biológicas, tais como antibacteriana (AJIBOYE et al., 2016), antifúngica (WANG et al., 2015), antimalárica (ALNABULSI et al., 2016) e antitumoral (NICOLAOU et al., 2015; ZHANG et al., 2015).

Lukevits e Demicheva (1993) reuniram diversas atividades biológicas atribuídas a derivados simples de furano, a saber, atividade bactericida para bactérias Gram-positivas e negativas, atividade antiviral inclusive para o vírus da hepatite C HCV-1, atividade herbicida, atividade psicotrópica, propriedades anti-inflamatórias, efeitos cardiovasculares hipotensivos, efeito hipoglicemiante e antiulcerogênico.

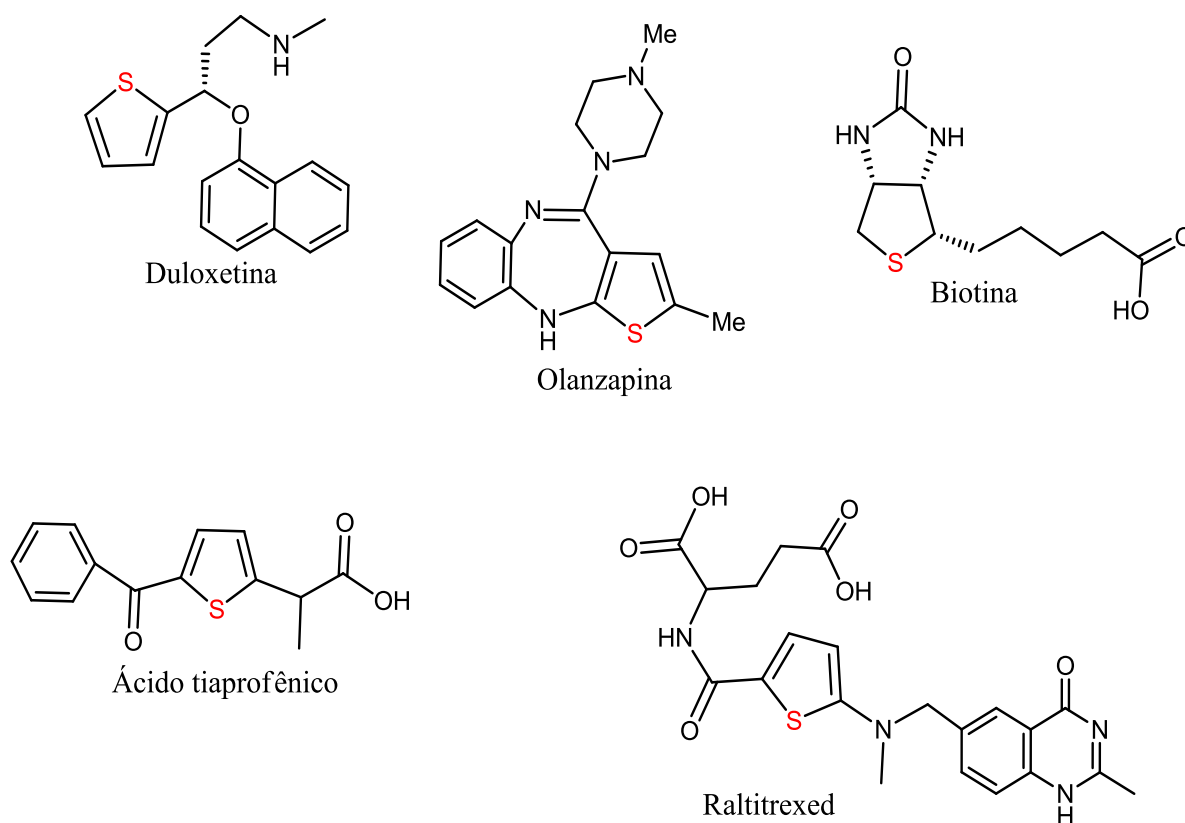
É interessante que a depender do ligante, o anel furano pode ser o princípio ativo ou o auxiliar na atividade biológica, apresentar diferentes mecanismo de ação ou apenas potencializar a atividade de seu ligante. Por exemplo, calconas ligadas a furanos apresentam atividade antiproliferativa acentuada (ZHANG et al., 2015); furano-amidinas exercem efeito citotóxico por serem intercalantes de DNA (ALNABULSI et al., 2016); e vinil furanos são conhecidos como indutores de estresse oxidativo (AJIBOYE et al., 2016). Dessa forma, derivados de furano representam interessantes moléculas de investigação terapêutica que merecem ser exploradas.

3.6 TIOFENOS

Tiofenos são compostos heterocíclicos aromáticos de cinco membros, formados por quatro átomos de carbono e um átomo de enxofre e apresentam-se como líquido incolor, solúvel em água, com odor semelhante ao benzeno à temperatura ambiente (STEFANI, 2009). Podem ser encontrados em plantas do gênero *Tagetes* (Asteraceae), sobretudo nas raízes, onde exercem função biocida de amplo espectro (inseticida, nematicida, antifúngico, germicida e citotóxica) (MAROTTI et al., 2010).

Devido às diversas possibilidades de reações de substituição em seu núcleo, tiofenos têm sido usados como ponto de partida para síntese de vários derivados de diferentes perfis farmacológicos, entre os quais estão antibiótico, antifúngico, antioxidante, anestésico local, anti-inflamatório, antialérgico e antitumoral (ASIF, 2016). Muitos desses compostos derivados de tiofenos, já são comercializados como medicamentos de referência, como por exemplo, a duloxetina (Cymbalta®), indicada para tratamento da depressão (BYMASTER et al., 2003), a olanzapina (Zyprexa®) indicada para o tratamento de esquizofrenia, biotina (vitamina B7 ou H), ácido tiaprofênico (Surgam®), um anti-inflamatório (STEFANI, 2009) e raltitrexed (Tumodex®) indicado para o tratamento de câncer colorretal (OLIVEIRA et al., 2015) (Figura 6).

Figura 6: Fármacos contendo núcleo tiofeno.



3.7 COMPOSTOS QUIRAIS E IMPLICAÇÕES FARMACOLÓGICAS

Estereoisômeros são moléculas com a mesma composição atômica, diferentes apenas no arranjo espacial de seus átomos. Estes isômeros podem ser divididos em estereoisômeros geométricos, quando não apresentam atividade óptica, ou estereoisômeros ópticos quando possuem atividade óptica e centro quiral (átomo de carbono provido de quatro ligantes

diferentes). A depender do número de centros quirais os estereoisômeros ópticos podem apresentar-se como enantiômeros (1 centro quiral) ou diastereoisômeros (dois ou mais centros quirais). Os enantiômeros são relacionados entre si por apresentarem simetria plana, ou seja, são imagens especulares um do outro, além disso, compartilham as mesmas características físico-químicas, como ponto de fusão, solubilidade e ionização (LIMA, 1997). No entanto, diferem em suas propriedades biológicas como distribuição, metabolismo e toxicidade (KASPRZYK-HORDERN, 2010).

Estimasse que 20-25% dos fármacos disponíveis no mercado sejam estereoisômeros ópticos ou medicamentos quirúrgicos (LEES et al., 2012) e que alguns deles ainda são comercializados em mistura racêmica ou racemato (mistura dos enantiômeros na proporção de 1 : 1), como a talidomida, pioglitazona, bupropiona, prasugrel, donepezil e lorazepam (JACQUES et al., 2015). A comercialização de substâncias racêmicas pode ocorrer em consequência da dificuldade na separação quiral, custo elevado da síntese estereoseletiva ou porque apenas o racemato foi avaliado (KASPRZYK-HORDERN, 2010). Isto posto, pesquisas têm sido realizadas para identificação e avaliação isolada de tais fármacos, já que a comercialização do racemato pode representar um transtorno para indústria farmacêutica, uma vez que um dos enantiômeros pode apresentar graves efeitos colaterais ou ainda protagonizar graves danos ambientais (MARTÍNEZ-GIRÓN; MARINA; CREGO, 2016). Por exemplo, a talidomida era considerada um excelente fármaco com propriedades sedativa e anti-inflamatória e foi amplamente utilizada nos anos de 1957 a 1962 para dores matinais, sobretudo em mulheres grávidas, porém, simultaneamente foi observado um surto de recém-nascidos com malformação, o que posteriormente foi associado ao uso da talidomida. Desde então, foi reconhecido o potencial teratogênico da talidomida e a importância da elucidação dos fármacos quirais, pois nesse caso, apenas o S(-)-enantiômero era teratogênico enquanto o R(+)-enantiômero era responsável pelos efeitos terapêuticos, todavia, o R(+)-enantiômero poderia sofrer inversão quiral no organismo (instabilidade quiral) provocando os efeitos danosos (KASPRZYK-HORDERN, 2010; LÓPES-SERNA et al., 2013). Esses efeitos opostos podem estar relacionados à forma como cada enantiômero é metabolizado no organismo (metabolismo estereoseletivo) (MEYRING; MUHLENBROCK; BLASCHKE, 2000).

Além disso, resíduos de fármacos quirais podem representar diferentes graus de ecotoxicidade ainda que fabricados como racemato, podendo ser degradados estereoseletivamente no organismo humano e/ou durante tratamento de águas residuais resultado do metabolismo microbiano (VAZQUEZ-ROIG et al., 2014) por exemplo, resíduos

de S-enantiômeros de propranolol e fluoxetina são mais tóxicos para a espécie de peixe *Pimephales promelas* que seus análogos quirais (LÓPES-SERNA et al., 2013). Ademais, outras substâncias quirais de importância econômica representam diferentes impactos ambientais a depender de sua conformação quiral. O fungicida difenoconazol, bastante utilizado em lavouras de arroz, representa um importante poluidor de ecossistemas aquáticos, no entanto, na conformação de 2S,4S-difenoconazol apresenta maior toxicidade para organismos aquáticos (*Scenedesmus obliquus*, *Daphnia magna* e *Danio rerio*) e menor efeito fungicida, que seus alternativos quirais (DONG et al.,2013).

ARTIGO I

ATIVIDADE ANTITUMORAL DE NOVOS COMPOSTOS DERIVADOS DE FURANOS E TIOFENOS 2-SUBSTITUÍDOS

ATIVIDADE ANTITUMORAL DE NOVOS COMPOSTOS DERIVADOS DE FURANOS E TIOFENOS 2-SUBSTITUÍDOS

Bruno Iraquitã Miranda da Silva^a; Dartagnan de Sá Pires Ferreira^b; Anne Cecília Nascimento da Cruz^a, Jefferson Luiz Princival^b; Jaciana do Santos Aguiar^a; Teresinha Gonçalves da Silva^{a*}.

^a Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brasil.

^b Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brasil.

*Autor correspondente

Teresinha Gonçalves da Silva, Departamento de Antibióticos, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil.

Telefone: +55 81 2126-8866

Endereço de e-mail: teresinha.goncalves@pq.cnpq.br

Resumo

Introdução: Agentes quimioterápicos convencionais apresentam graves efeitos colaterais como mielossupressão, alopecia e alterações gastrintestinais (náusea, vômitos e diarreia) o que muitas vezes inviabiliza o tratamento. Diante disso, é constante a busca por novas estratégias terapêuticas com maior eficiência e menor agressividade aos pacientes. Compostos heterocíclicos aromáticos tais como furano e tiofeno são bases para síntese de novas moléculas bioativas, das quais, já foram descritas diferentes atividades biológicas em particular atividade antiproliferativa. Neste estudo, derivados de furanos e tiofenos foram avaliados quanto a sua atividade antitumoral.

Métodos: Nove derivados furânicos e 9 tiofênicos foram submetidos ao ensaio de citotoxicidade *in vitro* em diferentes linhagens de células tumorais humanas (NCI-H292, HT-29, MCF-7, Hep-2, MOLT-4, HL-60 e K-562) e células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC). Hemácias humanas foram utilizadas para avaliar uma possível atividade hemolisante das substâncias. Foram avaliadas a eficácia do racemato da substância mais ativa,

3g, bem como a via de morte celular através da análise da morfologia, potencial apoptótico e potencial de membrana mitocondrial em células HL-60. A toxicidade aguda do **3g** foi avaliada *in vivo*.

Resultados: Dois derivados de furano (**3e** e **3g**) foram citotóxicos para quatro ou mais linhagens cancerígenas, sendo, a substância **3g** citotóxica em todas as linhagens celulares, em mistura racêmica (**rac-3g**) ou em resolução enantiomérica *r* (**r-3g**). Os valores de CI_{50} em diferentes tempos de tratamento (24, 48 e 72 h) revelaram a ação tempo-dependente da substância **3g** tanto em células tumorais (HL-60 e K-562) quanto em células saudáveis, PBMC. Em ambas as conformações **3g** apresentou CI_{50} , em PBMC, superior ao fármaco padrão doxorubicina, dessa forma, mostrou ser menos citotóxica para esse tipo celular. A substância **3g** também não causou danos a membrana de hemácias, apresentando CE_{50} superior a 2047 $\mu M/mL$. Os resultados obtidos por citometria de fluxo indicam que **rac-3g** induz necrose celular dependente da concentração, no entanto, indícios de apoptose foram observados na análise morfológica de HL-60. O ensaio de toxicidade aguda em camundongos mostrou toxicidade de **rac-3g** aos órgãos fígado e rins, que provavelmente pode ter sido causado pelo metabolismo do furano.

Conclusão: Os resultados sugerem que **rac-3g** seja uma promissora substância antiproliferativa com ação tempo e dose-dependente, induzindo a morte celular através de necrose em concentrações elevadas. O composto **rac-3g** também se mostrou tóxica em camundongos, possivelmente decorrente da abertura do anel furano.

Palavras-chave: Furano, Anticâncer, Citotoxicidade, Morte celular, Toxicidade aguda.

Introdução

O câncer é uma das enfermidades que mais causam morte no mundo, sendo responsável por cerca de 8 milhões de mortes por ano [1]. A falta de especificidade dos quimioterápicos convencionais é a principal barreira na eficiência do tratamento do câncer [2], estando frequentemente associada à debilidade em pacientes, pois geralmente apresentam distribuição não direcionada ou atuam em células de rápida divisão, de forma que são citotóxicos também para células saudáveis [3].

A estereoisomeria é um dos desafios na obtenção de fármacos mais específicos, uma vez que, há a possibilidade de apenas um dos enantiômeros ser terapeuticamente ativo [4]. Dessa forma, a resolução quiral dos racematos é relevante, visto que pode proporcionar enantiômeros com efeitos farmacológicos e menor toxicidade [5]. São variadas as

possibilidades de interações entre os enantiômeros, podendo ser equivalentes bioativos [6], apresentar efeitos qualitativamente diferentes, efeito antagônico ou diferentes graus de toxicidade [7,8].

Furano é um composto aromático heterocíclico constituído por quatro átomos de carbono e um oxigênio. Fazem parte de uma importante classe de compostos orgânicos voláteis, podendo ser formado a partir de diversas fontes naturais ou antropogênicas como queima de biomassa, reações de oxidação com radicais atmosféricos (NO_3 , OH e ozônio) [9], processamento térmico de alguns componentes alimentares tais como carboidratos, alguns aminoácidos e ácido ascórbico [10], ou ainda, serem encontrados em materiais sintéticos como corantes, cosméticos, compostos aromatizantes e fragrâncias [11].

Algumas atividades biológicas já foram atribuídas às moléculas contendo anel furano, como as atividades antibacteriana [12,13], antimalárica [14], atividade fungicida, herbicida [15] e antitumoral [16,17]. Dessa forma, substâncias derivadas de furano representam um atraente alvo para novas estratégias terapêuticas, mas ainda permanece pouco explorado.

No presente estudo, foi avaliado o efeito citotóxico de diversos derivados de furano e tiofenos em diferentes linhagens tumorais e células saudáveis. Após a triagem inicial o derivado mais ativo, **3g**, foi selecionado para estudo da via de morte celular e os possíveis efeitos tóxicos por ele induzido, com o propósito de contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas no tratamento do câncer.

Métodos

Derivados furânicos e tiofênicos

Os compostos utilizados neste trabalho (Figura1) foram fornecidos pelo Laboratório de Catálise Orgânica (LCO) do Departamento de Química Fundamental da UFPE, sob a coordenação do Prof. Dr. Jefferson Luiz Princival. A síntese e resolução enzimática estão descritas no seguinte estudo de Ferreira et al., 2016 [18].

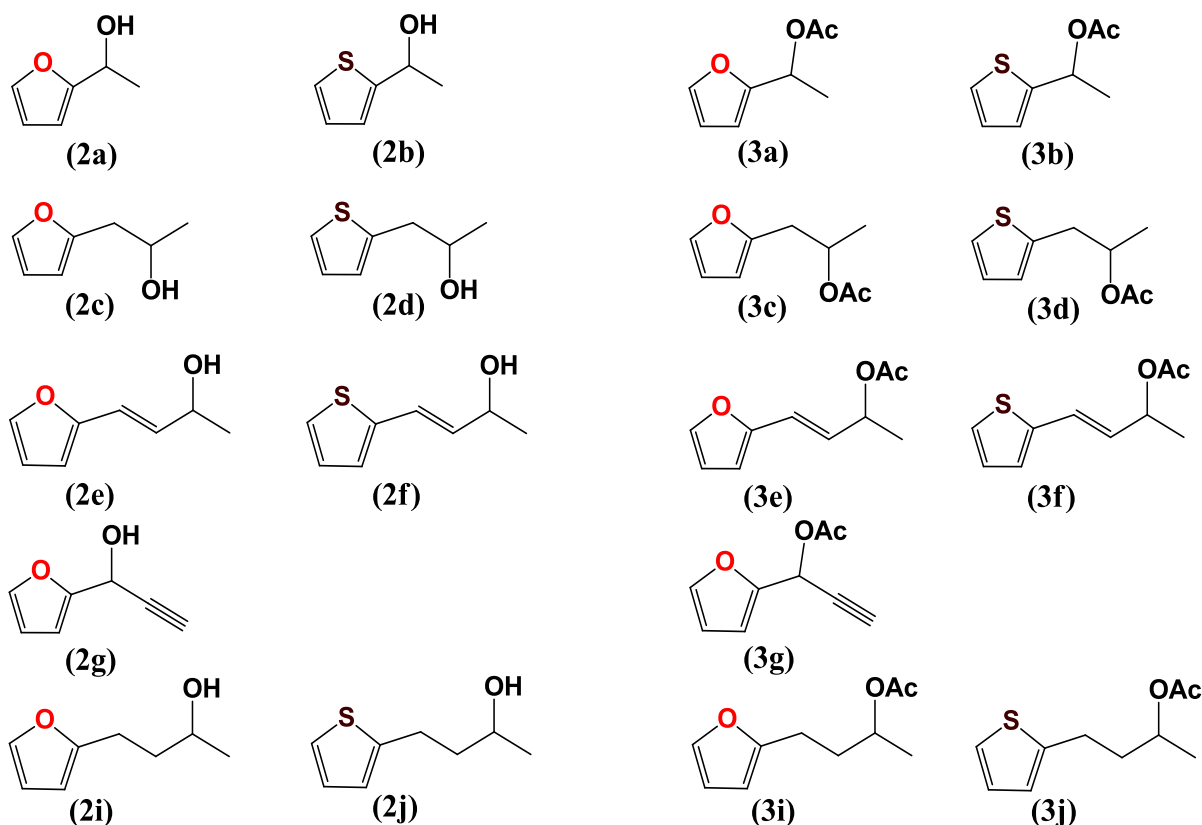


Figura 1: Estrutura química das substâncias derivadas de furano (2) e tiofeno (3).

Animais

Camundongos albinos Swiss (fêmeas, 25-30 g) foram obtidos do Biotério do Departamento de Antibióticos da UFPE, PE, Brasil. Os animais foram mantidos em temperatura de $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$, com ciclo claro/escuro de 12 h (iluminando às 6:00 am), com água e ração *ad libitum*. Os protocolos experimentais realizados seguiram os princípios técnicos e éticos preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL). Os estudos em animais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE, sob protocolo nº 23076.043015/2016-50.

Células

As linhagens de células tumorais humanas utilizadas foram NCI-H292 (carcinoma mucoepidermóide de pulmão), HT-29 (adenocarcinoma de cólon), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), Hep-2 (carcinoma epidermóide de laringe), MOLT-4 (leucemia limfoblástica aguda), HL-60 (leucemia promielocítica aguda) e K562 (leucemia mielocítica crônica) obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro e mantidas no Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Antibióticos da UFPE.

As linhagens (NCI-H292, HT-29 e Hep-2) foram mantidas em meio DMEM e as linhagens (MCF-7, MOLT-4, HL-60 e K562) foram mantidas em meio RPMI 1640. Ambos os meios de cultura foram suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina 1000 IU/mL e estreptomicina 250 µg/mL) a 37 °C, 5% de CO₂ e atmosfera umidificada.

Células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) e hemácias foram coletadas de voluntários sadios, após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE (CAAE 60366816.8.0000.5208). As células PBMC foram mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino fetal, 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina) e 3% de fitohemaglutinina para induzir a proliferação celular, 37 °C, 5% de CO₂ e atmosfera umidificada.

Citotoxicidade em células de câncer humano e em PBMC

A citotoxicidade em células tumorais humanas foi utilizada como *screening* inicial para selecionar a substância mais ativa, que então foi utilizada nos demais testes. Foram testados a mistura racêmica e um dos enantiômeros da substância mais ativa, para avaliação da eficácia do racemato.

As células PBMCs foram obtidas a partir de coleta de sangue periférico de voluntários sadios em tubos contendo heparina. O sangue foi lavado com tampão fosfato (PBS) e os linfócitos isolados por gradiente de densidade usando centrifugação com Ficoll (Histopaque 1077) em 1500 rpm por 30 min. Em seguida, a nuvem de linfócitos foi coletada e ressuspensa em PBS.

Os linfócitos (2×10^6 células/mL) e as linhagens tumorais NCI-H292, Hep-2, HT-29, MCF-7 (10^5 células/mL), HL-60, K-562 e MOLT-4 (3×10^5 células/mL) foram plaqueadas em placas de 96 poços. Após 24 h, os compostos testados dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações de (0,20 - 25 µg/mL) e em seguida foram adicionados às células e as placas foram incubadas por 72 h, 37 °C. A doxorubicina (0,04 - 5 µg/mL) foi utilizada como padrão. Poços contendo células incubadas apenas com o meio foram utilizados como controle negativo. Após a incubação por 72 h, foi adicionado 25 µL de MTT (5 mg/mL) em cada poço e as placas reincubadas por 2 h, em seguida, o sobrenadante foi aspirado e os cristais de formazan foram dissolvidos em DMSO. A absorbância foi medida em espectrofotômetro de placas no comprimento de onda de 560 nm.

Para determinação do percentual de inibição do crescimento celular (IC%), os compostos foram testados em concentração única (25 µg/mL). O composto que apresentou

melhores resultados (valor de IC% >80%) foi utilizada em concentrações seriadas para determinação da concentração que inibe 50% do crescimento celular (CI₅₀) com tempo de incubação de 24, 48 e 72 h. A porcentagem de inibição x log da concentração foi registrada e suas CI₅₀ e os respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) foram calculados a partir da regressão não linear pelo programa *GraphPad Prism* 6.0 demo.

Ensaio hemolítico

O sangue periférico foi coletado de voluntários sadios por via intravenosa em tubos contendo heparina. O sangue total foi lavado em solução salina (NaCl 0,85% + CaCl₂ 10 mM) e os eritrócitos separados por gradiente de densidade em centrifugação (3000 rpm/5 min), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em solução salina para se obter uma suspensão de eritrócitos (SE) a 2%. Esse experimento foi realizado em placas com 96 poços plaqueadas da seguinte forma: 100 µL de solução salina (controle negativo); 50 µL da solução salina e 50 µL do veículo (branco); 80 µL de solução salina + 20 µL de Triton X – 100 a 1% (controle positivo); 50 µL de solução salina + 50 µL das substâncias (1,95 a 250 µg/mL) diluídas em DMSO a 10%. Em seguida 100 µL da solução de eritrócitos 2% foram adicionados em cada poço. Após a incubação de 1 h sob agitação constante à temperatura ambiente, o sobrenadante foi analisado. A leitura óptica foi realizada em leitor automático de placas (540 nm). Substâncias com valores de concentração efetiva 50% (CE₅₀) < 200 µg/mL são consideradas hemolíticas [19]. A CE₅₀ e respectivo intervalo de confiança 95% foram determinados a partir de regressão não-linear utilizando o programa *GraphPad Prism* 6.0 demo.

Análise morfológica de HL-60 – coloração por panótico rápido

As células HL-60 foram plaqueadas na concentração de 3 x 10⁵ células/mL e incubadas com a substância **rac-3g** por 48 h. A concentração utilizada foi baseada nos valores de CI₅₀ encontrados no ensaio do MTT (0,5, 1 e 2 µg/mL). A doxorubicina (0,3 µg/mL) foi utilizada como controle positivo e o veículo (DMSO 0,1%) como controle negativo. Uma alíquota de 50 µL da suspensão celular foi adicionada a uma centrífuga de lâminas (cytospin) a 1500 rpm por 5 min. Após a adesão das células nas lâminas as mesmas foram coradas com panótico rápido, seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram submetidas à ação de um fixador e duas soluções corantes, por meio de imersões de 5 segundos em cada. Após a secagem as lâminas foram analisadas em microscópio óptico e as alterações registradas por fotografia.

Citometria de fluxo

Para os ensaios de citometria de fluxo, foram utilizadas células da linhagem HL-60, as mesmas foram plaqueadas na concentração de 3×10^5 células/mL e incubadas com a substância **rac-3g** (0,5, 1 e 2 µg/mL) por 48 h.

Avaliação da apoptose através da marcação com anexina V e 7-AAD

Para determinação da apoptose por citometria de fluxo foi utilizado o Kit Anexina V/7-ADD (Guava Nexin Reagent 4500-0450) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, após incubação com a substância **rac-3g** as células foram centrifugadas (1500 rpm por 5 min) e ressuspensas em PBS. Em seguida, a solução celular foi incubada com o reagente (na proporção de 1:1) por 20 min em temperatura ambiente no escuro. Ao final da incubação as células foram contadas pelo citômetro ImageStream X MkII e analisadas pelo software Amnis [20].

Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$)

Para determinação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$) as células foram lavadas em PBS (5 min a 1500 rpm) e incubadas com meio de cultura contendo 5 µg/mL de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolcarbocianina iodeto (JC-1) (BD Bioscience) por 30 min a temperatura ambiente no escuro. Em seguida as células foram novamente lavadas em PBS e contadas pelo citômetro ImageStream X MkII, a análise foi realizada pelo software Amnis [21].

Toxicidade Aguda

Para avaliação da toxicidade aguda, foram utilizados grupos de três camundongos albinos swiss (fêmeas). Conforme estabelecido pela OECD, quando não há dados prévios de toxicidade a dose inicial testada deve ser de 300 mg/kg, havendo óbito de 2 ou mais animais no grupo a dose deverá ser reduzida para 50 mg/kg. Foi administrada a substância **rac-3g** por via oral inicialmente na dose de 300 mg/kg e posteriormente na dose de 50 mg/kg. Ao grupo controle foi administrado apenas solução salina (0,9% de NaCl) adicionado de 0,5 % de tween 80. Após a administração da substância, os animais foram observados nas primeiras duas horas e depois a cada 24 horas diariamente durante 14 dias. Também foram observados os consumos de água e ração durante todo período experimental. No 14º dia, os animais foram devidamente anestesiados com cetamina associada à xilazina e o sangue foi coletado por punção cardíaca, para avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos. Para avaliação

dos possíveis efeitos tóxicos sistêmicos, os órgãos (fígado, rins e baço) foram extirpados e analisados a nível macro e microscópico [22].

O peso relativo dos órgãos foi calculado seguindo a fórmula:

$$\text{Peso relativo dos \u00f3rg\u00e3os} = \frac{\text{Peso do \u00f3rg\u00e3o (g)}}{\text{Peso de animal (g)}} \times 10$$

Resultados

Atividade citot\u00f3xica

A Tabela 1 mostra os resultados de citotoxicidade na dose \u00fanica de 25 \u00b5g/mL. Entre os compostos testados, o **s-2e** apresentou citotoxicidade moderada para todas as linhagens testadas, excerto para MOLT-4. O enanti\u00f4mero **r** e a mistura rac\u00eamicamente da subst\u00e2ncia **3g** apresentaram IC% entre 87,53% e 98,18%, sendo citot\u00f3xicas em todas as linhagens tumorais testadas. Al\u00e9m disso, as subst\u00e2ncias **rac-3e**, **r-3e** e **rac-3f** se mostraram citot\u00f3xicas frente as linhagens NCI-H292, MOLT, HL-60 e K-562 com IC% variando de 82,53% a 97,73%. As demais subst\u00e2ncias n\u00e3o foram citot\u00f3xicas em nenhuma das linhagens testadas. Todas as subst\u00e2ncias que apresentaram citotoxicidade em c\u00e9lulas tumorais pertencem ao grupo dos furanos (**3g** e **3e**) com exce\u00e7\u00e3o da **rac-3f**, contendo um n\u00facleo tiofeno. A subst\u00e2ncia **3e** em mistura rac\u00eamicamente foi citot\u00f3xica para quatro linhagens celulares, enquanto seu enanti\u00f4mero **r** apenas para HL-60 e K-562. A subst\u00e2ncia **3g** obteve resultados similares tanto em mistura rac\u00eamicamente quanto em resolu\u00e7\u00e3o enantiom\u00e9rica (Tabela1).

Tabela 1: Percentual de Inibição do Crescimento Celular (IC%) em linhagens tumorais, realizadas através do ensaio do MTT.

Amostras	Linhagens Celulares e IC % $\pm$ SEM%						
	NCI-H292	HT-29	MCF-7	Hep-2	MOLT-4	HL-60	K-562
rac-2a	15,28 $\pm$ 3,02	15,90 $\pm$ 4,14	0,47 $\pm$ 0,75	6,71 $\pm$ 1,00	16,26 $\pm$ 2,50	9,12 $\pm$ 0,39	24,64 $\pm$ 2,11
rac-2b	22,09 $\pm$ 1,16	18,73 $\pm$ 2,14	15,60 $\pm$ 7,19	5,34 $\pm$ 0,36	19,49 $\pm$ 3,43	3,83 $\pm$ 0,79	15,45 $\pm$ 1,57
rac-2c	20,10 $\pm$ 2,33	n.t.	0,56 $\pm$ 0,00	5,38 $\pm$ 0,62	13,39 $\pm$ 2,12	16,11 $\pm$ 0,51	10,64 $\pm$ 1,19
rac-2d	5,45 $\pm$ 0,62	13,07 $\pm$ 0,76	15,10 $\pm$ 1,65	7,44 $\pm$ 0,46	28,99 $\pm$ 0,54	9,99 $\pm$ 0,00	23,29 $\pm$ 2,98
rac-2e	26,50 $\pm$ 0,77	4,87 $\pm$ 0,69	33,54 $\pm$ 3,04	6,89 $\pm$ 0,27	46,19 $\pm$ 2,14	12,04 $\pm$ 0,00	33,14 $\pm$ 1,37
rac-2f	13,50 $\pm$ 4,49	7,11 $\pm$ 0,93	12,81 $\pm$ 2,70	10,21 $\pm$ 1,53	32,56 $\pm$ 3,06	27,89 $\pm$ 2,15	52,30 $\pm$ 2,74
rac-2g	17,46 $\pm$ 1,12	19,90 $\pm$ 0,69	1,89 $\pm$ 0,67	7,21 $\pm$ 0,87	24,90 $\pm$ 0,21	20,51 $\pm$ 2,58	55,02 $\pm$ 1,53
rac-2i	43,20 $\pm$ 1,81	28,38 $\pm$ 1,85	14,91 $\pm$ 1,99	17,27 $\pm$ 3,24	3,03 $\pm$ 0,00	10,60 $\pm$ 1,98	19,60 $\pm$ 1,92
rac-2j	3,67 $\pm$ 3,33	28,73 $\pm$ 1,07	4,57 $\pm$ 0,59	15,47 $\pm$ 1,73	37,04 $\pm$ 2,47	25,21 $\pm$ 0,23	45,00 $\pm$ 1,72
s-2a	41,58 $\pm$ 4,87	15,84 $\pm$ 1,05	26,29 $\pm$ 1,84	8,36 $\pm$ 0,79	20,30 $\pm$ 1,02	42,79 $\pm$ 2,16	42,18 $\pm$ 2,25
s-2b	26,75 $\pm$ 2,07	18,22 $\pm$ 1,42	21,38 $\pm$ 2,77	12,02 $\pm$ 2,04	8,79 $\pm$ 7,68	7,44 $\pm$ 1,09	3,18 $\pm$ 0,00
s-2c	34,61 $\pm$ 2,51	21,43 $\pm$ 1,02	21,92 $\pm$ 0,96	12,07 $\pm$ 0,32	32,45 $\pm$ 0,64	14,93 $\pm$ 1,89	24,98 $\pm$ 1,35
s-2d	15,84 $\pm$ 1,71	19,29 $\pm$ 2,82	11,40 $\pm$ 1,89	7,01 $\pm$ 1,58	26,11 $\pm$ 2,38	16,99 $\pm$ 0,31	13,21 $\pm$ 2,89
s-2e	57,30 $\pm$ 1,62	50,96 $\pm$ 2,96	60,10 $\pm$ 1,60	66,22 $\pm$ 1,65	35,98 $\pm$ 3,53	63,82 $\pm$ 3,87	68,50 $\pm$ 2,80
s-2f	26,17 $\pm$ 0,38	19,85 $\pm$ 0,65	31,47 $\pm$ 1,69	7,03 $\pm$ 0,79	30,96 $\pm$ 2,75	31,55 $\pm$ 2,83	21,83 $\pm$ 1,95
s-2g	20,29 $\pm$ 1,84	7,57 $\pm$ 0,29	18,93 $\pm$ 1,59	5,17 $\pm$ 1,89	4,35 $\pm$ 0,16	7,70 $\pm$ 2,69	17,08 $\pm$ 0,68
s-2i	37,03 $\pm$ 2,09	17,21 $\pm$ 0,33	26,86 $\pm$ 1,36	14,75 $\pm$ 2,67	13,86 $\pm$ 3,98	55,46 $\pm$ 5,93	n.t.
rac-3a	37,21 $\pm$ 1,07	10,11 $\pm$ 1,52	25,87 $\pm$ 2,00	27,48 $\pm$ 0,65	55,27 $\pm$ 1,66	39,40 $\pm$ 3,29	34,46 $\pm$ 1,26
rac-3b	26,55 $\pm$ 2,78	7,21 $\pm$ 0,94	28,47 $\pm$ 1,84	12,50 $\pm$ 0,86	13,18 $\pm$ 1,50	16,38 $\pm$ 1,20	7,42 $\pm$ 4,02
rac-3c	6,46 $\pm$ 5,34	18,43 $\pm$ 0,80	3,57 $\pm$ 1,17	4,79 $\pm$ 0,91	41,42 $\pm$ 1,37	10,07 $\pm$ 1,11	32,44 $\pm$ 1,82
rac-3d	23,48 $\pm$ 2,55	24,90 $\pm$ 1,29	7,24 $\pm$ 2,00	10,54 $\pm$ 0,82	16,74 $\pm$ 2,06	6,79 $\pm$ 0,35	31,40 $\pm$ 0,69
rac-3e	82,53 $\pm$ 3,37	53,71 $\pm$ 2,33	49,54 $\pm$ 1,56	24,17 $\pm$ 1,59	83,69 $\pm$ 3,62	97,73 $\pm$ 0,70	94,66 $\pm$ 0,88
rac-3f	28,28 $\pm$ 0,07	29,69 $\pm$ 1,26	4,32 $\pm$ 0,58	13,86 $\pm$ 1,08	29,31 $\pm$ 2,93	6,00 $\pm$ 0,43	92,05 $\pm$ 1,56
rac-3g	96,30 $\pm$ 1,08	88,54 $\pm$ 0,73	93,79 $\pm$ 0,78	87,53 $\pm$ 1,17	93,54 $\pm$ 1,33	95,23 $\pm$ 0,42	98,18 $\pm$ 0,21
rac-3i	27,23 $\pm$ 1,17	4,30 $\pm$ 0,51	22,35 $\pm$ 1,20	18,00 $\pm$ 1,32	17,09 $\pm$ 0,07	15,35 $\pm$ 0,67	5,89 $\pm$ 1,41
rac-3j	29,36 $\pm$ 2,61	8,39 $\pm$ 2,72	22,06 $\pm$ 1,07	24,21 $\pm$ 1,58	34,40 $\pm$ 2,12	25,31 $\pm$ 2,23	25,69 $\pm$ 1,74
r-3b	11,68 $\pm$ 1,30	28,56 $\pm$ 3,91	10,45 $\pm$ 1,44	9,95 $\pm$ 1,25	4,24 $\pm$ 0,67	14,28 $\pm$ 0,98	17,80 $\pm$ 0,87
r-3e	64,70 $\pm$ 1,87	39,25 $\pm$ 1,59	22,47 $\pm$ 2,75	38,39 $\pm$ 1,65	65,01 $\pm$ 0,41	87,98 $\pm$ 1,13	91,75 $\pm$ 1,77
r-3g	93,83 $\pm$ 1,23	95,53 $\pm$ 0,79	91,75 $\pm$ 0,96	89,02 $\pm$ 0,89	95,73 $\pm$ 0,19	96,98 $\pm$ 0,29	97,14 $\pm$ 0,18
Dox	94,20 $\pm$ 1,90	75,30 $\pm$ 1,30	74,80 $\pm$ 2,10	79,40 $\pm$ 2,60	96,60 $\pm$ 0,90	92,90 $\pm$ 0,60	79,00 $\pm$ 0,10

SEM%: erro padrão do IC%; **Rac:** mistura racêmica; **R:** enantiômero r; **S:** enantiômero s; **n.t.:** não testado; **Dox:** doxorrubicina. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo na concentração de 5 μ g/mL e as demais substâncias na concentração de 25 μ g/mL por 72 h.

Com base nos resultados obtidos na triagem inicial, a substância **3g** foi a mais eficaz, então, foi escolhida para dar continuidade aos demais ensaios. A substância **3g** apresentou valores de CI_{50} que variaram entre 4,09 e 24,24 μ M/mL para o racemato, 6,22 e 27,68 μ M/mL para o enantiômero r, sendo os menores valores mostrados em linhagens leucêmicas (MOLT-4, HL-60 e K-562). No entanto, **3g** também foi citotóxica frente à PBMC apresentando valores de CI_{50} de 4,26 e 4,34 μ M/mL para **rac-3g** e **r-3g**, respectivamente. O fármaco doxorrubicina exibiu CI_{50} 1,58 μ M/mL, sendo quase duas vezes mais citotóxico para PBMC que a substância **3g** (Figura 2).

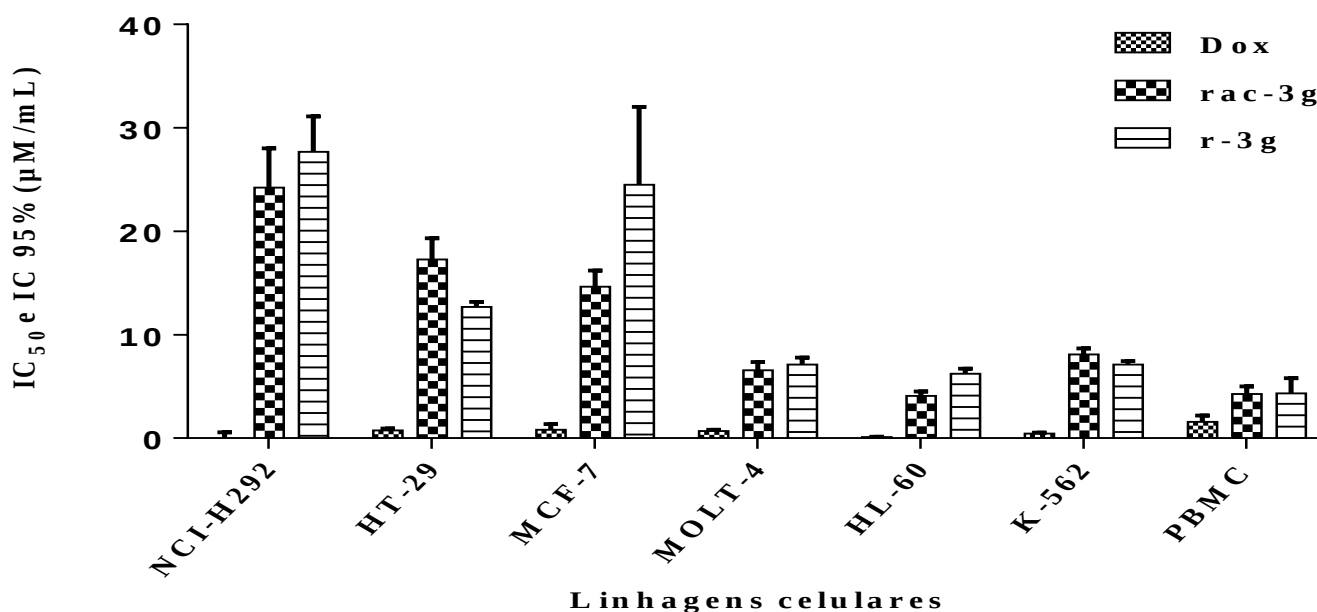


Figura 2: Valores de CI_{50} e Intervalo de confiança da substância **3g** em linhagens tumorais e PBMC após incubação de 72h. IC= Intervalo de confiança.

A substância **3g** mostrou ação tempo-dependente frente às linhagens HL-60, K562 e PBMC exibindo valores decrescentes de CI_{50} à medida que se aumentou o tempo de incubação, tanto em mistura racêmica quanto em resolução enantiomérica (Tabela 2). No entanto, não foi observada hemólise em eritrócitos humanos mesmo na maior concentração testada (2047 μ M/mL). Em todos os ensaios de citotoxicidade a substância **3g** apresentou resultados semelhantes tanto em mistura racêmica quanto em resolução enantiomérica, portanto, devido a maior praticidade na síntese escolheu-se utilizar apenas com a mistura racêmica (**rac-3g**) para os demais ensaios.

Tabela 2: Valores de CI_{50} e intervalo de confiança (IC 95%) da substância **3g** nas linhagens de células HL-60, K-562 e PBMC após incubação por 24, 48 e 72 h.

Amostras	CI_{50} e IC 95% (μ M/mL)								
	HL-60			K-562			PBMC		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
rac-3g	14,00	7,78	4,09	13,68	9,34	8,11	31,36	7,94	4,26
	13,51 $\pm$ 14,25	6,96 $\pm$ 8,76	3,77 $\pm$ 4,50	11,05 $\pm$ 16,79	8,52 $\pm$ 10,24	7,62 $\pm$ 8,68	21,78 $\pm$ 45,04	5,73 $\pm$ 10,89	3,52 $\pm$ 5,00
r-3g	11,71	8,76	7,12	12,53	8,27	7,12	30,71	6,39	4,34
	10,56 $\pm$ 13,02	8,02 $\pm$ 9,66	6,80 $\pm$ 7,45	10,15 $\pm$ 15,48	7,29 $\pm$ 9,34	6,80 $\pm$ 7,45	22,93 $\pm$ 41,27	4,18 $\pm$ 9,91	3,19 $\pm$ 5,81
Dox	1,02	0,58	0,11	3,73	0,90	0,44	12,49	1,95	1,58
	0,77 $\pm$ 1,35	0,39 $\pm$ 0,85	0,09 $\pm$ 0,15	3,05 $\pm$ 4,58	0,53 $\pm$ 1,53	0,35 $\pm$ 0,53	6,84 $\pm$ 22,92	1,49 $\pm$ 2,54	1,16 $\pm$ 2,19

Análise morfológica

A análise morfológica das células HL-60 em microscopia óptica, após 48 h de incubação com a substância **rac-3g**, mostrou diversas alterações induzidas pela substância. As células do grupo controle negativo apresentaram características típicas de células não aderidas, como membranas plasmática e nuclear bem definidas, citoplasma regular e núcleo volumoso (Figura 3 A), além disso, foram observadas numerosas figuras mitóticas. Nas células tratadas com doxorubicina foram observadas alterações como resto celular e fragmento nuclear (Figura 3 B).

Nos grupos tratados com **rac-3g** nas concentrações de 0,5, 1 e 2 µg/mL (Figuras 3 C, D e E, respectivamente) foram observadas alterações condizentes com processo de apoptose, incluindo, condensação da cromatina, formação de núcleos picnóticos e fragmentação nuclear. Entretanto, também foram verificados restos celulares que são indicativos de necrose celular. Ainda, foi observada diminuição de figuras mitóticas já na menor concentração testada. Também é interessante ressaltar que nas concentrações de 1 e 2 µg/mL poucas eram as células de aspectos normais, semelhantes ao controle negativo, sendo raríssima presença de células na concentração de 2 µg/mL.

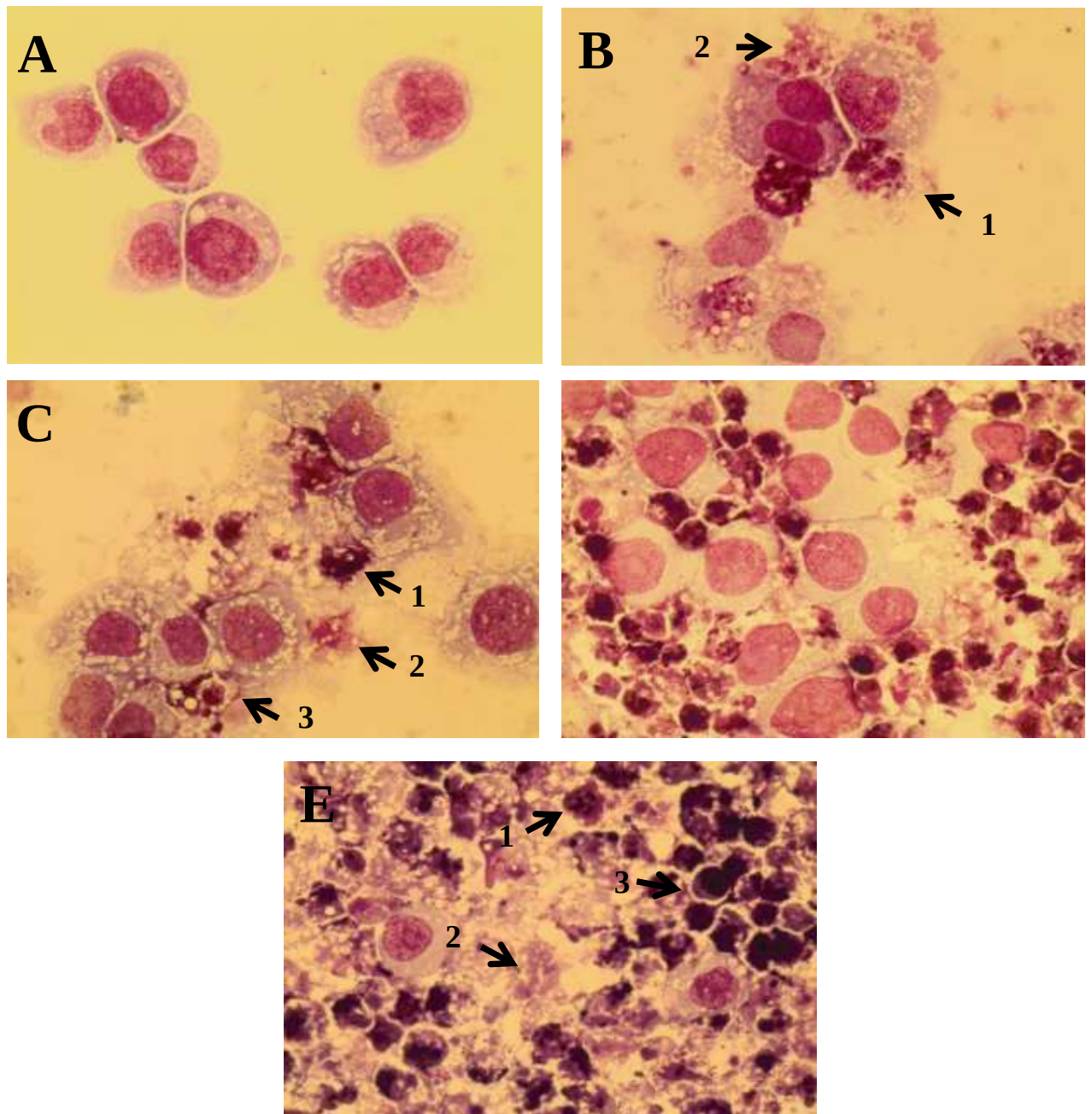


Figura 3: Análise morfológica de HL-60 após 48 h de incubação com **rac-3g**, coradas por panótico rápido. Aumento de 1000X. **A:** Células de controle negativo tratadas com DMSO 1%; **B:** Células de controle positivo tratadas com Doxorubicina 0,3 µg/mL; **C; D e E:** Células tratadas com rac-3g 0,5, 1 e 2 µg/mL, respectivamente. Os números indicam as alterações observadas: **1:** fragmentação nuclear; **2:** restos celulares e **3:** núcleo picnótico.

292

293

294

295

296

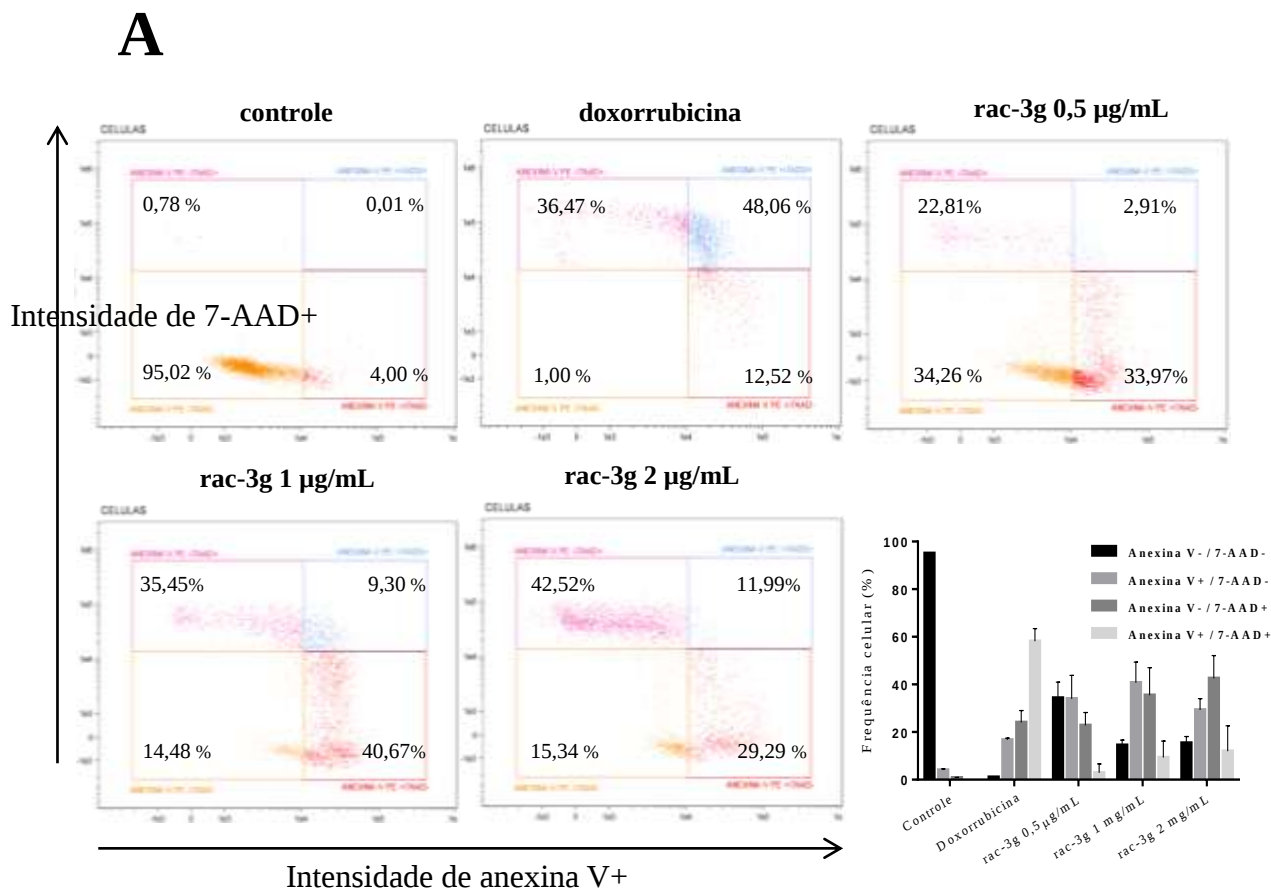
297

298

Determinação de apoptose por citometria de fluxo

Na avaliação da apoptose por citometria de fluxo, foi observado um decréscimo na porcentagem de células HL-60 viáveis (anexina V⁻ / 7-AAD⁻) de 95,02 % no controle negativo para 34,26 % após tratamento com a menor concentração (0,5 µg/mL) da **rac-3g** por 48 h. Essa redução de células viáveis foi ainda mais intensa nos tratamentos com 1 e 2 µg/mL (14,48 % e 15,34%, respectivamente). No controle positivo (doxorrubicina) houve uma clara predominância de células em apoptose tardia (anexina V⁺ / 7-AAD⁺) e células necróticas (anexina V⁻ / 7-AAD⁺), 58,12 % e 24,03 %, nesta ordem. Nos tratamentos com **rac-3g** foi observado um deslocamento na população celular, onde, na concentração de 0,5 µg/mL a maioria das células estavam viáveis ou em apoptose inicial (anexina V⁺ / 7-AAD⁻), 68,23 % do total, enquanto nos tratamentos com 1 e 2 µg/mL a predominância eram de células em apoptose inicial e necróticas, 76,12 % e 71,81 %, respectivamente. Na maior dose testada, **rac-3g** aparentemente induziu necrose celular em quase metade das células contadas (42,52 %) (Figura 4 A).

Na Figura 4 B são mostrados os padrões de células viáveis (duplo negativo), em apoptose inicial (anexina V positiva), células em necrose (7-AAD positivo) e células em apoptose tardia (duplo positivo).



B

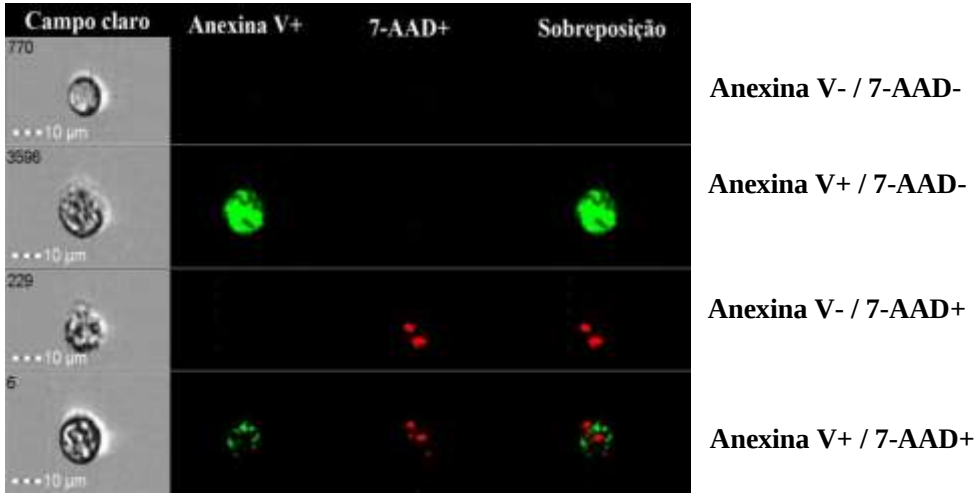
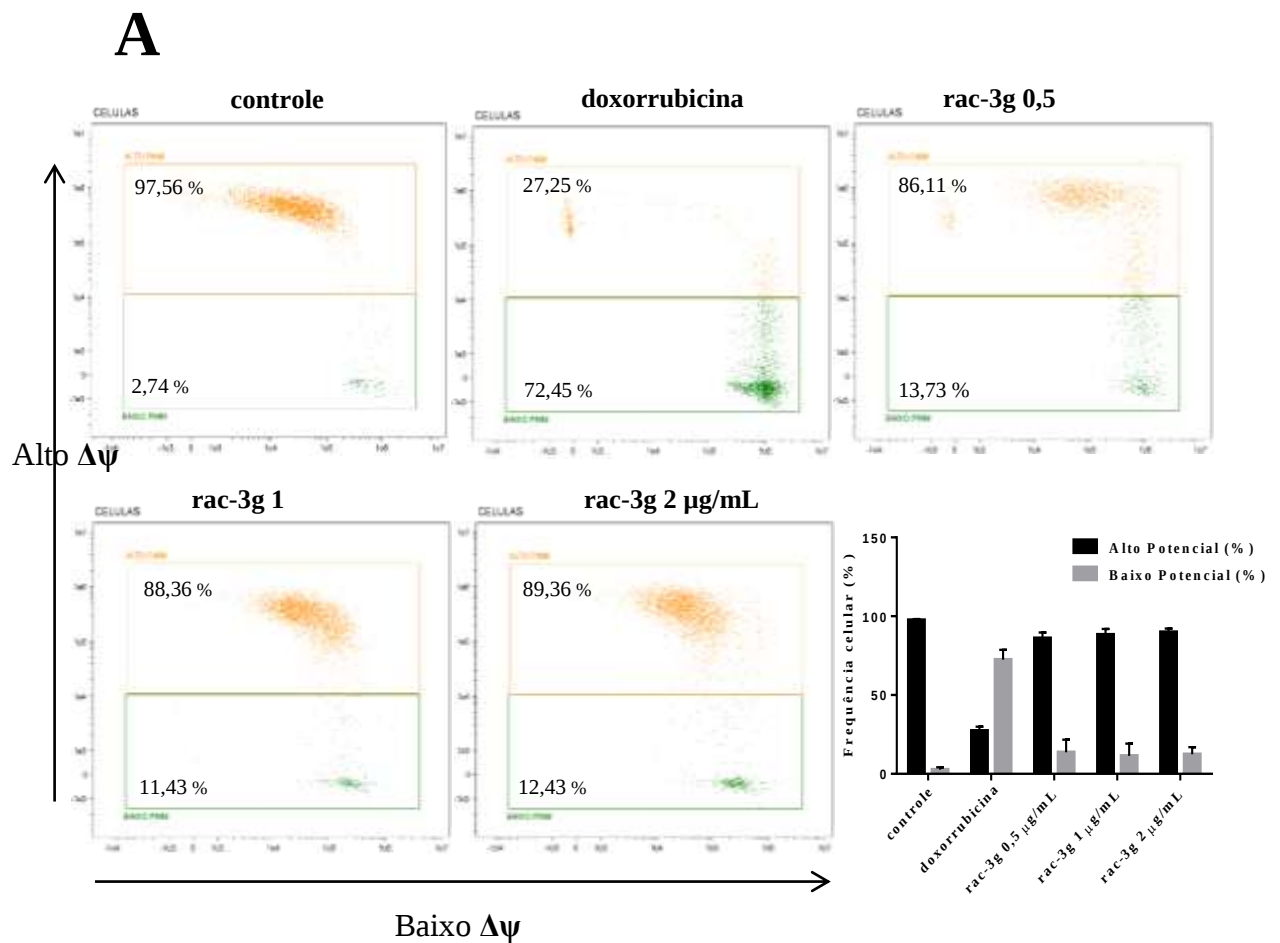


Figura 4: Percentual de células apoptóticas após tratamento com **rac-3g**, por 48 h. **A:** percentuais de células viáveis (Anexina V- / 7-AAD-); células em apoptose inicial (Anexina V+ / 7-AAD-); células em necrose (Anexina V- / 7-AAD+) e células em estágio tardio da apoptose (Anexina V+ / 7-AAD+) para cada tratamento (0,5, 1 e 2 µg/mL) e controles. **B:** padrões celulares para amostras duplo negativo, anexina V+, 7-AAD+ e duplo positivo. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo (duplo positivo) e células não tratadas como controle negativo (duplo negativo). Valores são expressos em média + SEM de dois experimentos independentes realizados em triplicata, onde, foram adquiridos 5000 eventos por amostra.

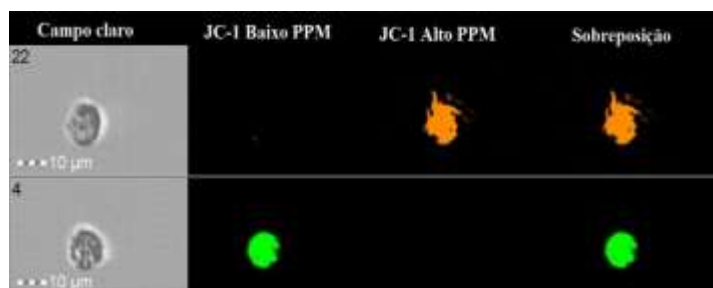
Avaliação do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo

A análise do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo mostrou que 97,56 % das células HL-60 do controle negativo estavam com alto potencial de membrana, enquanto 72,45 % estavam com baixo potencial no controle positivo, doxorubicina. Nos tratamentos com **rac-3g** (0,5, 1 e 2 µg/mL) houve um leve declínio no percentual de células com alto potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$), no entanto, maior parte das células apresentavam alto $\Delta\psi$, de 86,11 %, 88,36 % e 89,36 %, respectivamente (Figura 5 A).

Na Figura 5 B estão representados os padrões de células com alto $\Delta\psi$ (de coloração alaranjada) obtidas do controle negativo e células com baixo $\Delta\psi$ (coradas em verde) contadas do tratamento com doxorubicina.



B



Célula com alto $\Delta\psi$

Célula com baixo $\Delta\psi$

Figura 5: Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$) de células tratadas com **rac-3g** durante 48 h. **A:** percentuais de células com alto $\Delta\psi$ (células de coloração alaranjada); células com baixo $\Delta\psi$ (células coradas em verde) para cada tratamento (0,5, 1 e 2 µg/mL) e controles. **B:** padrões celulares para amostras com alto e baixo $\Delta\psi$, respectivamente. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo (baixo $\Delta\psi$) e células não tratadas como controle negativo (alto $\Delta\psi$). Valores são expressos em média + SEM de dois experimentos independentes realizados em triplicata, onde, foram contados 5000 eventos por amostra.

347

348 Avaliação da toxicidade aguda

349 Na dose de 300 mg/kg a substância **rac-3g** induziu óbito de todos animais do grupo,
 350 após 24 h da administração por via oral. Durante as primeiras duas horas foram observados

animais inertes, com pouca ou nenhuma atividade excretora, contorções abdominais e irritabilidade ocular, ademais, não foram observados outros indícios de toxicidade. Como preconizado pela OECD a dose foi reduzida para 50 mg/kg a qual não induziu óbito, dessa forma, foi considerada não tóxica e realizada a repetição. Durante acompanhamento das primeiras horas, após administração, não foram observados comportamentos anormais que indicassem toxicidade, sendo assim, os animais foram observados durante os 14 dias de experimentação.

Após período de acompanhamento foi verificado aumento de peso dos animais tratados com 50 mg/kg da substância **rac-3g** de 3,18 g, já os animais do grupo controle apresentaram ganho de 3,13 g. Tanto para o parâmetro variação de peso corporal quanto consumos de ração e água não apresentaram diferença significativa em relação ao controle (Tabela 3).

Tabela 3: Ganho de peso corporal e consumo diário de ração e água dos animais tratados com a substância **rac-3g**, acompanhados durante 14 dias.

	Tratamentos	
	Controle	rac-3g 50 mg/kg
Ganho de peso corporal (g)	3,13 ± 1,23	3,18 ± 0,63
Consumo de ração (g/dia/animal)	5,80 ± 1,11	5,17 ± 0,19
Consumo de água (mL/dia/animal)	9,01 ± 2,64	9,35 ± 0,93

Os valores são expressos em média ± SD ($n = 5$ para cada grupo). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos usando ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey.

Na avaliação macroscópica dos órgãos foi encontrado um leve aumento nos pesos relativos dos fígados dos animais do grupo tratado 50 mg/kg (0,78 g) em relação ao grupo controle (0,67 g), da mesma forma, os rins dos animais do grupo tratado com 50 mg/kg apresentaram um leve aumento em relação ao grupo controle, 0,15 g e 0,12 g, nesta ordem. Os pesos relativos dos baços dos grupos tratados e controle não apresentaram diferença significativa (Figura 6).

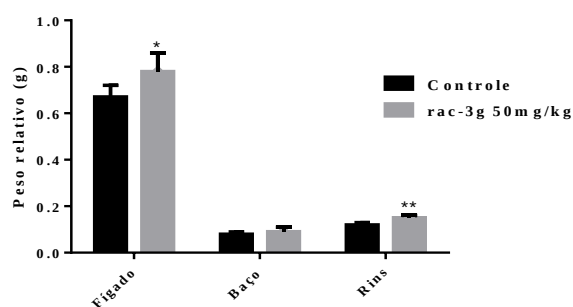


Figura 6: Peso relativo dos órgãos dos animais tratados em dose única com **rac-3g**. Os valores são expressos em média $\pm$ SD ($n = 5$ para cada grupo). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos usando ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey. Os asteriscos indicam diferença significativa em relação ao controle, * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

Os parâmetros bioquímicos avaliados foram: fosfatase alcalina, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) para danos no fígado e ureia e creatinina para os rins. Foram observados aumento significativo dos níveis de fosfatase alcalina e ALT nos animais do grupo tratado, porém, os níveis de AST não foram significativamente distintos do controle. Além disso, houve aumento dos níveis de ureia nos animais do grupo tratado com **rac-3g**, no entanto, os níveis de creatinina não foram alterados (Tabela 4).

Tabela 4: Parâmetros bioquímicos no sangue dos animais tratados com dose única de **rac-3g**.

Parâmetros	Controle	rac-3g 50 mg/kg
Fosfatase alcalina (U/L)	61,75 $\pm$ 8,96	108,50 $\pm$ 9,98***
ALT (U/L)	19,75 $\pm$ 2,50	41,25 $\pm$ 4,65****
AST (U/L)	71,25 $\pm$ 23,89	69,50 $\pm$ 3,32
Ureia (mg/dL)	41,25 $\pm$ 4,27	53,20 $\pm$ 2,68**
Creatinina (mg/dL)	0,23 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,02

Os valores são expressos em média $\pm$ SD ($n = 5$ para cada grupo). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos usando ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey. Os asteriscos indicam diferença significativa em relação ao controle, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ e **** $P < 0,0001$.

Nenhum dos parâmetros analisando no hemograma apresentaram diferença significativa entre os animais tratados com 50 mg/Kg de **rac-3g** e aos animais do grupo controle (Tabela 5).

Tabela 5: Avaliação dos parâmetros hematológicos dos animais tratados com dose única de **rac-3g**.

Parâmetros	Controle	rac-3g 50 mg/kg
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	$2,89 \pm 0,31$	$2,39 \pm 0,81$
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	$8,14 \pm 0,36$	$8,22 \pm 0,63$
Hemoglobinas (g/dL)	$11,84 \pm 0,52$	$11,64 \pm 0,86$
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	$869,20 \pm 25,79$	$812,50 \pm 85,06$
Hematócrito (%)	$44,14 \pm 2,07$	$45,00 \pm 3,34$
VCM (fm^3)	$54,06 \pm 0,71$	$51,50 \pm 1,64$
HCM (pg)	$14,44 \pm 0,24$	$13,30 \pm 0,35$
CHCM (g/dL)	$26,74 \pm 0,33$	$25,72 \pm 0,38$
RDW (%)	$13,73 \pm 0,57$	$12,22 \pm 0,61$

VCM: volume corpuscular médio; **HCM:** hemoglobina corpuscular média; **CHCM:** concentração de hemoglobina corpuscular média; **RDW:** variação de tamanho das hemácias. Os valores são expressos em média $\pm$ SD ($n = 5$ para cada grupo). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos usando ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey.

Discussão

Em estudo anterior, autores comprovam acentuada atividade antiproliferativa de moléculas derivadas de furanos ou tiofenos frente a linhagens de câncer humano, algumas delas exibindo CI_{50} inferiores ao fármaco padrão 5-fluorouracil [17]. Além disso, alguns derivados de furanos se mostraram tão eficientes ao ponto de inibirem a proliferação de células tumorais a níveis submicromolares [16]. Neste trabalho, 18 substâncias foram avaliadas e três delas apresentaram citotoxicidade frente a células tumorais, das quais, duas são derivadas de furanos e foram ativas para mais de duas linhagens de células tumorais.

A investigação de substâncias com formas estereoisoméricas se faz necessária, pois existe a possibilidade de apenas um dos enantiômeros apresentar a atividade biológica pretendida [4], ou mesmo um dos enantiômeros apresentar atividade biológica mais potente que seu complementar, um perfil menos tóxico ou uma maior estabilidade metabólica [7]. Neste trabalho, o enantiômero *r* da substância mais ativa, o derivado de furano **3g**, foi comparado com a mistura racêmica durante todos os testes de citotoxicidade *in vitro*, onde foi possível observar que em ambas as conformações a substância agiu de forma semelhante e por este motivo escolheu-se dar continuidade aos testes com a substância racêmica. Além disso, os resultados indicam que a substância **3g** apresentou ação tempo-dependente, sendo mais ativa para células leucêmicas.

Consideram-se hemolíticos produtos que promovem hemólise $> 5\%$ em concentrações inferiores a $1000 \mu\text{M/mL}$ [23]. A substância **3g** promoveu percentuais de hemólise $< 5\%$ na concentração de $250 \mu\text{g/mL}$ ou $2047 \mu\text{M/mL}$, sendo, portanto, não associada à lise de

membranas eritrocitárias, contudo, esse comportamento pode estar ligado ao tempo de incubação.

Características morfológicas tais como condensação da cromatina, *blebbing* de membrana e corpos apoptóticos são amplamente apontados como indicativos de células apoptóticas [24,25,26]. Ademais, características como retração celular, núcleo picnótico e fragmentação nuclear (cariorrexe) já foram descritos para indução farmacológica de apoptose em HL-60 [27,28]. Os resultados obtidos na avaliação da morfologia de HL-60 revelaram que a substância **rac-3g** induziu morte por apoptose, baseando-se em células com núcleos picnóticos ou fragmentados, entretanto, necrose celular também foi induzida, pois restos celulares foram encontrados nas amostras tratadas com **rac-3g**.

A fosfatidilserina é um fosfolipídio normalmente encontrado apenas na fase intracelular da membrana plasmática de células saudáveis, no entanto são rapidamente externalizadas em células expostas a estímulos apoptóticos [29]. Outrora, foi comprovado a preferência do anticoagulante anexina V por fosfatidilserina e desde então tem sido utilizado para determinação de células apoptóticas [30].

A perda da integridade da membrana plasmática é uma garantia de morte celular. Essa característica pode ser avaliada por uso de corantes impermeáveis a célula, por exemplo, o 7-amino actinomicina D (7-AAD) ou iodeto de propídeo (IP), de forma que, quando a integridade da membrana é perdida o corante entra na célula morta [24]. A dupla marcação para avaliação de morte celular é determinante, uma vez que, células necróticas também se ligam a anexina V após a ruptura da membrana. Células apoptóticas tornam-se primeiro anexina v positivas e 7-AAD negativo, seguindo em momento posterior pela captação de 7-AAD [29]. Diante disso, é provável que a morte celular induzida pela substância **rac-3g** inicialmente provocou apoptose inicial e a depender da concentração a atividade citotóxica se tornou mais acentuada ao ponto de induzir necrose celular.

Assim, a análise morfológica da HL-60 e a dupla marcação com anexina V e 7-AAD evidenciaram os resultados encontrados nos ensaios de citotoxicidade, onde o número de células viáveis é drasticamente reduzido após tratamento com **rac-3g**. Além disso, esses ensaios demonstram o perfil dose-dependente dessa substância.

Um evento típico de morte por apoptose é a alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial, que, por conseguinte libera proteases (em especial citocromo c) que iram desencadear a cascata proteolítica indutora da apoptose [31]. O envolvimento das mitocôndrias na morte celular pode ser avaliado através de corantes catiônicos, que são atraídos pela carga negativa da membrana interna das mitocôndrias [32].

O fluorocromo catiônico lipofílico JC-1 é bastante utilizado para análise de potencial de membrana mitocondrial, este fluorocromo pode emitir fluorescência verde indicando a captação de monômeros JC-1 ou emitir a fluorescência vermelha que indica a presença de J-agregados, ainda pode ocorrer a coexistência de ambos sendo emitida a cor laranja. Quando o $\Delta\psi$ está baixo (<100 mV) JC-1 emite a fluorescência verde, quando o $\Delta\psi$ está entre 130 e 180 mV as células marcadas emitem à cor laranja. Apenas quando $\Delta\psi$ está >190 mV a fluorescência vermelha supera a verde e apenas a cor vermelha é detectada ao invés da laranja [33].

Dessa forma, fica visível a baixa influência da substância **rac-3g** sobre a despolarização da membrana mitocondrial em células HL-60, uma vez que mais de 85 % das células tratadas não sofreram alteração de seu potencial de membrana mitocondrial, emitindo cor laranja semelhante ao controle negativo (células saudáveis não tratadas). Sendo assim, a morte celular induzida por **rac-3g** não envolve danos as mitocôndrias, não sendo indicativo de morte apoptótica por via intrínseca.

O anel furano é metabolizado pela enzima citocromo P450 2E1 (CYP2E1) e seu produto o dialdeído insaturado cis-2-buten-1,4-dial (BDA) é tóxico em especial ao fígado [34,35,36]. Esta enzima encontra-se localizada principalmente no retículo endoplasmático, porém, também pode ser encontrada em outras organelas inclusive nas mitocôndrias [37]. Estudos anteriores descreveram que animais tratados com furano apresentaram efeitos hepatotóxico como aumento do peso relativo do fígado e aumento nas transaminases séricas, fosfatase alcalina, colesterol, triglicerídeos e bilirrubina total [10]. Alterações nos marcadores bioquímicos renais (bicarbonato, ureia, ácido úrico, creatinina e bicarbonato) já tinham sido descritos em ratos tratados subcronicamente com furano em doses abaixo de 5 mg/kg [38].

Portanto, é presumível que a toxicidade apresentada pela substância **rac-3g** em camundongos tenha ocorrido devido ao metabolismo do anel furano, sendo, as alterações apresentadas no tamanho relativo do fígado e rins também o aumento dos níveis de fosfatase alcalina, ALT e ureia condicentes com essa hipótese. Apesar da ureia ter aumentado, a creatinina, que é um marcador renal mais preciso, permaneceu normal, então serão necessários testes complementares para esclarecer este achado.

Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o derivado de furano **3g** é uma promissora substância citotóxica para células de câncer. Sua atividade biológica não parece estar ligada a um dos enantiômeros, sendo a mistura racêmica ativa em mesmo grau. A

substância **rac-3g** apresenta ação tempo e dose-dependente, onde possivelmente sua atividade citotóxica não está associada à morte celular pela via intrínseca da apoptose, mas por outro tipo de morte, entretanto, outros testes mais específicos que comprovem a via de morte celular devem ser realizados. Os efeitos colaterais produzidos por **rac-3g** possivelmente são consequência da abertura do anel furano pelo citocromo P450, sendo necessário intervenção química de proteção a esta estrutura.

Lista de Abreviaturas

7-AAD: 7-amino actinomicina D

$\Delta\psi$: potencial de membrana mitocondrial

ALT: alanina aminotransferase

AST: aspartato aminotransferase

CE₅₀: concentração efetiva 50%

CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média

CI₅₀: concentração que inibe 50% do crescimento celular

DMSO: dimetilsulfóxido

HCM: hemoglobina corpuscular média

HEP-2: linhagem celular de carcinoma epidermóide de laringe

HL-60: linhagem celular de leucemia promielocítica aguda

HT-29: linhagem celular de adenocarcinoma de cólon

IC 95%: Intervalo de confiança 95%

IC%: percentual de inibição do crescimento celular

JC-1: 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolcarbocianina iodeto

K-562: linhagem celular de leucemia mielocítica crônica

MCF-7: linhagem celular de adenocarcinoma de mama

MOLT-4: linhagem celular de leucemia limfoblástica aguda

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

NCI-H292: linhagem celular de carcinoma mucoepidermóide de pulmão

PBMC: células mononucleares de sangue periférico

RDW: variação de tamanho das hemácias

SBCAL: sociedade brasileira de ciência em animais de laboratório

VCM: volume corpuscular médio

RAC-: mistura racêmica da substância

R-: enantiômero r da substância

S-: enantiômero s da substância

DOX: doxorubicina

IP: iodeto de propídeo

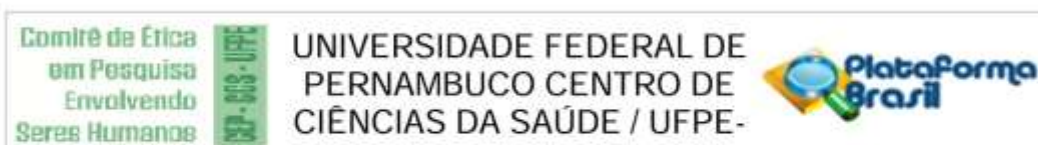
BDA: cis-2-buten-1,4-diol

Declarações

Aprovação Ética e Consentimento para Participar

Os ensaios de citotoxicidade em PBMC e atividade hemolisante, onde foram utilizadas amostras de sangue humano, foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da UFPE, sob o Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE): 60366816.8.0000.5208. O parecer de aceite e termo de consentimento livre e esclarecido são mostrados abaixo.

A utilização de animais neste trabalho foi aprovada pela Comissão de Ética de Uso Animal – CEUA da UFPE, sob protocolo nº 23076.043015/2016-50. O parecer favorável é exibido abaixo.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do potencial antitumoral de novos compostos derivados de furanos e tiofenos

Pesquisador: Bruno Iraquiton Miranda da Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 60366816.8.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.849.464

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de pesquisa do pesquisador Bruno Iraquiton Miranda da Silva do departamento de antibióticos envolvendo o potencial farmacológico de novos compostos químicos de derivados de furanos e tiofenos. De acordo com a última estimativa realizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), houve 14,1 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes por câncer em todo mundo, em 2012. Embora já existam vários fármacos com efeito anticâncer que são amplamente utilizadas na quimioterapia, a maioria mostra inespecificidade, já que apresenta toxicidade elevada também para células normais, o que causam vários efeitos adversos como mielossupressão, alopecia e alterações gastrointestinais (náuseas, vômito e diarreia)

Objetivo da Pesquisa:

Investigar a atividade antitumoral de uma nova série de álcoois e ésteres contendo a função furano e tiofeno em suas estruturas, ainda, sua possível citotoxicidade em células de sangue periférico humano.

Avaliar a atividade anticâncer in vitro em diferentes linhagens celulares tumorais humanas e em linfócitos humanos;

Mensurar a citotoxicidade dos compostos em linfócitos humanos;

Determinar a atividade citotóxica em eritrócitos humanos.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

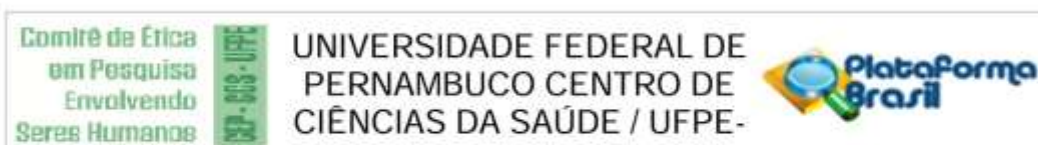
CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.849.464

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não estão previstos benefícios diretos, entretanto o benefício indireto será de contribuir para a comunidade científica através da avaliação da citotoxicidade em células de sangue do periférico humano. O doador poderá sentir um leve desconforto no local da punção (ponto de retirada do sangue) e ainda causar vermelhidão no local que será tratada com compressas de gelo. Esses riscos serão minimizados, pois a coleta será feita por profissionais especializados usando o equipamento de proteção individual.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O orçamento da pesquisa está previsto para R\$ 3.000,00 e será de inteira responsabilidade do pesquisador. A coleta está prevista para novembro/2016, porém não tem a frase de que os dados só serão coletados após aprovação deste Comitê. A coleta do sangue periférico será realizada por profissionais capacitados, utilizando-se seringas esterilizadas e descartáveis de 10 mL. Para tanto, como critério de inclusão, serão escolhidos 10 voluntários adultos saudáveis, na faixa etária de 20 a 30 anos, sem histórico de doenças recentes, não fumantes, sem exposição recente a radiações, a medicamentos ou álcool (BURIM et al., 2001). E voluntários adultos saudáveis, na faixa etária de 20 a 30 anos, com histórico de doenças recentes e/ou fumantes, com exposição recente a radiações e/ou a medicamentos e/ou álcool e voluntários que se negarem a doar sangue serão excluídos. O projeto não indica o local onde as coletas serão realizadas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Carta de anuência do departamento de antibióticos; curriculum dos pesquisadores anexados; TCLE em acordo com o preconizado;

Recomendações:

Sem recomendações

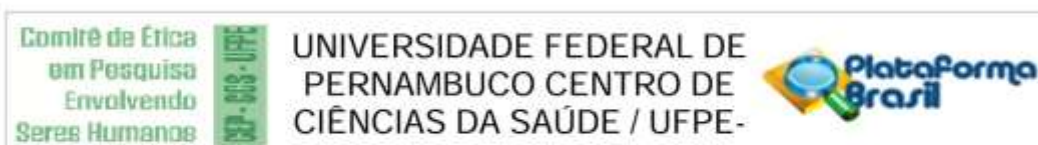
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.849.464

emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_796256.pdf	27/11/2016 13:19:42		Aceito
Outros	cartaderesposta.docx	23/11/2016 11:51:17	Bruno Iraquitan Miranda da Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDetalhado.docx	23/11/2016 11:47:20	Bruno Iraquitan Miranda da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEBruno.docx	27/09/2016 10:06:27	Bruno Iraquitan Miranda da Silva	Aceito
Outros	CurriculoLattesBruno.pdf	26/09/2016 16:47:25	Bruno Iraquitan Miranda da Silva	Aceito
Outros	CurriculoLattesTeresinha.pdf	26/09/2016 16:44:26	Bruno Iraquitan Miranda da Silva	Aceito
Outros	CurriculoLattesJaciana.pdf	26/09/2016 16:43:29	Bruno Iraquitan Miranda da Silva	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderostro.pdf	26/09/2016	Bruno Iraquitan	Aceito

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600

UF: PE **Município:** RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br

		UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-	
---	---	---	---

Continuação do Parecer: 1.849.464

Folha de Rosto	Folhaderostro.pdf	16:25:05	Miranda da Silva	Aceito
Outros	termodecompromisso.pdf	19/09/2016 23:06:31	Bruno Iraquitan Miranda da Silva	Aceito
Outros	cartadeanuencia.pdf	19/09/2016 23:05:17	Bruno Iraquitan Miranda da Silva	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 05 de Dezembro de 2016

Assinado por:

LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)**

Convidamos você para participar como voluntário (a) da pesquisa intitulada Avaliação do potencial antitumoral de novos compostos derivados de furanos e tiofenos, que está sob a responsabilidade do pesquisador Bruno Iraquiton Miranda da Silva, com endereço Departamento de Antibióticos, Avenida Prof. Artur de Sá, Cidade Universitária, s/n e CEP: 50740-520 – Telefone: (81) 9 7910-4821/2126-8866, e-mail para contato bruno.ims@hotmail.com. E está sob a orientação de: Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva. Telefone: (81) 9 8847-0065, e-mail teresinha100@gmail.com e Profa. Dra. Jaciana dos Santos Aguiar. Telefone: (81) 9 9604-4192, email: jacianaaguiar@gmail.com.

Este Termo de Consentimento pode haver alguns tópicos que você não entenda. Caso haja alguma dúvida, pergunte à pessoa a quem está lhe entrevistando, para que o/a senhor/a esteja bem esclarecido (a) sobre tudo que está respondendo. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, caso aceite em fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado (a) de forma alguma. Também garantimos que você tem o direito de retirar o consentimento da sua participação em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

- O objetivo desta pesquisa é avaliar o efeito colateral de novas drogas em sangue humano.
- A coleta do sangue será realizada por profissionais capacitados, utilizando-se de materiais descartáveis e estéreis.
- Sua participação será somente na coleta do sangue que levará aproximadamente 10 minutos.
- Como risco o participante poderá sentir um leve desconforto no local do ponto de retirada do sangue e existe risco de ser gerada uma vermelhidão no local, caso isso ocorra será tratada com compressas de gelo. Esses riscos serão minimizados, pois a coleta será feita por profissionais especializados usando o equipamento de proteção individual e o descarte dos materiais será feito em embalagens apropriadas.
- Não estão previstos benefícios diretos, entretanto o benefício indireto será de contribuir para a comunidade científica através deste trabalho.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa ficarão armazenados em computador pessoal, sob a responsabilidade de Bruno Iraquiton Miranda da Silva, no endereço acima informado, pelo período de 5 anos.

Você não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação). Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepecs@ufpe.br).**

(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo Avaliação do potencial antitumoral de novos compostos derivados de furanos e tiofenos, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo (a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Local e data _____

Assinatura do/a participante: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:

Assinatura:

Nome:

Assinatura:



**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências**

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 / 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 16 de março de 2017.

Ofício nº 05/17

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: Prof.ª Teresinha Gonçalves da Silva

Departamento de Antibióticos

Centro de Biociências

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 23076.043015/2016-50

Certificamos que a proposta intitulada “Avaliação do potencial Antitumoral de Novos Compostos Derivados de Furanos e Tiofenos”, registrada com o nº 23076.043015/2016-50 sob a responsabilidade de Prof.ª Teresinha Gonçalves da Silva - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 08/03/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Fevereiro de 2017 á março de 2017
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico/ Albinos Swiss
Nº de animais	70
Peso/Idade	25-30g 60 dias
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério do Departamento de Antibióticos

Atenciosamente,

Pedro V. Carelli
Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPE 1801584

Consentimento para Publicação

Não aplicável.

Disponibilidade de dados e materiais

Todos os dados gerados ou analisados durante o presente estudo estão incluídos neste artigo.

Interesses competitivos

Os autores declaram não terem interesses conflitantes.

Financiamento

Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Contribuições dos autores

DSPF e FLP sintetizaram as substâncias avaliadas, ACNC participou dos ensaios de citotoxicidade *in vitro*, JSA e TGS participaram da análise dos ensaios realizados e também da escrita do manuscrito, BIMS participou de todas as etapas experimentais e foi o principal contribuinte para escrita do manuscrito. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

Agradecimentos

Agradecemos aos órgãos de fomento que patrocinaram essa pesquisa (FACEPE, CNPq e CAPES) e aos parceiros que gentilmente cederam espaço em seus laboratórios para utilização de equipamentos (Laboratório de Catálise Orgânica do Departamento de Química Fundamental da UFPE, Laboratório de Glicoproteínas do Departamento de Bioquímica da UFPE e Laboratório de Andrologia do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco).

Referências

1. Stewart BW, Wild CP: **World Cancer Report 2014**. World Health Organization; 2014.

2. Turkson J, Cancer Drug Discovery and Anticancer Drug Development. The Molecular Basic of Human Cancer. 2017; Doi: 10.1007/978-1-59745-458-2_36.
3. Fernandes RS, Silva JO, Monteiro LOF, Leite EA, Cassali GD, Rubello D, et al. Doxorubicin-loaded nanocarriers: A comparative study of liposome and nanostructured lipid Carrier as alternatives for cancer therapy. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2016; 84: 252-257.
4. Citti C, Battisti UM, Cannazza G, Jozwiak K, Stasiak N, Puja G, et al. 7-Chloro-5-(furan-3-yl)-3-methyl-4H-benzo[e][1,2,4]thiadiazine 1,1Dioxide as Positive Allosteric Modulator of α -Amino-3-hydroxy-5methyl-4-isoxazolepropionic Acid (AMPA) Receptor. The End of the Unsaturated-Inactive Paradigm?. ACS chemical Neuroscience. 2015; Doi: 10.1021/acscchemneuro.5b00257.
5. Suzuki M, Deschamps JR, Jacobson AE, Rice KC. Chiral Resolution and Absolute Configuration of the Enantiomers of the Psychoactive “Designer Drug” 3,4-Methylenedioxypyrovalerone. Chirality. 2015; 27: 287-293.
6. Moraes CB, White KL, Braillard S, Perez C, Goo J, Gaspar L, et al. Enantiomers of Nifurtimox Do Not Exhibit Stereoselective Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity, Toxicity, or Pharmacokinetic Properties. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2015; 59: 3645-3647.
7. Mathé C, Gosselin G. L-Nucleoside enantiomers as antiviral drugs: A mini-review. Antiviral Research. 2006; 71: 276-281.
8. Scott AK. Stereoisomers and Drug Toxicity: The Value of Single Stereoisomer Therapy. Drug Safety Concepts. 1993; 8(2): 149-159.
9. Krause T, Tubbesing C, Benzing K, Scholer HF. Model reactions and natural occurrence of furans from hypersaline environments. Biogeosciences. 2014; 11: 2871-2882.
10. Seok YJ, Her JY, Kim YG, Kim MY, Jeong SY, Kim MK, et al. Furan in Thermally Processed Foods – A Review. Toxicological Research. 2015; 31(3): 241-253.

11. Sayahi MH, Adib M, Hamooleh Z, Zhu LG, Amanlou M. Reaction between Furan- or Thiophene-2-carbonyl Chloride, Isocyanides, and Dialkyl Acetylenedicarboxylates: Multicomponent Synthesis of 2,2'-Bifurans and 2-(Thiophen-2-yl)furans. *Helvetica Chimica Acta*. 2015; 98: 1231-1239.
12. Ajiboye TO, Naibi AM, Abdulazeez IO, Alege IO, Mohammed AO, Bello SA, et al. Involvement of oxidative stress in bactericidal activity of 2-(2-nitrovinyl) furan against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Microbial Pathogenesis*. 2016; 91: 107-144.
13. Logoglu E, Yilmaz M, Katircioglu H, Yakut M, Mercan S. Synthesis and biological activity studies of furan derivatives. *Medicinal Chemistry Research*. 2010; 19:490-497.
14. Alnabulsi S, Santina E, Russo I, Hussein B, Kadirvel M, Chadwick A, et al. Non-symmetrical furan-amidines as novel leads for the treatment of cancer and malaria. 2016; 111: 33-45.
15. Wang B, Shi Y, Zhan Y, Zhang L, Zhang Y, Wang L, et al. Synthesis and Biological Activity of Novel Furan/Thiophene and Piperazine-Containing (Bis)1,2,4-triazole Mannich Bases. *Chinese Journal of Chemistry*. 2015; 33: 1124-1134.
16. Nicolaou KC, Nilewski C, Hale CRH, Ahles CF, Chiu CA, Ebner C, et al. Synthesis and Biological Evaluation of Dimeric Furanoid Macroheterocycles: Discovery of New Anticancer Agents. *Journal of the American Chemical Society*. 2015; Doi: 10.1021/jacs.5b00141.
17. Zhang B, Li YH, Liu Y, Chen YR, Pan ES, You WW, Zhao PL. Design, synthesis and biological evaluation of novel 1,2,4-triazolo [3,4-b][1,3,4] thiadiazines bearing furan and thiophene nucleus. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015; 103: 335-342.
18. Ferreira DSP, Ferreira JG, Filho EFS, Princival JL. Tuning lipase-catalysed kinetic resolution of 2-substituted thiophenes and furans: A scalable chemoenzymatic route to masked γ -bis-oxo-alcohols. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2016; 126: 37-45.

19. Costa-Lotufo LV, Khan MTH, Ather A, Jimenez PC, Pessoa C, Moraes MEA, Morais MO. Studies of the anticancer potencial of plants used in Bangladeshi folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005; 99: 21-30.
20. Chen G, Zhang X, Zhao M, Wang Y, Cheng X, Wang D, et al. Celastrol targets mitochondrial respiratory chain complex I to induce reactive oxygen species-dependent cytotoxicity in tumor cells. *BMC Cancer*. 2011; Doi: 10.1186/1471-2407-11-170.
21. Koppkar SJ, Choudhari AS, Suryavanshi AS, Kumari S, Charropadhyay S, Kaul-Ghanekar R. Aqueous Cinnamon Extract (ACE-c) from the bark of *Cinnamomum cassia* causes apoptosis in human cervical cancer cell line (SiHa) through loss of mitochondrial membrane potential. *BMC Cancer*. 2010; Doi: 10.1186/1471-2407-10-210.
22. OECD/OCDE. OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. 2001.
23. Cardoso MFC, Rodrigues PC, Oliveira MEIM, Gama IL, Silva IMCB, Santos IO, et al. Synthesis and evaluation of the cytotoxic activity of 1,2-furanonaphthoquinones tethered to 1,2,3-1H-triazoles in myeloid and lymphoid leukemia cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2014; 84: 708-717.
24. Berghe TV, Grootjans S, Goossens V, Dondelinger Y, Krysko DV, Takahashi N, Vandenabeele. Determination of apoptotic and necrotic cell death *in vitro* and *in vivo*. *Methods*. 2013; 61: 117-129.
25. Hunsain I, Sharma A, Kumar S, Malik F. Purification and Characterization of Glutaminase Free Asparaginase from *Enterobacter cloacae*: In-Vitro Evaluation of cytotoxic Potential against Human Myeloid Leukemia HL-60 Cells. *Plos One*. 2015; Doi:10.1371/journal.pone.0148877.
26. Jobke B, Milovanovic P, Amling M, Busse B. Bisphosphonate-osteoclasts: Changes in osteoclast morphology and function induced by antiresorptive nitrogen-containing bisphosphonate treatment in osteoporosis patients. *Bone*. 2014; 59: 37-43.

27. Militão GCG, Dantas INF, Ferreira PMP, Alves APNN, Chaves DC, Monte FJQ, et al. *In vitro* and *in vivo* anticancer properties of cucurbitacin isolated from *Cayaponia racemosa*. *Pharmaceutical Biology*. 2012; 50(12): 1479-1487.
28. Zuryn A, Krajewski A, Szulc D, Litwiniec A, Grzanka A. Activity of cyclin B1 in HL-60 cells treated with etoposide. *Acta Histochemica*. 2016; 118: 537-543.
29. Henry CM, Hollville E, Martin SJ. Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. *Methods*. 2013; 61: 90-97.
30. Koopman G, Reutelingsperger CPM, Kuijten GAM, Keehnen RMJ, Pals ST, Van Oers MHJ. Annexin V for Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on B Cells Undergoing Apoptosis. *Blood*. 1994; 84(5): 1415-1420.
31. Budniak LS, Gaspar PC, Moraes ACR, Souza RK, Buzzi FC, Corrêa R, et al. Effects of 1,3,5-triphenyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazole derivatives on cell-cycle and apoptosis in human acute leukemia cell lines. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2016; Doi: 10.1139/cjpp-2016-0222.
32. Christensen ME, Jansen ES, Sanchez W, Waterhouse NJ. Flow cytometry based assays for the measurement of apoptosis-associated mitochondrial membrane depolarisation and cytochrome c release. *Methods*. 2013; 61: 138-145.
33. Reers M, Smiley ST, Mottola-Hartshorn C, Chen A, Lin M, Chen LB. Mitochondrial Membrane Potencial Monitored by JC-1 Dye. *Biophysical Methods*. 1995; 260: 406-417.
34. Gates LA, Lu D, Peterson LA. Trapping of *cis*-2-Butene-1,4-dial to Measure Furan Metabolism in Human Liver Microsomes by Cytochrome P450 Enzymes. *Drug Metabolism and Disposition*. 2012; 40(3): 596-601.
35. Gates LA, Phillips MB, Matter BA, Peterson LA. Comparative Metabolism of Furan in Rodent and Human Cryopreserved Hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition*. 2014; 42: 1132-1136.

- 725 36. Peterson LA, Cummings ME, Chan JY, Vu CC, Matter BA. Identification of a *cis*-2-
726 Butene-1,4-dial-derived Glutathione Conjugate in the Urine of Furan-Treated Rats. *Chemical*
727 *Research in Toxicology*. 2006; 19(9): 1138-1141.
728
- 729 37. Hartman JH, Miller GP, Caro AA, Byrum SD, Orr LM, Mackintosh SG, et al. 1,3-
730 Butadiene-induced mitochondrial dysfunction is correlated with mitochondrial CYP2E1
731 activity in Collaborative Cross mice. *Toxicology*. 2017; Doi: 10.1016/j.tox.2017.01.005.
732
- 733 38. Gill S, Kavanagh M, Barker M, Weld M, Vavasour E, Hou Y, Cooke GM. Subchronic
734 Oral Toxicity Study of Furan in B6C3F1 Mice. *Toxicology Pathology*. 2011; 39: 787-794.

5 CONCLUSÕES GERAIS

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que:

- O derivado de furano **3g** é uma substância citotóxica para células de câncer;
- Sua atividade biológica não estar ligada a um dos enantiômeros;
- A substância **rac-3g** apresenta ação tempo e dose-dependente;
- Sua atividade citotóxica provavelmente está relacionada ao processo de necrose celular;
- **rac-3g** apresenta diferentes graus de toxicidade dependendo da dose, sendo os órgãos mais afetados são os fígado e rins;
- A toxicidade mostrada pela substância **rac-3g** possivelmente seja decorrente da abertura do anel furano pelo citocromo P450.

REFERÊNCIAS

AJIBOYE, T. O.; NAIBI, A. M.; ABDULAZEEZ, I. O.; ALEGE, I. O.; MOHAMMED, A. O.; BELLO, S. A.; YUSUF, I. I.; IBITOYE, O. B.; MURITALA, H. F. Involvement of oxidative stress in bactericidal activity of 2-(2-nitrovinyl) furan against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. **Microbial Pathogenesis**. v. 91, p. 107-114, 2016.

ALNABULSI, S.; SANTINA, E.; RUSSO, I.; HUSSEIN, B.; KADIRVEL, M.; CHADWICK, A.; BICHENKOVA, E. V.; BRYCE, R. A.; NOLAN, K.; DEMONACOS, C.; STRATFORD, I. J.; FREEMAN, S. Non-symmetrical furan-amidines as novel leads for the treatment of cancer and malaria. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 111, p. 33-45, 2016.

ASIF, M. Progress in synthesis, chemical properties and biological activity of biologically diverse thiophene derivatives. **International Journal of current Research in Applied Chemistry e Chemical Engineering**. v. 2 (1), p. 42-55, 2016.

BERGHE, T. V.; GROOTJANS, S.; GOOSSENS, V.; DONDELINGER, Y.; KRYSKO, D. V.; TAKAHASHI, N.; VANDENABEELE, P. Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. **Methods**. v. 61, p. 117-129, 2013.

BERGHE, T. V.; LINKERMANN, A.; JOUAN-LANHOUE, S.; WALCZAK, H.; VANDENABEELE, P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v. 15, p. 135-147, 2014.

BERTHELOT, J-M.; LE GOFF, B.; NEEL, A.; MAUGARS, Y. NETosis: At the crossroads of rheumatoid arthritis, lupus, and vasculitis. **Joint Bone Spine**. 2016.

BYMASTER, F. P.; BEEDLE, E. E.; FINDLAY, J.; GALLAGHER, P. T.; KRUSHINSKI, J. H. MITCHELL, S.; ROBERTSON, D. W.; THOMPSON, D. C.; WALLACE, L.; WONG, D. T. Duloxetine (CymbaltaTM), a Dual Inhibitor of Serotonin and Norepinephrine Reuptake. **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**. v.13, p. 4477-4480, 2003.

CAO, H.; ZHAN, H.; CEN, J.; LIN, J.; LIN, Y.; ZHU, Q.; FU, M.; JIANG, H. Copper-Catalyzed C-O Bond Formation: Na Efficient One-Pot Highly Regioselective Synthesis of Furans from (2-furyl) Carbene Complexes. **Organic Letters**. v. 15, p. 1080-1083, 2013.

CHAN, K. Y. K.; OZCELIK, H.; CHEUNG, A. N. Y.; NGAN, H. Y. S.; KHOO, U. Epigenetic Factors Controlling the *BRCA1* and *BRCA2* Genes in Sporadic Ovarian Cancer. **Cancer Research**. v. 62, p. 4151-4156, 2002.

CHANDLER, M. R.; BILGILI, E. P.; MERNER, N. D. A Review of Whole-Exome Sequencing Efforts Toward Hereditary Breast Cancer Susceptibility Gene Discovery. **Human Mutation**. v. 37(9), p. 835-846, 2016.

CHANDRASEKARAN, G.; HWANG, E. C.; KANG, T. W.; KWON, D.; PARK, K.; LEE, J.; LAKSHMANAN, V. *In Silico* Analysis of the deleterious nsSNP's (missense) in the Homeobox domain of human HOXB13 gene responsible for hereditary prostate cancer. **Chemical Biology e Drug Design**. 2017.

CONDIT, P. T.; CHANES, R. E.; JOEL, W. Renal Toxicity of methotrexate. *Cancer*. v. 23, p. 126-131, 1969.

CONFORTI, L.; GILLEY, J.; COLEMAN, M. P. Wallerian degeneration: an emerging axon death pathway linking injury and disease. **Nature Reviews Neuroscience**. v. 15(6), p. 394-409, 2014.

DEY, S.; SAYERS, C. M.; LEHMAN, S. L.; CHENG, Y.; CERNIGLIA, G. J.; TETTLE, S. W.; FELDMAN, M. D.; ZHANG, P. J. L.; FUCHS, S. Y.; DIEHL, J. A.; KOUMENIS, C. The transcription factor ATF4 regulates resistance to anoikis and promotes metastasis in fibrosarcoma via cooperative upregulation of Heme Oxygenase-1 with Nrf2. *Cancer Research*. v. 75(15), p. 1262-1262, 2015.

DOITSH, G.; GALLOWAY, N. L.; GENG, X.; YANG, Z.; MONROE, K. M.; ZEPEDA, O.; GREENE, W. C. Cell Death by Pyroptosis Drives CD4 T-Cell Depletion in HIV-1 Infection. **Nature**. v. 505(7484), p. 509-514, 2014.

DONG, F.; LI, J.; CHANKVETADZE, B.; CHENG, Y.; XU, J.; LIU, X.; LI, Y.; CHEN, X.; BERTUCCI, C.; TEDESCO, D.; ZANASI, R.; ZHENG, Y. Chiral Triazole Fungicide Difenconazole: Absolute Stereochemistry, Stereoselective Bioactivity, Aquatic Toxicity, and Environmental Behavior in Vegetables and Soil. **Environmental Science e Technology**. v.47(7), p. 3386-3394, 2013.

ERDEM, B.; KUÇUKYILDIRIM, S.; SAGLAR, E.; POLAT, Z.; MERGEN, H. Promoter hypermethylation of p16 and APC in gastrointestinal cancer patients. **Turk J Gastroenterol**. v. 25, p. 512-517, 2014.

FANE, M.; HARRIS, L.; SMITH, A. G.; PIPER, M. Nuclear Factor One transcription factors as epigenetic regulators in câncer. **International Journal of Cancer**. 2017.

FERNANDES, R. S.; SILVA, J. O.; MONTEIRO, L. O. F.; LEITE, E. A.; CASSALI, G. D.; RUBELLO, D.; CARDOSO, V. N.; FERREIRA, L. A. M.; OLIVEIRA, M. C.; BARROS, A. L. B. Doxorubicin-loaded nanocarriers: A comparative study of liposome and nanostructured lipid carrier as alternatives for cancer therapy. **Biomedicine e Pharmacotherapy**. v. 84, p. 252-257, 2016.

FERNANDES JÚNIOR, H. J. **Dissecando e desmistificando o câncer**. In Bifulco, V. A. et al. Câncer: uma visão multiprofissional. Barueri: Minha Editora, 2010.

FRAISER, L. H.; KANEKAL, S.; KEHRER, J. P. Cyclophosphamide Toxicity: Characterising and Avoiding the Problem. **Drugs**. v. 42(5), p. 781-795, 1991.

GALLUZZI, L.; PEDRO, J. M. B-S.; VITALE, I.; AARONSON, S. A.; ABRAMS, J. M.; ADAM, D.; ALNEMRI, E. S.; ALTUCCI, L.; ANDREWS, D.; ANNICCHIARICO-PETRUZZELLI, M.; BAEHRECKE, E. H.; BAZAN, N. G.; BERTRAND, M. J.; BIANCHI, K.; BLAGOSKLONNY, M. V.; BLOMGREN, K.; BOMER, C.; BREDESEN, D. E.; BRENNER, C.; CAMPANELLA, M.; CANDI, E.; CECCONI, F.; CHAN, F. K.; CHANDEL, N. S.; CHENG, E. H.; CHIPUK, J. E.; CIDLOWSKI, J. A.; CIECHANOVER, A.; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L.; DE LAURENZI, V.; DE MARIA, R.; DEBATIN, K-M.; DI DANIELE, N.; DIXIT, V. M.; DYNLACHT, D. B.; EL-DEIRY, W. S.; FIMIA, G. M.; FLAVELL, R. A.; FULDA, S.; GARRIDO, C.; GOUGEON, M-L.; GREEN, D. R.; GRONEMEYER, H.; HAJNOCZKY, G.; HARDWICK, J. M.; HENGARTNER,

M. O.; ICHIJO, H.; JOSEPH, B.; JOST, P. J.; KAUFMANN, T.; KEPP, O.; KLIONSKY, D. J.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LEMASTERS, J. J.; LEVINE, B.; LINKERMANN, A.; LIPTON, S. A.; LOCKSHIN, R. A.; LÓPEZ-OTÍN, C.; LUGLI, E.; MADEO, F.; MALORNI, W.; MARINE, J.-C.; MARTIN, S. J.; MARTINOU, J.-C.; MEDEMA, J. P.; MEIER, P.; MELINO, S.; MIZUSHIMA, N.; MOLL, U.; MUNOZ-PINEDO, C.; NUNEZ, G.; OBERST, A.; PANARETAKIS, T.; PENNINGER, J. M.; PETER, M. E.; PIACENTINI, M.; PINTON, P.; PREHN, J. H.; PUTHALAKATH, H.; RABINOVICH, G. A.; RAVICHANDRAN, K. S.; RIZZUTO, R.; RODRIGUES, C. M.; RUBINSZTEIN, D. C.; RUDEL, T.; SHI, Y.; SIMON, H.-U.; STOCKWELL, B. R.; SZABADKAI, G.; TAIT, S. W.; TANG, H. L.; TAVERNARAKIS, N.; TSUJIMOTO, Y.; BERGHE, T. V.; VANDENABEELE, P.; VILLUNGER, A.; WAGNER, E. F.; WALCZAK, H.; WHITE, E.; WOOD, W. G.; YUAN, J.; ZAKERI, Z.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G.; KROEMER, G. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. **Cell Death and Differentiation**. v. 22, p. 58-73, 2015.

GATES, L. A.; LU, D.; PETERSON, L. A. Trapping of *cis*-2-Butene-1,4-dial to Measure Furan Metabolism in Human Liver Microsomes by Cytochrome P450 Enzymes. **Drug Metabolism and Disposition**. v. 40(3), p. 596-601, 2012.

GATES, L. A.; PHILLIPS, M. B.; MATTER, B. A.; PETERSON, L. A. Comparative Metabolism of Furan in Rodent and Human Cryopreserved Hepatocytes. **Drug Metabolism and Disposition**. v. 42, p. 1132-1136, 2014.

GILL, S.; KAVANAGH, M.; BARKER, M.; WELD, M.; VAVASOUR, E.; HOU, Y.; COOKE, G. M. Subchronic Oral Toxicity Study of Furan in B6C3F1 Mice. **Toxicology Pathology**. v. 39, p. 787-794, 2011.

GRIGALAVICIUS, M.; MOAN, J.; DAHLBACK, A.; JUZENIENE, A. Daily, seasonal, and latitudinal variations in solar ultraviolet A and B radiation in relation to vitamin D production and risk for skin cancer. **International Journal of Dermatology**. v. 55, p. 23-28, 2016.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**. v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

IARC – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - MONOGRAPHS. **Biological Agents – A Review of Human Carcinogens**. World Health Organization. v. 100B. França, p. 499, 2012.

IARC – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Global battle against cancer won't be won with treatment alone Effective prevention measures urgently needed to prevent cancer crisis**. World Health Organization. Londres, p. 2, 2014.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSE ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro-INCA, p. 126, 2015.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSE ALENCAR GOMES DA SILVA. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>. Acessado em 10 de dezembro de 2016.

JACQUES, V.; CZARNIK, A. W.; JUDGE, T. M.; VAN DER PLOEG, L. H. T.; DEWITT, S. H. Differentiation of anti-inflammatory and antitumorigenic properties of stabilized enantiomers of thalidomide analogs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 112(12), p. E1471-E1479, 2015.

JULES-ELYSEE, H.; WHITE, D. A. Bleomycin-induced pulmonary toxicity. **Europe PMC**. v. 11 (1), p. 1-20, 1990.

KASPRZYK-HORDERN, B. Pharmacologically active compounds in the environment and their chirality. **Chemical Society Reviews**. v. 39, p. 4466-4503, 2010.

KENNEDY, B. J. 5-Fluorouracil toxicity. **Cancer**. v. 86(7), p. 1099-1100, 1999.

KOSCHMANN, C.; NUNEZ, F. J.; MENDEZ, F.; BROSANAN-CASHMAN, J. A.; MEEKER, A. K.; LOWENSTEIN, P. R.; CASTRO, M. G. Mutated Chromatin Regulatory Factors as Tumor Drivers in Cancer. **Cancer Research**. v. 77(2), 2017.

KRAUSE, T.; TUBBESING, C.; BENZING, K.; SCHOLER, H. F. Model reactions and natural occurrence of furans from hypersaline environments. **Biogeosciences**. v. 11, p. 2871-2882, 2014.

LAI, T. W.; ZHANG, S.; WANG, Y. T. Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection. **Progress in Neurobiology**. v. 115, p. 157-188, 2014.

LEES, P.; HUNTER, R. P.; REEVES, P. T.; TOUTAIN, P. L. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of stereoisomeric drugs with particular reference to bioequivalence determination. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. v. 35(1), p. 17-30, 2012.

LIMA, V. L. E. Os Fármacos e a Quiralidade Uma Breve Abordagem. **Química Nova**. v. 20 (6), p. 657-663, 1997.

LOGOGLU, E.; YILMAZ, M.; KATIRCIOGLU, H.; YAKUT, M.; MERCAN, S. Synthesis and biological activity studies of furan derivatives. **Medicinal Chemistry Research**. v. 19, p. 490-497, 2010.

LÓPES-SERNA, R.; KASPRZYK-HOUDERN, B.; PETROVIÉ, M.; BARCELÓ, D. Multi-residue enantiomeric analysis of pharmaceuticals and their active metabolites in the Guadalquivir River Basin (South Spain) by chiral liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem**. v. 405, p. 5859-5873, 2013.

LUKEVITS, É.; DEMICHEVA, L. Biological activity of furan derivatives (review). **Chemistry of Heterocyclic Compounds**. v. 29(3), p. 243-267, 1993.

MAASE, H.; HANSEN, S. W.; ROBERTS, J. T.; DOGLIOTTI, L.; OLIVER, T.; MOORE, M. J.; BODROGI, I.; ALBERS, P.; KNUTH, A.; LIPPERT, C. M.; KERBRAT, P.; ROVIRA, P. S.; WERSALL, P.; CLEALL, S. P.; ROYCHOWDHURY, D. F.; TOMLIN, I.; VISSEREN-GRUL, C. M.; CONTE, P. F. Gemcitabine and Cisplatin Versus Methotrexate, Vinblastine, Doxorubicin, and Cisplatin in Advanced or Metastatic Bladder Cancer: Results of a Large, Randomized, multinational, Multicenter, Phase III Study. **Journal of Clinical Oncology**. v. 17(17), p. 3068-3077, 2000.

MAROTTI, I.; MAROTTI, M.; PICCAGLIA, R.; NASTRI, A.; GRANDI, S.; DINELLI, G. Thiophene occurrence in different *Tagetes* species: agricultural biomasses as sources of biocidal substances. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 90, p. 1210-1217, 2010.

MARTINEZ-FIERRO, M. L.; LEACH, R. J.; GOMEZ-GUERRA, L. S.; GARZA-GUAJARDO, R.; JONSON-PAIS, T.; BEUTEN, J.; MORALES-RODRIGUEZ, I. B.; HERNANDEZ-ORDONEZ, M. A.; CALDERON-CARDENAS, G.; ORTIZ-LOPEZ, R.; RIVAS-ESTILLA, A. M.; ANCER-RODRIGUEZ, J. ROJAS-MARTINEZ, A. Identification of viral infections in the prostate and evaluation of their association with câncer. **BMC Cancer**. v. 10(1), 2010.

MARTINEZ-GIRÓN, A. B.; MARINA, M. L.; CREGO, A. L. Chiral separation of a basic drug with two chiral centers by electrokinetic chromatography for its pharmaceutical development. **Journal of Chromatography A**. v. 1467, p. 427-435, 2016.

MCCLOY, R. A.; ROGERS, S.; CALDON, C. E.; LORCA, T.; CASTRO, A.; BURGESS, A. Partial inhibition of Cdk1 in G2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. **Cell Cycle**. v. 13(9), p. 1400-1412, 2014.

MELCHARDT, T.; WEISS, L.; GREIL, R.; EGLE, A. Viral infections and their management in patients with chronic lymphocytic leukemia. **Leukemia e Lymphoma**. v. 54(8), p. 1602-1613, 2013.

MEYRING, M.; MUHLENBROCK, C.; BLASCHKE, G. Investigation of the stereoselective *in vitro* biotransformation of thalidomide using a dual cyclodextrin system in capillary electrophoresis. **Electrophoresis**. v. 21, p. 3270-3279, 2000.

MOAN, J.; GRIGALAVICIUS, M.; BATURAITÉ, Z.; DAHLBACK, A.; JUZZENIENE, A. The relationship between UV exposure and incidence of skin câncer. **Photodermatology, photoimmunology e photomedicine**. v. 31(1), p. 26-35, 2015.

NESTE, L. V.; HERMAN, J. G.; OTTO, G.; BIGLEY, J. W.; EPSTEIN, J. I.; CRIEKINGE, W. V. The Epigenetic Promise for Prostate Cancer Diagnosis. **The Prostate**. v. 72, p. 1248-1261, 2012.

NICOLAOU, K. C.; NILEWSKI, C.; HALE, C. R. H.; AHLES, C. F.; CHIU, C. A.; EBNER, C.; ELMARROUNI, A.; YANG, L.; STILE, K.; NAGRATH, D. Synthesis and Biological Evaluation of Dimeric Furanoid Macroheterocycles: Discovery of New Anticancer Agents. **Journal of American Chemical Society**. v. 137(14), p. 4766-4770, 2015.

NIKOLETOPOULOU, V.; MARKAKI, M.; PALIKARAS, K.; TAVERNARAKIS, N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1833(12), p. 3448-3459, 2013.

OLIVEIRA, P. A.; COLAÇO, A.; CHAVES, R.; GUEDES-PINTO, H.; DE-LA-CRUZ, L. F.; LOPES, C. Chemical carcinogenesis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 79(4), p. 593-616, 2007.

OLIVEIRA, J. F.; SILVA, A. L.; VENDRAMINI-COSTA, D. B.; AMORIM, C. A. C.; CAMPOS, J. F.; RIBEIRO, A. G.; MOURA, R. O.; NEVES, J. L.; RUIZ, A. L. T.; CARVALHO, J. E.; LIMA, M. C. A. Synthesis of thiophene-thiosemicarbazone derivatives and evaluation of their *in vivo* antitumor activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 104, p. 148-156, 2015.

OTTO, T.; SICINSKI, P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**. v. 17(2), p. 93-115, 2017.

OUYANG, L.; SHI, Z.; ZHAO, S.; WANG, F. T.; ZHOU, T. T.; LIU, B.; BAO, J. K. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Proliferation**. v. 45, p. 487-498, 2012.

PARTIN, A. W.; CRIEKINGE, W. V.; TROCK, B. J.; EEPSTEIN, J. I.; NESTE, L. V. Clinical Evaluation of an Epigenetic Assay to Predict Missed Cancer in Prostate Biopsy Specimens. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**. v. 127, p. 313-327, 2016.

PINTO, E. M.; BRONSTEIN, M. D. Aspectos Moleculares da Tumorigênese Hipofisária. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** v. 52, n. 4, p.599-610, 2008.

PROCTOR, R. N. The history of the discovery of the cigaretteelung cancer link: evidentiary traditions, corporate denial, global toll. **Tobacco Control**. v. 21, p. 87-91, 2012.

ROSENTHAL, S.; KAUFMAN, S. Vincristine Neurotoxicity. **Annals of International Medicine**. v. 80(6), p. 733-737, 1974.

RUDDERS, R. A.; HENSLEY, G. T. Bleomycin Pulmonary Toxicity. **CHEST Journal**. v. 63(4), p. 626-628, 1973.

SAFARZADEH, E.; SHOTORBANI, S. S.; BARADARAN, B. Herbal Medicine as Inducers of Apoptosis in Cancer Treatment. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**. v. 4(1), p. 421-427, 2014.

SAYAH, M. H.; ADIB, M.; HAMOOLEH, Z.; ZHU, L.; AMANLOU, M. Reaction Between Furan- or Thiophene-2-carbonyl Chloride, Isocyanides, and Dialkyl Acetylenedicarboxylates: Multicomponent Synthesis of 2,2-Bifurans and 2-(thiophen-2-yl)furans. **Helvetica Chimica Acta**. v. 98, p. 1231-1239, 2015.

SEOK, Y.; HER, J.; KIM, Y.; KIM, M. Y.; JEONG, S. Y.; KIM, M. K.; LEE, J.; KIM, C.; YOON, H.; LEE, K. Furan in Thermally Processed Foods – A Review. **Toxicological Research**. v. 31 (3), p. 241-253, 2015.

SILVA-JÚNIOR, E. F.; SILVA, E. P. S.; FRAÇA, P. H. B.; SILVA, J. P. N.; BARRETO, E. O.; SILVA, E. B.; FERREIRA, R. S.; GATTO, C. C.; MOREIRA, D. R. M.; SIQUEIRA-NETO, J. L.; MENDONÇA-JÚNIOR, F. J. B.; LIMA, M. C. A.; BORTOLUZZI, J. H.; SCOTTI, M. T.; SCOTTI, L.; MENEGHETTI, M. R.; AQUINO, T. M.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X. Design, synthesis, molecular docking and biological evaluation of thiophen-2-iminothiazolidine derivatives for use against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**. v. 24 (18), p. 4228-4240, 2016.

SINGH, V.; RAM, M.; KUMAR, R.; PRASAD, R.; ROY, B. K.; SINGH, K. K. Phosphorylation: Implications in Cancer. **The Protein Journal**. 2017.

SMITH, A. J.; OERTLE, J.; PRATO, D. Environmental Carcinogens and the Kinds of Cancers They Cause. **Open Journal of Oncology**. v. 3(1), 2014.

STEFANI, H. A. Introdução à Química de compostos heterocíclicos. Rio de Janeiro. **Guanabara Koogan**. P. 66-74, 2009.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. **World Cancer Report 2014**. World Health Organization. Lyon, 2014.

TRANOY-OPALINSKI, I.; LEGIGAN, T.; BARAT, R.; CLARHAUT, J.; THOMAS, M.; RENOUX, B.; PAPOT, S. b-Glucuronidase-responsive prodrugs for selective cancer chemotherapy: An update. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 74, p. 302-313, 2014.

TSE, A. K-W.; CHEN, Y-J.; FU, X-Q.; SU, T.; LI, T.; GUO, H.; ZHU, P-L.; KWAN, H-Y.; CHENG, B. C-Y.; CAO, H-H.; LEE, S. K-W.; FONG, W-F.; YU, Z-L. Sensitization of melanoma cells to alkylating agent-induced DNA damage and cell death via orchestrating oxidative stress and IKK β inhibition. **Redox Biology**. v. 11, p. 562-576, 2017.

TURKSON, J. "Cancer Drug Discovery and Anticancer Drug Development." **The Molecular Basis of Human Cancer**. Springer New York. p. 695-707, 2017.

ULRICH, C. M.; YASUI, Y.; STORB, R.; SCHUBERT, M. M.; WAGNER, J. L.; BIGLER, J.; ARIAIL, K. S.; KEENER, C. L.; LI, S.; LIU, H.; FARIN, F. M.; POTTER, J. D. Pharmacogenetics of methotrexate: toxicity among marrow transplantation patients varies with the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. **Blood**. v. 98(1), p. 231-234, 2001.

VAZQUEZ-ROIG, P.; KASPRZYK-HORDEM, B.; BLASCO, C.; PICÓ, Y. Stereoisomeric profiling of drugs of abuse and pharmaceuticals in wastewaters of Valencia (Spain). **Science of the Total Environment**. v. 494(495), p. 49-57, 2014.

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

VOIGT, S.; PHILIPP, S.; DAVARNIA, P.; WINOTO-MORBACH, S.; RODER, C.; ARENZ, C.; TRAUZOLD, A.; KABELITZ, D.; SCHUTZE, S.; KALTHOFF, H.; ADAM, D. TRAIL-induced programmed necrosis as a novel approach to eliminate tumor cells. **BMC Cancer**. v. 14(1), 2014.

WACKER, M.; HOLICK, M. F. Sunlight and Vitamin D. **Dermato-Endocrinology**. v. 5(1), p. 51-108, 2013.

WANG, B.; SHI, Y.; ZHAN, Y.; ZHANG, L.; ZHANG, Y.; WANG, L.; ZHANG, X.; LI, Y.; LI, Z.; LI, B. Synthesis and Biological Activity of Novel Furan/Thiophene and Piperazine-Containing (Bis)1,2,4-triazole Mannich Bases. **Chinese Journal of Chemistry**. v. 33, p. 1124-1134, 2015.

WEINBERG, R. A. **A Biologia do Câncer**. 1 ed. ARTMED. p. 864, 2008.

WEN, S.; NIU, Y.; LEE, S. O.; CHANG, C. Androgen receptor (AR) positive vs negative roles in prostate cancer cell deaths including apoptosis, anoikis, entosis, necrosis and autophagic cell death. **Cancer Treatment Reviews**. v. 40(1), p. 31-40, 2014.

WU, G.; XU, L.; LIN, N.; LIU, B. UCN-01 induces S and G2/M cell cycle arrest through the p53/p21waf1 or CHK2/CDC25C pathways and can suppress invasion in human hepatoma cell lines. **BMC Cancer**. v. 13(1), 2013.

ZHANG, B.; LI, Y.; LIU, Y.; CHEN, Y.; PAN, E.; YOU, W.; ZHAO, P. Design, synthesis and biological activity evaluation of novel 1,2,4,-triazolo[3,4-b][1,3,4] thiadiazines bearing furan and thiophene nucleus. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 103, p. 335-342, 2015.

ZIMMERMAN, M. A.; HUANG, Q.; LI, F.; LIU, X.; LI, C. Y. Cell death-stimulated cell proliferation: A tissue regeneration mechanism usurped by tumors during radiotherapy. **Seminars in Radiation Oncology**. v. 23(4), p. 288-295, 2013.

ANEXO A - NORMAS DA REVISTA BMC CANCER

Preparing your manuscript

The information below details the section headings that you should include in your manuscript and what information should be within each section.

Please note that your manuscript must include a 'Declarations' section including all of the subheadings (please see below for more information).

Title page

The title page should:

- present a title that includes, if appropriate, the study design e.g.:
 - "A versus B in the treatment of C: a randomized controlled trial", "X is a risk factor for Y: a case control study", "What is the impact of factor X on subject Y: A systematic review"
 - or for non-clinical or non-research studies a description of what the article reports
- list the full names, institutional addresses and email addresses for all authors
 - if a collaboration group should be listed as an author, please list the Group name as an author. If you would like the names of the individual members of the Group to be searchable through their individual PubMed records, please include this information in the "Acknowledgements" section in accordance with the instructions below
- indicate the corresponding author

Abstract

The Abstract should not exceed 350 words. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract. Reports of randomized controlled trials should follow the CONSORT extension for abstracts. The abstract must include the following separate sections:

- **Background:** the context and purpose of the study

- **Methods:** how the study was performed and statistical tests used
- **Results:** the main findings
- **Conclusions:** brief summary and potential implications
- **Trial registration:** If your article reports the results of a health care intervention on human participants, it must be registered in an appropriate registry and the registration number and date of registration should be stated in this section. If it was not registered prospectively (before enrollment of the first participant), you should include the words 'retrospectively registered'. See our [editorial policies](#) for more information on trial registration

Keywords

Three to ten keywords representing the main content of the article.

Background

The Background section should explain the background to the study, its aims, a summary of the existing literature and why this study was necessary or its contribution to the field.

Methods

The methods section should include:

- the aim, design and setting of the study
- the characteristics of participants or description of materials
- a clear description of all processes, interventions and comparisons. Generic drug names should generally be used. When proprietary brands are used in research, include the brand names in parentheses
- the type of statistical analysis used, including a power calculation if appropriate

Results

This should include the findings of the study including, if appropriate, results of statistical analysis which must be included either in the text or as tables and figures.

Discussion

This section should discuss the implications of the findings in context of existing research and highlight limitations of the study.

Conclusions

This should state clearly the main conclusions and provide an explanation of the importance and relevance of the study reported.

List of abbreviations

If abbreviations are used in the text they should be defined in the text at first use, and a list of abbreviations should be provided.

Declarations

All manuscripts must contain the following sections under the heading 'Declarations':

Ethics approval and consent to participate

- Consent for publication
- Availability of data and material
- Competing interests
- Funding
- Authors' contributions
- Acknowledgements
- Authors' information (optional)

Please see below for details on the information to be included in these sections.

If any of the sections are not relevant to your manuscript, please include the heading and write 'Not applicable' for that section.

Ethics approval and consent to participate

Manuscripts reporting studies involving human participants, human data or human tissue must:

- include a statement on ethics approval and consent (even where the need for approval was waived)
- include the name of the ethics committee that approved the study and the committee's reference number if appropriate

Studies involving animals must include a statement on ethics approval.

See our [editorial policies](#) for more information.

If your manuscript does not report on or involve the use of any animal or human data or tissue, please state “Not applicable” in this section.

Consent for publication

If your manuscript contains any individual person's data in any form (including individual details, images or videos), consent for publication must be obtained from that person, or in the case of children, their parent or legal guardian. All presentations of case reports must have consent for publication.

You can use your institutional consent form or our [consent form](#) if you prefer. You should not send the form to us on submission, but we may request to see a copy at any stage (including after publication).

See our [editorial policies](#) for more information on consent for publication.

If your manuscript does not contain data from any individual person, please state “Not applicable” in this section.

Availability of data and materials

All manuscripts must include an ‘Availability of data and materials’ statement. Data availability statements should include information on where data supporting the results reported in the article

can be found including, where applicable, hyperlinks to publicly archived datasets analysed or generated during the study. By data we mean the minimal dataset that would be necessary to interpret, replicate and build upon the findings reported in the article. We recognise it is not always possible to share research data publicly, for instance when individual privacy could be compromised, and in such instances data availability should still be stated in the manuscript along with any conditions for access.

Data availability statements can take one of the following forms (or a combination of more than one if required for multiple datasets):

- The datasets generated and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS]
- The datasets used and/or analysed during the current study available from the corresponding author on reasonable request.
- All data generated or analysed during this study are included in this published article [and its supplementary information files].
- The datasets generated and/or analysed during the current study are not publicly available due [REASON WHY DATA ARE NOT PUBLIC] but are available from the corresponding author on reasonable request.
- Data sharing is not applicable to this article as no datasets were generated or analysed during the current study.
- The data that support the findings of this study are available from [third party name] but restrictions apply to the availability of these data, which were used under license for the current study, and so are not publicly available. Data are however available from the authors upon reasonable request and with permission of [third party name].
- Not applicable. If your manuscript does not contain any data, please state 'Not applicable' in this section.

More examples of template data availability statements, which include examples of openly available and restricted access datasets, are available [here](#).

BioMed Central also requires that authors cite any publicly available data on which the conclusions of the paper rely in the manuscript. Data citations should include a persistent identifier (such as a

DOI) and should ideally be included in the reference list. Citations of datasets, when they appear in the reference list, should include the minimum information recommended by DataCite and follow journal style. Dataset identifiers including DOIs should be expressed as full URLs. For example:

Hao Z, AghaKouchak A, Nakhjiri N, Farahmand A. Global integrated drought monitoring and prediction system (GIDMaPS) data sets. figshare. 2014.

<http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.853801>

With the corresponding text in the Availability of data and materials statement:

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS].^[Reference number]

Competing interests

All financial and non-financial competing interests must be declared in this section.

See our [editorial policies](#) for a full explanation of competing interests. If you are unsure whether you or any of your co-authors have a competing interest please contact the editorial office.

Please use the authors initials to refer to each author's competing interests in this section.

If you do not have any competing interests, please state "The authors declare that they have no competing interests" in this section.

Funding

All sources of funding for the research reported should be declared. The role of the funding body in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript should be declared.

Authors' contributions

The individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section. Guidance and criteria for authorship can be found in our [editorial policies](#).

Please use initials to refer to each author's contribution in this section, for example: "FC analyzed and interpreted the patient data regarding the hematological disease and the transplant. RH performed the histological examination of the kidney, and was a major contributor in writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript."

Acknowledgements

Please acknowledge anyone who contributed towards the article who does not meet the criteria for authorship including anyone who provided professional writing services or materials.

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements section.

See our [editorial policies](#) for a full explanation of acknowledgements and authorship criteria.

If you do not have anyone to acknowledge, please write "Not applicable" in this section.

Group authorship (for manuscripts involving a collaboration group): if you would like the names of the individual members of a collaboration Group to be searchable through their individual PubMed records, please ensure that the title of the collaboration Group is included on the title page and in the submission system and also include collaborating author names as the last paragraph of the "Acknowledgements" section. Please add authors in the format First Name, Middle initial(s) (optional), Last Name. You can add institution or country information for each author if you wish, but this should be consistent across all authors.

Please note that individual names may not be present in the PubMed record at the time a published article is initially included in PubMed as it takes PubMed additional time to code this information.

Authors' information

This section is optional.

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or

societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

Endnotes

Endnotes should be designated within the text using a superscript lowercase letter and all notes (along with their corresponding letter) should be included in the Endnotes section. Please format this section in a paragraph rather than a list.

References

All references, including URLs, must be numbered consecutively, in square brackets, in the order in which they are cited in the text, followed by any in tables or legends. The reference numbers must be finalized and the reference list fully formatted before submission.

Examples of the BioMed Central reference style are shown below. Please ensure that the reference style is followed precisely.

See our editorial policies for author guidance on good citation practice.

Web links and URLs: All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, as well as the date the site was accessed, in the following format: The Mouse Tumor Biology Database. <http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>. Accessed 20 May 2013. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link (e.g. for blogs) they should be included in the reference.

Example reference style:

Article within a journal

Smith JJ. The world of science. *Am J Sci*. 1999;36:234-5.

Article within a journal (no page numbers)

Rohrmann S, Overvad K, Bueno-de-Mesquita HB, Jakobsen MU, Egeberg R, Tjønneland A, et al. Meat consumption and mortality - results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. BMC Med. 2013;11:63.

Article within a journal by DOI

Slifka MK, Whitton JL. Clinical implications of dysregulated cytokine production. Dig J Mol Med. 2000; doi:10.1007/s801090000086.

Article within a journal supplement

Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan. Blood 1979;59 Suppl 1:26-32.

Book chapter, or an article within a book

Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. In: Bourne GH, Danielli JF, Jeon KW, editors. International review of cytology. London: Academic; 1980. p. 251-306.

OnlineFirst chapter in a series (without a volume designation but with a DOI)

Saito Y, Hyuga H. Rate equation approaches to amplification of enantiomeric excess and chiral symmetry breaking. Top Curr Chem. 2007. doi:10.1007/128_2006_108.

Complete book, authored

Blenkinsopp A, Paxton P. Symptoms in the pharmacy: a guide to the management of common illness. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.

Online document

Doe J. Title of subordinate document. In: The dictionary of substances and their effects. Royal Society of Chemistry. 1999. <http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document>. Accessed 15 Jan 1999.

Online database

Healthwise Knowledgebase. US Pharmacopeia, Rockville. 1998. <http://www.healthwise.org>. Accessed 21 Sept 1998.

Supplementary material/private homepage

Doe J. Title of supplementary material. 2000. <http://www.privatehomepage.com>. Accessed 22 Feb 2000.

University site

Doe, J: Title of preprint. <http://www.uni-heidelberg.de/mydata.html> (1999). Accessed 25 Dec 1999.

FTP site

Doe, J: Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-notes/rfc2169.txt> (1999). Accessed 12 Nov 1999.

Organization site

ISSN International Centre: The ISSN register. <http://www.issn.org> (2006). Accessed 20 Feb 2007.

Dataset with persistent identifier

Zheng L-Y, Guo X-S, He B, Sun L-J, Peng Y, Dong S-S, et al. Genome data from sweet and grain sorghum (*Sorghum bicolor*). GigaScience Database. 2011. <http://dx.doi.org/10.5524/100012>.

Figures, tables additional files**Preparing figures**

When preparing figures, please follow the formatting instructions below.

- Figures should be provided as separate files, not embedded in the main manuscript file.
- Each figure of a manuscript should be submitted as a single file that fits on a single page in portrait format.
- Tables should NOT be submitted as figures but should be included in the main manuscript file.
- Multi-panel figures (those with parts a, b, c, d etc.) should be submitted as a single composite file that contains all parts of the figure.
- Figures should be numbered in the order they are first mentioned in the text, and uploaded in this order.
- Figures should be uploaded in the correct orientation.

- Figure titles (max 15 words) and legends (max 300 words) should be provided in the main manuscript, not in the graphic file.
- Figure keys should be incorporated into the graphic, not into the legend of the figure.
- Each figure should be closely cropped to minimize the amount of white space surrounding the illustration. Cropping figures improves accuracy when placing the figure in combination with other elements when the accepted manuscript is prepared for publication on our site. For more information on individual figure file formats, see our detailed instructions.
- Individual figure files should not exceed 10 MB. If a suitable format is chosen, this file size is adequate for extremely high quality figures.
- **Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures (or tables) that have previously been published elsewhere.** In order for all figures to be open access, authors must have permission from the rights holder if they wish to include images that have been published elsewhere in non open access journals. Permission should be indicated in the figure legend, and the original source included in the reference list.

Figure file types

We accept the following file formats for figures:

- EPS (suitable for diagrams and/or images)
- PDF (suitable for diagrams and/or images)
- Microsoft Word (suitable for diagrams and/or images, figures must be a single page)
- PowerPoint (suitable for diagrams and/or images, figures must be a single page)
- TIFF (suitable for images)
- JPEG (suitable for photographic images, less suitable for graphical images)
- PNG (suitable for images)
- BMP (suitable for images)
- CDX (ChemDraw - suitable for molecular structures)

For information and suggestions of suitable file formats for specific figure types, please see our [author academy](#).

Figure size and resolution

Figures are resized during publication of the final full text and PDF versions to conform to the BioMed Central standard dimensions, which are detailed below.

Figures on the web:

- width of 600 pixels (standard), 1200 pixels (high resolution).

Figures in the final PDF version:

- width of 85 mm for half page width figure
- width of 170 mm for full page width figure
- maximum height of 225 mm for figure and legend
- image resolution of approximately 300 dpi (dots per inch) at the final size

Figures should be designed such that all information, including text, is legible at these dimensions. All lines should be wider than 0.25 pt when constrained to standard figure widths. All fonts must be embedded.

Figure file compression

- Vector figures should if possible be submitted as PDF files, which are usually more compact than EPS files.
- TIFF files should be saved with LZW compression, which is lossless (decreases file size without decreasing quality) in order to minimize upload time.
- JPEG files should be saved at maximum quality.
- Conversion of images between file types (especially lossy formats such as JPEG) should be kept to a minimum to avoid degradation of quality.

If you have any questions or are experiencing a problem with figures, please contact the customer service team at info@biomedcentral.com.

Preparing tables

When preparing tables, please follow the formatting instructions below.

- Tables should be numbered and cited in the text in sequence using Arabic numerals (i.e. Table 1, Table 2 etc.).
- Tables less than one A4 or Letter page in length can be placed in the appropriate location within the manuscript.
- Tables larger than one A4 or Letter page in length can be placed at the end of the document text file. Please cite and indicate where the table should appear at the relevant location in the text file so that the table can be added in the correct place during production.
- Larger datasets, or tables too wide for A4 or Letter landscape page can be uploaded as additional files. Please see [below] for more information.
- Tabular data provided as additional files can be uploaded as an Excel spreadsheet (.xls) or comma separated values (.csv). Please use the standard file extensions.
- Table titles (max 15 words) should be included above the table, and legends (max 300 words) should be included underneath the table.
- Tables should not be embedded as figures or spreadsheet files, but should be formatted using ‘Table object’ function in your word processing program.
- Color and shading may not be used. Parts of the table can be highlighted using superscript, numbering, lettering, symbols or bold text, the meaning of which should be explained in a table legend.
- Commas should not be used to indicate numerical values.

If you have any questions or are experiencing a problem with tables, please contact the customer service team at info@biomedcentral.com.

Preparing additional files

As the length and quantity of data is not restricted for many article types, authors can provide datasets, tables, movies, or other information as additional files.

All Additional files will be published along with the accepted article. Do not include files such as patient consent forms, certificates of language editing, or revised versions of the main manuscript document with tracked changes. Such files, if requested, should be sent by email to the journal's editorial email address, quoting the manuscript reference number. Please do not send patient consent forms unless requested.

Results that would otherwise be indicated as "data not shown" should be included as additional files. Since many web links and URLs rapidly become broken, BioMed Central requires that supporting data are included as additional files, or deposited in a recognized repository. Please do not link to data on a personal/departmental website. Do not include any individual participant details. The maximum file size for additional files is 20 MB each, and files will be virus-scanned on submission. Each additional file should be cited in sequence within the main body of text.

If additional material is provided, please list the following information in a separate section of the manuscript text:

- File name (e.g. Additional file 1)
- File format including the correct file extension for example .pdf, .xls, .txt, .pptx (including name and a URL of an appropriate viewer if format is unusual)
- Title of data
- Description of data

Additional files should be named "Additional file 1" and so on and should be referenced explicitly by file name within the body of the article, e.g. 'An additional movie file shows this in more detail [see Additional file 1]'.

For further guidance on how to use Additional files or recommendations on how to present particular types of data or information, please see [How to use additional files](#).