

Universidade Federal do Rio de Janeiro

ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTITUMORAL
DE ANÁLOGO DA ISATINA E DA
CONVOLUTAMIDINA A

Fabiana Sélis Guerra

2013



Universidade Federal do Rio de Janeiro

ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE ANÁLOGO DA ISATINA E DA CONVOLUTAMIDINA A

Fabiana Sélos Guerra

Dissertação submetida à coordenação do curso de pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia e Química Medicinal – área de concentração: Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Dias Fernandes

Rio de Janeiro

Agosto/2013

ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE ANÁLOGO
DA ISATINA E DA CONVOLUTAMIDINA A

Fabiana Sélos Guerra

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Dias Fernandes

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Aprovada por:

Profa. Dra. Patricia Dias Fernandes

Profa. Dra. Claudia Mermelstein

Profa. Dra. Claudia Rezende

Prof. Dr. Jorge Luiz Mendonça Tributino

Profa. Dra. Tereza Sollero Claudio-da-Silva

Rio de Janeiro

Agosto/2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Guerra, Fabiana S.

Análise da atividade antitumoral de análogo da Isatina e da Convolutamidina A/Fabiana Sélos Guerra. Rio de Janeiro: UFRJ 2013.

xv, 64f.: il.; 30 cm.

Orientador: Patricia Dias Fernandes

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ ICB/ Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal, 2013.

Referências Bibliográficas: f. 56-64.

1. Atividade antitumoral. 2. Análogo Isatina. 3. Análogo Convolutamidina A. I. Fernandes, Patricia Dias. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas. III. Análise da atividade antitumoral de análogo da Isatina e da Convolutamidina A.

DEDICATÓRIA

Ao meu marido, Kalebe Sélos, meus pais, Joalice e Luiz Antônio, minha família, irmãs, tios, cunhados, **fonte inesgotável de estímulo e carinho em todas as etapas desta busca pelo conhecimento.**

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Patricia Dias Fernandes, pela confiança, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado e por ser a maior incentivadora na superação de meus limites.

À Profa. Dra. Maria José Santos-Martinez pela infinita disponibilidade, por todos os ensinamentos, amizade, paciência e pela impecável recepção no Trinity College Dublin e ao seu aluno Shane Sullivan pela disposição e amizade em me ensinar os ensaios.

Ao Prof. Dr. Fábio Boylan, sempre gentil, educado, generoso. Obrigada pela recepção e orientação no Trinity College Dublin, sempre com muita sabedoria e presteza.

À Profa. Dra. Claudia Mermelstein e seus alunos, que me ajudaram sempre que solicitados com muita dedicação e disponibilidade, esclarecendo minhas dúvidas e me ensinando novas técnicas.

À Profa. Dra. Tereza Sollero, pela certeza de uma revisão ímpar.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e Faperj.

À minha amiga Mariana Antunes, que, compartilhando suas experiências, muitas vezes me incentivou e ajudou no desenvolvimento do meu trabalho.

Aos amigos do LAFID por estarem sempre presentes com as conversas animadas, com amizade e incentivo. Vocês são parte da minha família.

Aos meus familiares, meus pais, meus sogros, irmãs, cunhados, pelo incentivo, pelo exemplo e por toda ajuda e paciência nesse período de estudos.

Ao meu grande amor, marido, Kalebe Sélos, que está comigo em todos os momentos como o meu verdadeiro suporte, não só emocional, intelectual, afetivo, mas também financeiro. Amo muito.

A Deus, autor da minha vida, sobre todas as coisas.

[Digite texto]

RESUMO

ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE ANÁLOGO DA ISATINA E DA CONVOLUTAMIDINA A

Fabiana Sélos Guerra

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Dias Fernandes

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

O câncer de mama é o câncer mais comum entre as mulheres em todo o mundo e é responsável por aproximadamente 25% de todos os tumores malignos do sexo feminino com maior prevalência nos países desenvolvidos. O câncer de mama é a segunda principal causa de morte por câncer entre as mulheres no mundo. Apesar das abordagens terapêuticas e de diagnóstico já serem bastante desenvolvidas para este tipo de câncer, ainda há muito para ser elucidado, principalmente pela heterogeneidade dessa neoplasia. Trabalhos anteriores mostraram a atividade antitumoral da isatina e da convolutamidina A e por isso foram sintetizados análogos dessas moléculas, ISA017 e ISA161, para avaliação da possível atividade antitumoral *in vitro*. Foi utilizada a linhagem MCF7 de tumor de mama humano. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT e proliferação celular. A análise morfológica, o ensaio da Annexina V-APC por citometria de fluxo e a análise da ativação de genes para caspase 3 por PCR foram realizados para avaliar a ativação do processo apoptótico. O tratamento com ambos os compostos provocou queda na viabilidade celular na linhagem testada. A análise morfológica e o ensaio de Annexina V-APC mostram que a morte celular é por apoptose. A análise da ativação do gene que codifica caspase 3 mostra que a ISA017 é capaz de ativar caspase 3, porém a ISA161 não é capaz de ativar esse gene.

Palavras-chave: Isatina; Convolutamidina; Câncer de Mama; Morte Celular.

Rio de Janeiro
Agosto/2013

[Digite texto]

ABSTRACT

EVALUATE OF THE ANTITUMORAL ACTIVITY OF ANALOG FROM ISATIN AND CONVOLUTAMYDINE A

Fabiana Sélos Guerra

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Dias Fernandes

Abstract da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

The breast cancer is the most common cancer for women worldwide, and is responsible for about 25% of all female malignancies with a higher prevalence in developed countries. Breast cancer is the second leading cause of cancer-related death among females in the world. Although therapeutic and diagnostic approaches are well developed for this type of cancer, there is still much to be elucidated, mainly by the heterogeneity of this malignancy. Previous works has shown antitumor activity of isatin and convolutamydine A and analogs were synthesized, ISA017 and ISA161, to evaluate the possible antitumor activity in vitro. It was used the cell line MCF7 human breast tumor. Cell viability was evaluated by MTT assay and cell proliferation. Morphological analysis, the Annexina V-APC-assay for flow cytometry, gene caspase 3- activation analysis by PCR were realized to evaluate the apoptotic process activation. The treatment with both compounds reduced the cell viability at the tested cell line. Morphological analysis and Annexina V-APC-assay show that cell death is through apoptosis. The analysis of the gene-caspase 3 activation shows that the ISA017 is able to activate caspase 3, but the ISA161 is not able to activate this gene.

Keywords: Isatin; Convolutamydine; Breast Cancer, Cell Death.

Rio de Janeiro

Agosto/2013

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. CÂNCER	2
1.2. CÂNCER DE MAMA	4
1.3. ALVOS PARA TERAPIA DO CÂNCER DE MAMA.....	5
1.4. MORTE CELULAR POR APOPTOSE E NECROSE	8
1.5. ATIVAÇÃO DO PROCESSO APOPTÓTICO.....	10
1.5.1. VIA EXTRÍNSECA	11
1.5.2. VIA INTRÍNSECA	12
1.6. CASPASES.....	13
1.7. CONTROLE DO PROCESSO APOPTÓTICO	15
1.8. ISATINAS	17
1.8.1. AÇÕES DA ISATINA	19
1.8.2. AÇÕES DOS DERIVADOS DA ISATINA	19
1.9. CONVOLUTAMIDINA	20
1.10. RELEVÂNCIA DO ESTUDO	22
2. OBJETIVOS	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1. REAGENTES	26
3.2. DERIVADO DA ISATINA – ISA017.....	26
3.3. DERIVADO DA CONVOLUTAMIDINA A – ISA161	27
3.4. PREPARO DAS SOLUÇÕES DE USO DAS SUBSTÂNCIAS TESTADAS.....	29
3.5. CULTURA DE CÉLULAS	29
3.6. PROLIFERAÇÃO CELULAR	29

3.7. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (MTT)	30
3.8. ENSAIOS DE APOPTOSE.....	31
3.8.1. AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR	31
3.8.2. CITOMETRIA DE FLUXO – ANNEXINA V APC	31
3.8.3. RT-PCR PARA CASPASE 3	32
3.8.3.1. ISOLAMENTO DO RNA	32
3.8.3.2. SÍNTESE DO cDNA	33
3.8.3.3. REPLICAÇÃO DO DNA	34
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
4. RESULTADOS	36
4.1. ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE	37
4.1.1. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR – MTT	37
4.1.2. ENSAIO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR	41
4.2. ENSAIOS DE APOPTOSE	42
4.2.1. ANÁLISE MORFOLÓGICA	42
4.2.2. CITOMETRIA DE FLUXO – ANNEXINA V APC	43
4.2.3. RT-PCR PARA CASPASE 3	44
5. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÕES	54
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Processos de morte celular – necrose e apoptose	09
Figura 2. Vias de ativação de caspases.	11
Figura 3. Ativação da via Extrínseca pró-apoptótica	12
Figura 4. Via Intrínseca de ativação de caspases	13
Figura 5. Esquema do processo de ativação da apoptose pela via dos receptores de morte celular (Faz-FasL)	14
Figura 6. Envolvimento da família Bcl2 no processo apoptótico	16
Figura 7. Estrutura química da Isatina	17
Figura 8. <i>Calanthe discolor</i> Lindl e <i>Couroupita guianensis</i> Aubl	18
Figura 9. Estrutura química da Convolutamidina e fórmula molecular das convolutamidinas	19
Figura 10. Fotografia do briozoário marinho <i>Amathia convulata</i>	21
Figura 11. Estrutura química da Isatina e do Anel Indólico	21
Figura 12. Síntese da ISA017 a partir da Isatina	27
Figura 13. Rota sintética utilizada para obtenção da Convolutamidina A	28
Figura 14. Estrutura química da ISA161	28
Figura 15. Análise morfológica das células MCF7 incubadas com ISA017 e ISA161	43

LISTA DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 1. Ensaio viabilidade celular	37
Gráfico 2. Ensaio viabilidade celular	39
Gráfico 3. Ensaio viabilidade celular	40
Gráfico 4. Ensaio de proliferação celular	41
Gráfico 5. Ensaio de citometria de fluxo	44
Gráfico 6. Ensaio de RT-PCR para Caspase 3	45

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Protocolo de ciclização para a síntese de cDNA.	33
Tabela 2. Protocolo de replicação do DNA	34

LISTA DE ABREVIATURAS

%	porcentagem
µL	microlitro
APAF-1	fator ativador de protease apoptótica
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Bax	Bcl2 ligada a proteína X
Bcl2	<i>B-cell lymphoma protein 2</i>
cols.	colaboradores
COX-2	ciclooxigenase-2
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	dimetilssulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DP	desvio padrão
fig.	figura
IAP	proteína inibidora de apoptose
M	Molar
MAO	monoamino oxidase
mg	Miligrama
min.	Minute
mL	Mililitro
mM	milimolar
MMPs	metaloproteinases da matriz
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
nM	Nanomolar
nm	Nanômetro
NOSi	óxido nítrico sintase induzida
°C	graus Celcius
PBS	tampão salina fosfato
PGE ₂	prostaglandina E ₂
RNA	ácido ribonucleico
rpm	rotações por minuto
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>

seg.	segundo
SNC	sistema nervoso central
TNF α	fator de necrose tumoral α
TNFR1	receptor de fator de necrose tumoral
TNM	tumor, linfonodos e metástases
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
VEGF	fator de crescimento do endotélio vascular
XIAP	proteína inibidora de apoptose ligada ao X
YC-1	1-benzil-3(5-hidroximetil-2-furanil) indol
μg	micrograma
μM	micromolar

[Digite texto]

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer resulta de alterações intracelulares que levam geralmente a uma perda do controle da proliferação e/ou desregulação dos mecanismos de morte celular, resultado de uma mutação genética. Como, desde os primórdios, as mutações estão presentes, é razoável imaginar que a doença sempre existiu. A mais antiga evidência de câncer, no entanto, remonta a 8.000 a.C. O tipo mais comum de neoplasia encontrada em fósseis, e ainda assim raramente, é o osteossarcoma, um câncer ósseo. Para encontrar um único caso, é necessário estudar cerca de 5.000 fósseis com joelhos preservados. As primeiras descrições de tumores foram encontradas em papiros do Egito, e datam de 1.600 a.C. (MUKHERJEE, 2012).

O câncer foi, por muito tempo, considerado como uma doença dos países desenvolvidos e com grandes recursos financeiros. Há aproximadamente quatro décadas, a situação vem mudando, e a maior parte do ônus global do câncer pode ser observada em países em desenvolvimento, principalmente aqueles com poucos e médios recursos. Assim, nas últimas décadas, o câncer ganhou uma dimensão maior, convertendo-se em um evidente problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer (INCA, 2013).

Os tumores aparecem no organismo quando as células começam a crescer de uma forma descontrolada, em função de um dano nos genes. A causa dessa mutação pode ter três origens: genes que provocam alterações na sequência do DNA; radiações que quebram os cromossomos e alguns vírus que introduzem nas células DNAs anômalos. Na maioria das situações, as células saudáveis do organismo impedem que estes DNAs passem adiante as informações. O tumor desenvolve um conjunto de rede de [Digite texto]

vasos sanguíneos para se manter. Através da corrente sanguínea ou linfática, as células malignas chegam a outros órgãos, desenvolvendo a doença nestas regiões. Esse processo de irradiação da doença é conhecido como metástase (GARG e cols., 2013).

O câncer é considerado uma doença muito perigosa devido sua eficiente capacidade de multiplicação celular e colonização/invasão dos tecidos adjacentes ao tumor formado (AFFELDT e cols., 2013).

Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas. Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de vida (GARG e cols., 2013).

Apesar de ser, em várias situações, uma doença extremamente agressiva e de rápida evolução, o câncer é uma doença de múltiplos passos, ou seja, para que o câncer ocorra é necessário acontecer mais de uma lesão diferente no genoma celular para que se complete o processo de transformação. A proliferação celular é um processo extremamente coordenado onde a progressão pelas fases do ciclo celular é regulada, de modo muito preciso, por uma rede bioquímica muito complexa, que sinaliza o andamento e as passagens entre as fases do ciclo celular, G1, S, G2 e M. Esse controle é vital para a manutenção do ritmo de proliferação, para garantir a correta replicação do material genético, segregação dos cromossomos e coordenar os processos de diferenciação, senescência e morte (MALUMBRES e BARBACID, 2009). O mau funcionamento nessas vias leva ao aparecimento e perpetuação de mutações e aberrações cromossômicas que favorecem o aparecimento de diversas patologias, entre elas o câncer (PAULOVICH e cols., 1997; OGINO e cols., 2005).

1.2 Câncer de Mama

O câncer de mama é o tipo mais frequente de câncer em mulheres, tanto em regiões desenvolvidas como em desenvolvimento e, segundo Curado, 2011, é esperado que 1.380.000 novos casos de câncer de mama foram diagnosticados em 2008 (23% de todos os tipos de câncer). As taxas de incidência variam de 19,3 por cada 100.000 mulheres na África Oriental para 89,9 por cada 100.000 mulheres no Oeste da Europa. São mais elevadas (mais de 80 casos por cada 100.000 mulheres) nas regiões desenvolvidas do mundo (exceto Japão) e baixas (inferior a 40 por cada 100.000 mulheres) na maioria das regiões em desenvolvimento (CURADO, 2011).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima-se que aproximadamente 490.000 novos casos de câncer de mama foram diagnosticados no Brasil em 2011. A alta incidência está relacionada a diferença socioeconômica, fatores reprodutivos, hormonais e nutricionais. Em países com maiores recursos, o rastreamento mamográfico afeta consideravelmente os dados para diagnóstico, incidência e mortalidade por câncer de mama quando comparados a países menos desenvolvidos com mulheres com menor poder aquisitivo. (BRAY e cols., 2004; PARKIN e cols., 2005; CARNESECA e cols., 2013).

A expectativa de vida para pacientes com câncer de mama tem aumentado significativamente ao longo do tempo. Estas melhorias significativas foram obtidas graças ao desenvolvimento de novos fármacos e terapias alternativas. Em paralelo, os avanços na área de triagem e no campo de ciências básicas tem proporcionado uma nova visão na biologia do câncer de mama. Também precisa ser mencionada a forte conscientização desenvolvida por cientistas e autoridades de saúde com relação aos cuidados de suporte, como gestão de sintomas, melhoria da qualidade de vida e na minimização do impacto psicológico da doença (DOGAN e cols., 2013).

Em contrapartida, marcadores de terapia-alvo mostram resultados inconsistentes na terapia do câncer de mama. Agentes de segmentação que estão atualmente sendo investigados incluem receptor do fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento vascular endotelial, e inibidores da polimerase, mas ainda existe a falta de melhoria consistente na sobrevivência de pacientes com câncer de mama (ZHOU e cols., 2013)

Para muitas mulheres com câncer de mama em estágio inicial, a cirurgia conservadora da mama (cirurgia que não faz a ressecção de toda a mama) pode remover qualquer doença macroscópica que tenha sido detectada, no entanto, alguns focos tumorais microscópicos podem permanecer na mama conservada que poderia, se não tratada, levar a recidiva loco-regional ou metástases distantes, ou ambos (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), 2011)

1.3 Alvos para terapia do câncer de mama

O câncer de mama, mesmo em um estágio inicial, é uma doença heterogênea em que a presença de alterações nos mecanismos moleculares afeta o crescimento dos tumores, progressão e o potencial metastático limitando o valor do prognóstico segundo a classificação tumor, linfonodos e metástases, (TNM). No entanto, em contraste com outras neoplasias, o câncer da mama é potencialmente curável devido à existência de várias modalidades de tratamento e das próprias características biológicas do tumor (CORADINI e DAIDONE, 2004).

As pesquisa sobre o câncer de mama tem sido focadas na detecção e classificação do tumor associado a biomarcadores que mostram o perfil biológico de cada caso no diagnóstico, prognóstico e predição de estratégias terapêuticas. A grande quantidade de marcadores descoberta nas últimas três décadas inclui fatores

relacionados com diferentes funções da célula, tais como a proliferação, apoptose, regulação hormonal, angiogênese, invasão e metástase (THOMADAKI e cols., 2007).

A transformação maligna da célula mamária normal é um processo que envolve mudanças na atividade de diferentes genes e proteínas, resultando na perda do controle do ciclo celular e de um programa de diferenciação. Estes eventos celulares são geralmente regulados por programas genéticos específicos, controlados pela ação sequencial de fatores de transcrição. (MESTER e REDEUILH, 2008).

Produtos de oncogenes como *ras*, *c-myc* e receptores de fatores de crescimento, como os membros da família HER/erbB, tem sido extensivamente investigados, mas seu impacto ainda continua controverso (CORADINI e DAIDONE, 2004). Outros potenciais marcadores tem sido identificados, incluindo os receptores de esteroides (ER e PR), p53, c-erbB-2, CEA, CA15.3, CA125, catepsina D e poliadenilato polimerase. Os genes relacionados com a apoptose também têm sido estudados no câncer de mama, tanto para prognóstico como também para marcadores preditivos (THOMADAKI e cols., 2007). Pouco se sabe sobre a iniciação dos eventos genéticos que disparam a transformação maligna das células epiteliais mamárias, com exceção da forma hereditária (perda heterozigossidade BRCA1 ou BRCA2) (MESTER e REDEUILH, 2008). Sabe-se que a origem do câncer não é apenas a partir de um único evento. É geralmente aceito que uma mutação genética é essencial para a transformação maligna e que mutações no gene de p53 são altamente significantes. Alterações/mutações em p53 são vistas em 53% dos casos de câncer, incluindo o câncer de mama, sendo este um importante fator no desenvolvimento desta doença (ZIYAIE e cols., 2000). O gene p53 é conhecido como um supressor tumoral e está envolvido na regulação do crescimento celular e divisão, transcrição do gene, reparo do DNA e estabilidade genômica. A ativação de p53 está relacionada aos estímulos estressantes como danos ao DNA,

hipóxia, choque térmico, irradiação ionizante, irradiação ultravioleta e agentes quimioterápicos. Esses estímulos, por sua vez, dão origem a uma gama de respostas adaptativas que incluem parada do ciclo celular em G1 permitindo a ação do reparo do DNA ou levar a apoptose (morte celular programada) (ZIYAIE e cols., 2000).

A sinalização do estrogênio é um regulador chave do desenvolvimento da glândula mamária, carcinogênese mamária e progressão quando a via de sinalização do estrogênio se torna desregulada. Existem dois receptores de estrogênio distintos, ER α e ER β , modulam a sinalização de estrogênio e regulam a transcrição por impulsionar o crescimento, a proliferação, diferenciação, e muitos outros processos celulares. Assim, a sinalização do receptor de estrógeno é o alvo mais atraente para terapia clínica do câncer de mama ER-positivo (IRSIK e cols., 2013).

No entanto, o êxito das terapias existentes hoje é limitado por razões como: concentrações de fármacos que chegam aos tumores são insuficientes, toxicidade sistêmica, falta de seletividade para células tumorais em relação às células normais e aparecimento de células tumorais resistentes aos fármacos (XU e McLEOD, 2001). Certo número de estratégias tem sido utilizadas para superar estes problemas. Uma nova geração de fármacos inibidores do crescimento do tumor foi introduzida com sucesso, que visa especificamente as vias de sinalização nas células tumorais. A esse grupo pertencem, por exemplo, Trastuzumab (um inibidor do receptor da via EGF), Imatinib (Glivec ®, Gleevec ®, um inibidor tirosina-quinase) e inibidores da farnesil transferase que interferem com a localização membranar de alguns oncogenes. Esses fármacos são, muitas vezes, eficientes e não tem os efeitos colaterais gerais da terapia sistêmica (BRACKE e cols., 2008).

1.4 Morte Celular por Apoptose e Necrose

Formas distintas de morte celular tem sido estudadas ao longo de muitos anos. No entanto, a última década testemunhou um acúmulo constante de descobertas sugerindo que apoptose, necrose e autofagia muitas vezes são reguladas por caminhos semelhantes, envolvendo locais comuns em organelas subcelulares e até mesmo partes do iniciador e moléculas efetoras. Dependendo do contexto celular e início do processo de morte, os dois modos principais de morte celular, muitas vezes atuam de forma complementar para facilitar a destruição celular (NIKOLETOPOULOU e cols., 2013).

Morfologicamente, as células necróticas são caracterizadas por inchaço das organelas, tais como o retículo endoplasmático e mitocôndrias, a ruptura da membrana plasmática e a lise da célula. O núcleo torna-se distendido e permanece praticamente intacto (figura 1). Morte necrótica é normalmente seguida por reações inflamatórias e não é associada à ativação de caspases (NIKOLETOPOULOU e cols., 2013).

A apoptose tem sido classificada como um grande mecanismo de morte regulada, empregada não só sobre os danos celulares ou estresse, mas também durante o desenvolvimento e morfogênese normais. A apoptose pode ser desencadeada tanto por estímulos através de receptores de morte extrínsecos localizados na superfície celular, como os receptores para fator de necrose tumoral- α (TNF α) e receptores Fas (CD95/APO1) ou por estímulos da via intrínseca, a via mitocondrial (Su e cols., 2013). Em ambos os casos, a ativação de caspases, resulta em permeabilização da membrana mitocondrial, condensação de cromatina e fragmentação do DNA conduzindo à destruição da célula (NIKOLETOPOULOU e cols., 2013).

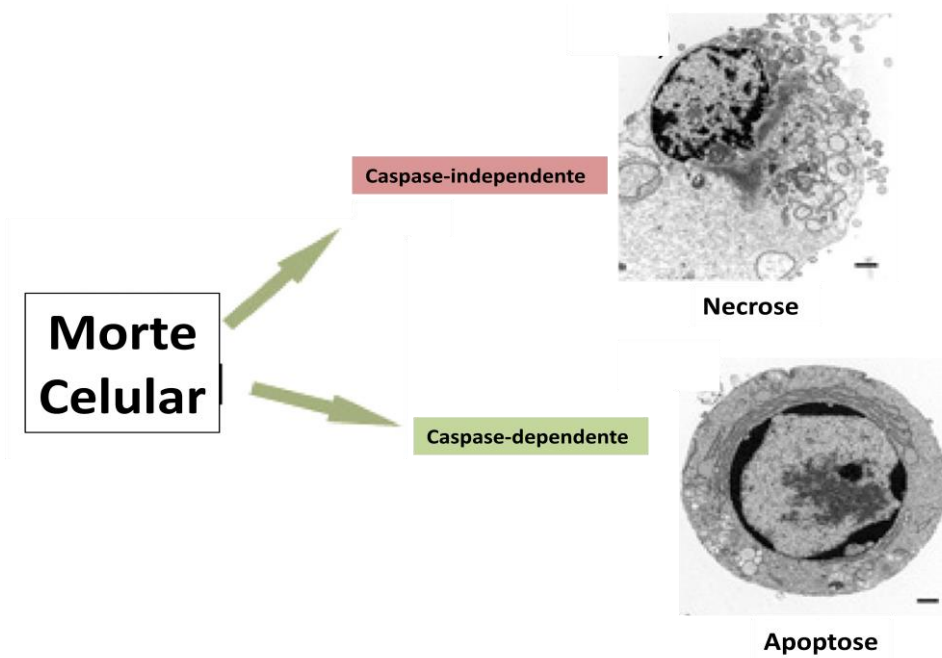


Figura 1 – Processos de Morte Celular – Necrose e Apoptose. (Adaptado de NIKOLETOPOULOU e cols., 2013).

O processo apoptótico envolve uma série de eventos. A primeira fase é a fase de envolvimento, em que a célula perde contato com suas células vizinhas e se apresenta com modificações do citoesqueleto, provocando uma diminuição no tamanho da célula e alterações na morfologia celular. Durante a segunda fase, a fase de execução, existe um aumento no Ca^{2+} intracelular, o que induz a ativação de certos grupos de enzimas, tais como proteases e endonucleases, como as caspases. Além disso, a cromatina condensa e é fragmentada, formando vesículas de diferentes tamanhos rodeadas por uma membrana plasmática. Estas vesículas, conhecidas como corpos apoptóticos, contêm partes das organelas e cromatina celular. A fase final é a fase de terminação, que envolve a fagocitose e a degradação dos corpos apoptóticos (FUENTES-GONZÁLEZ, e cols., 2013).

Fisiologicamente, a apoptose desempenha um papel regulatório no controle do tamanho de populações de células e tecidos. A perda deste equilíbrio pode levar ao surgimento de doenças degenerativas por promover apoptose em larga escala (por exemplo, o Alzheimer) ou de doenças proliferativas como o câncer, quando grupos de células tornam-se resistentes a apoptose (ZORNIG e cols., 2001).

1.5 Ativação do processo apoptótico - Vias de Ativação de Caspases

Diversos são os fatores que podem desencadear a apoptose, entre eles: ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos no DNA, choque térmico, privação de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes e níveis aumentados de espécies reativas do oxigênio. A ativação da apoptose pode ser iniciada de duas diferentes maneiras: pela via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial) como pode ser observado na figura 2 (ALMAGRO e VUCIC, 2012).

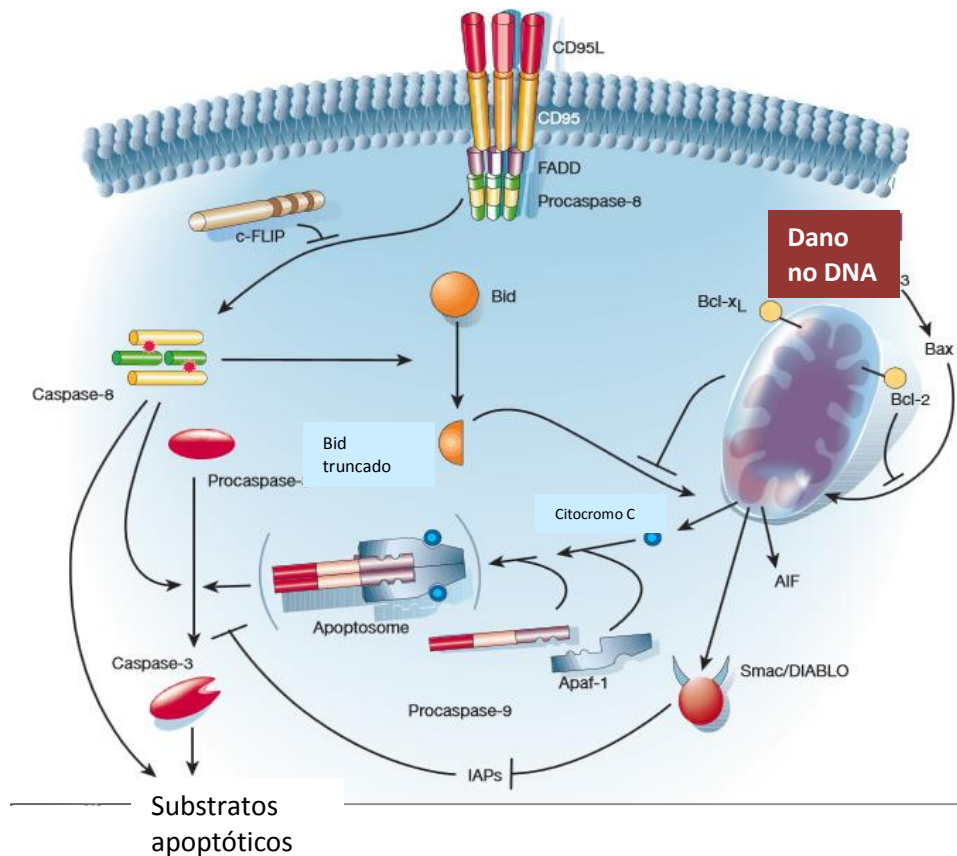


Figura 2 – Vias de ativação de caspases. Composta pelas vias extrínsecas e intrínsecas. (Adaptada de HENGARTNER, 2000).

1.5.1 Via extrínseca

A via extrínseca é regulada por receptores de morte da membrana tais como DR4/TRAIL-R1 e DR5/TRAIL-R2. Receptor do Fator de Necrose Tumoral 1 (TNFR1) e Fas (CD95), são ativados por seus ligantes TRAIL, TNF, e FasL, respectivamente (figura 3). Essa ligação favorece a trimerização e indução do recrutamento de FADD, através da interação com os seus domínios de morte (DDS). A interação de FADD com a pró-caspase 8 forma um complexo chamado DISC, o que favorece a sua oligomerização e auto-clivagem. A caspase 8 ativa inicia a cascata de caspases efetoras 3, 6 e 7 (FUENTES-GONZÁLEZ e cols., 2013).

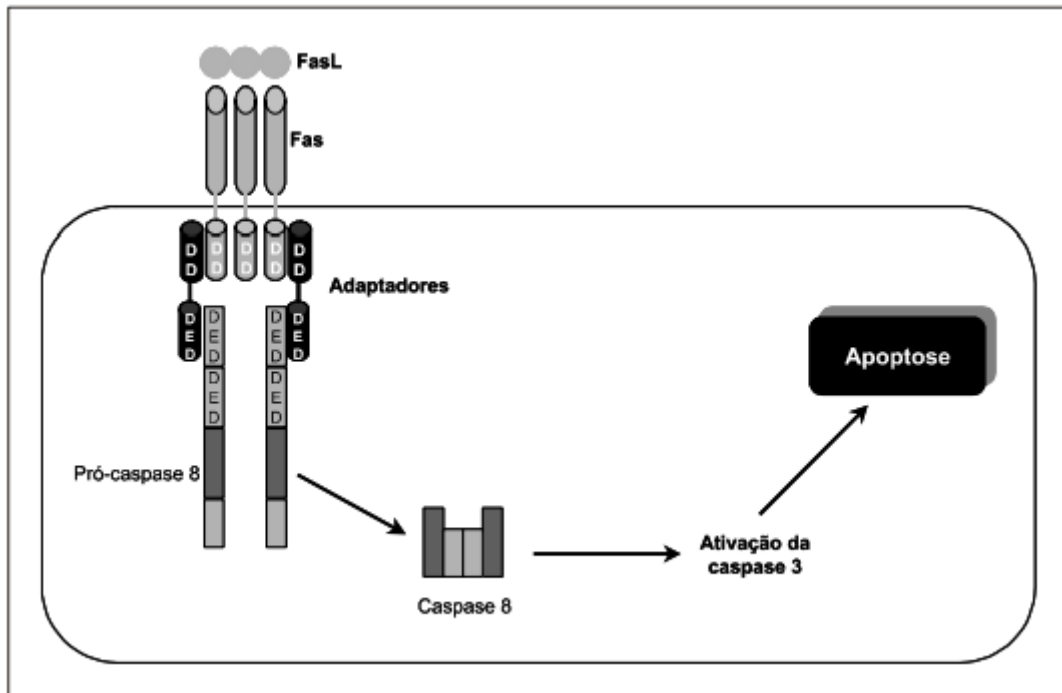


Figura 3 – Ativação da via Extrínseca pró-apoptótica. (BUDIARDJO e cols., 1999)

1.5.2 Via Intrínseca

A via intrínseca é ativada por estresse intracelular ou extracelular como a deprivação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes. Os sinais que são transduzidos em resposta a estes insultos convergem principalmente para a mitocôndria (HENGARTNER, 2000). Inúmeros estudos sobre apoptose apontam a mitocôndria como o principal mediador desse tipo de morte. Essa organela integra os estímulos de morte celular, induzindo a permeabilização mitocondrial e consequente liberação de moléculas pró-apoptóticas nela presentes (DESAGHER e MARTINOU, 2000).

A via intrínseca é regulada por proteínas mitocondriais, que, após a ativação, causam a liberação de citocromo c para o citoplasma. Quando no citosol, o citocromo c forma um complexo com o fator ativador de protease apoptótica (APAF-1) e a caspase-9, o chamado apoptossomo, que promove a clivagem da pró-caspase-9, liberando a

[Digite texto]

caspase-9, ativa (fig. 4). Uma vez ativada, a caspase-9 ativa a caspase-3 que vai ocasionar a apoptose (BUDIARDJO e cols., 1999).

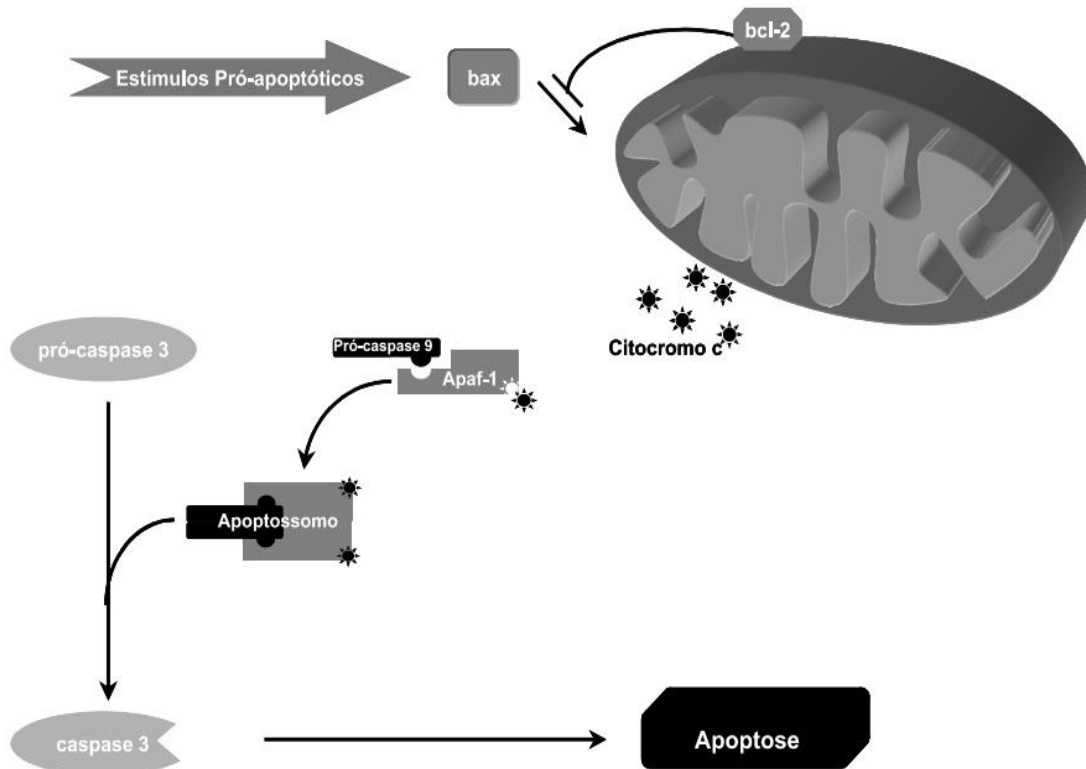


Figura 4 – Via Intrínseca de ativação de caspases. (GRIVICICH e cols., 2007)

1.6 Caspases

Assim como várias proteases, as caspases existem como pró-enzimas inativas, ou zimogênios, e devem sofrer uma clivagem para serem ativadas e iniciar a apoptose. Já foram caracterizadas mais de doze isoformas de caspases e aproximadamente dois terços destas enzimas apresentam função no processo de apoptose. Dois tipos de caspases atuam nas vias de sinalização para apoptose e são denominadas de iniciadoras (caspases 8, 9 e 10) e efetoras ou executoras (caspases 3, 6 e 7) (figura 5) (PORE e cols., 2013).

Para manter o programa de apoptose sob controle, as caspases são inicialmente expressas em células como precursoras inativas de pró-caspase. Quando as caspases iniciadoras, tais como caspase 8 e caspase 9, são ativadas por oligomerização, elas clivam as formas precursoras de caspases efetoras, tais como a caspase-3, caspase-6 e caspase-7. Uma vez ativadas, as caspases efetoras, então, clivam um conjunto específico de moléculas, resultando num conjunto de alterações morfológicas e bioquímicas que são associadas ao processo apoptótico (OKADA e MAK, 2004).

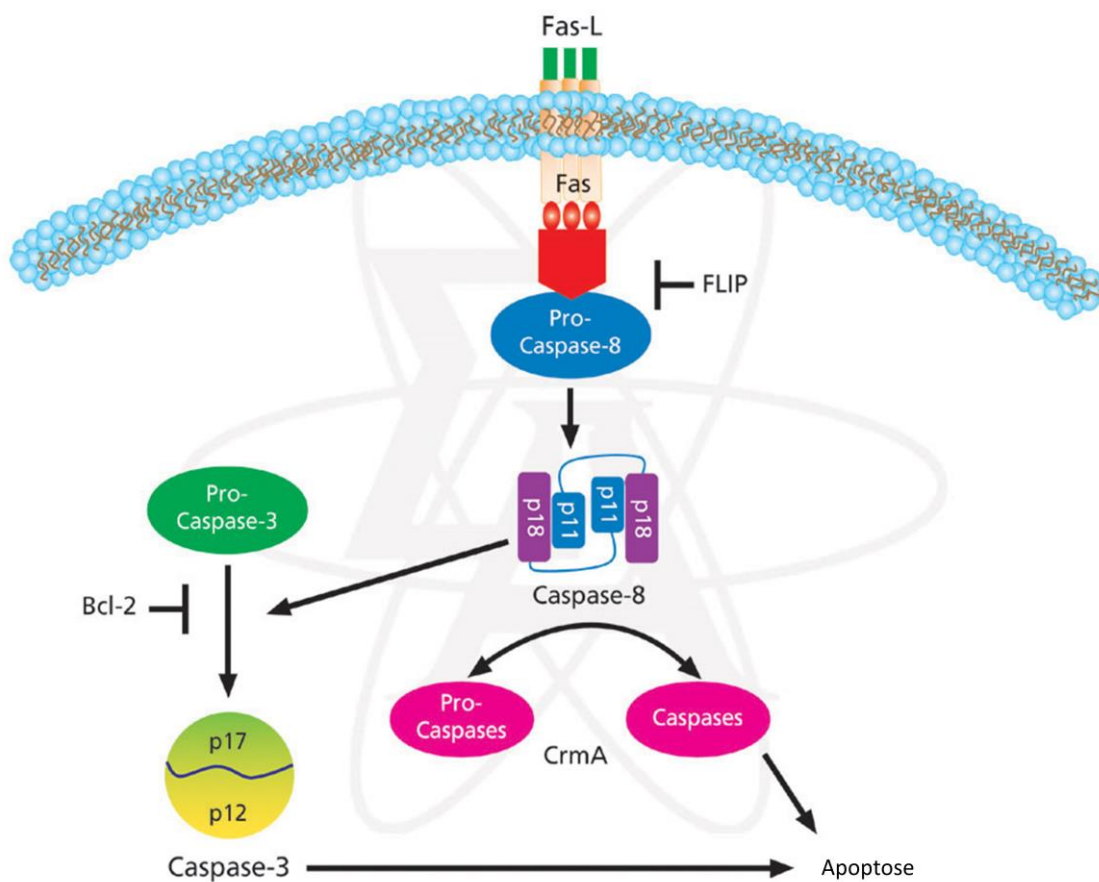


Figura 5 – Esquema do processo de ativação da apoptose pela via dos receptores de morte celular (Fas-FasL) (JUO e cols., 1999).

1.7 Controle do processo apoptótico

O equilíbrio entre a proliferação celular e a apoptose é necessário para evitar o desenvolvimento de patologias, como doenças neurodegenerativas e câncer. Nas células eucarióticas, este equilíbrio é mantido na sua maioria por uma família de proteínas conhecida como a proteína inibidora de apoptose (IAP). A família IAP é composta por 8 membros, no entanto, a proteína melhor estudada na família é a proteína inibidora de apoptose ligada ao X (XIAP), que pode inibir diretamente as caspases efetoras (caspases 3 e 7), bem como a caspase 9 (iniciadora). As células cancerígenas expressam níveis elevados de IAP, o que tem sido associado com quimiorresistência, progressão da doença e mau prognóstico (FUENTES-GONZÁLEZ, e cols., 2013).

Outra família importante é a família Bcl2. Todos estão envolvidos nos mecanismos de sobrevivência da célula após o estresse citotóxico. Os membros dessa família podem ser divididos em moléculas pró-apoptóticas (BAX, BAK, BCL-xS, BAD, BID, BIK, HRK, BIM e BOK) e anti-apoptóticas (BCL-2, BCL-xL, BCL-w, BFL-1, BRSAG-1, MCL-1, A1, E1B19K, LMW5-HL e EBV BHRF1). O equilíbrio relativo entre as diferentes proteínas, refletindo a formação de homodímeros e heterodímeros (neutralização), define a via de atuação sobre o mecanismo de morte celular programada (KIRKIN, 2004).

A família Bcl2 constitui uma das classes biológicas mais relevantes no controle da apoptose com alguns membros agindo como supressores e outros como ativadores (fig. 6). A Bcl-2 associada a proteína X (Bax), codificada pelo gene localizado na região cromossômica 19q13.3-q13.4, representa o protótipo das proteínas pró-apoptóticas. Na presença de um sinal apoptótico, a Bax é translocada do citoplasma para as proximidades das mitocôndrias, onde sofre ativação e modificação conformacional, aderindo à membrana mitocondrial externa. Pequenas unidades de proteínas Bax

ativadas tendem ao agrupamento, formando oligômeros que acabam por penetrar a membrana mitocondrial externa. Essa integração possibilita a rápida liberação do citocromo c (FARIA e cols., 2006).

Por outro lado, a B-cell lymphoma protein 2 (Bcl-2), codificada pelo gene localizado no cromossomo 18q21, favorece a sobrevivência celular. Ela impede o escape do citocromo c, possivelmente pela formação de heterodímeros com moléculas pró-apoptóticas como a proteína BAX (FARIA e cols., 2006).

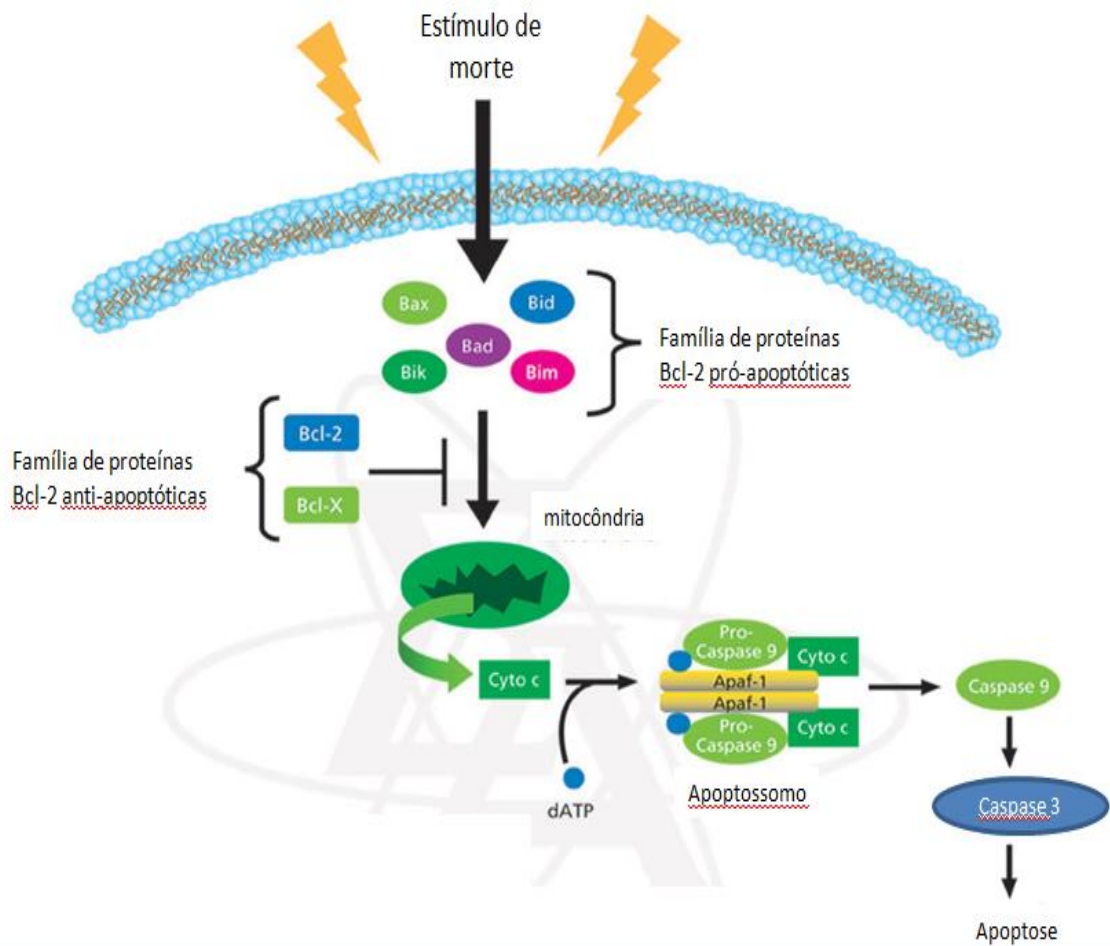


Figura 6 – Envolvimento da família Bcl2 no processo apoptótico (KELEKAR e THOMPSON, 1998)

1.8 Isatinas

A isatina (1H-indol-2,3-diona) é um composto indólico, endógeno, presente nos tecidos e fluidos de mamíferos (fig. 7). Possui uma ampla gama de atividades biológicas, tais como sedativas (PANDEYA e cols., 2005), anticonvulsivantes (CANE e cols., 2000) e potente antagonista dos receptores de peptídeos natriuréticos atriais *in vitro* (MATESIC e cols., 2008). Sua distribuição é heterogênea, sendo encontrada em vários tecidos com diferentes concentrações. No cérebro, uma maior concentração está presente no hipocampo e cerebelo (MEDVEDEV e cols., 2008). Os derivados de isatina têm sido relatados como citotóxicos contra as linhagens celulares de carcinoma humano derivadas de mama, de próstata, de leucemia linfoblástica aguda, cólon e pulmão (PREMANATHAN e cols., 2012).

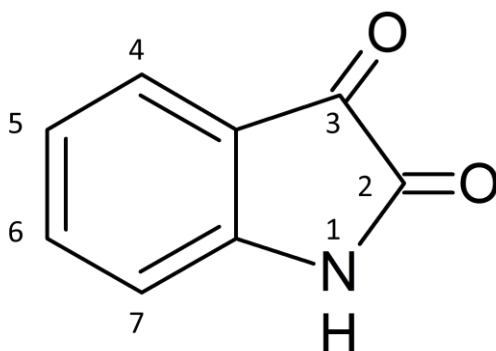


Figura 7 – Estrutura química da isatina.

A isatina foi isolada em 1940 a partir da urina de coelhos e, em 1988, foi identificada na urina de humanos e no cérebro de ratos (GLOVER e cols., 1988; MEDVEDEV e cols., 1996). Embora a via endógena de formação da isatina não esteja completamente elucidada, há evidências de que sua formação se dá a partir do aminoácido triptofano, que é convertido em indol pelas bactérias do trato

[Digite texto]

gastrointestinal e, posteriormente, oxidado no fígado pelas enzimas do citocromo P450 (GUILLAN e cols., 2000).

Inicialmente, a isatina foi descrita como um componente da tribulina, um inibidor endógeno da monoamino oxidase (MAO) e subsequentemente identificada como um inibidor seletivo da MAO-B (GLOVER e cols., 1988).

Isatina, 1H-indol-2,3-diona 1 (figura 7), é um versátil bloco de construção química, capaz de formar um grande número de moléculas heterocíclicas. O composto possui uma estrutura de anel de indólico (figura 8), comum a muitos produtos farmacêuticos sendo capaz de participar de uma ampla gama de reações de síntese, levando à sua ampla utilização como uma molécula precursora na química medicinal (PAKRAVAN e cols., 2013).

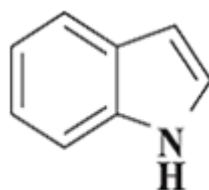


Figura 8- Estrutura química do anel indólico.

Erdman e Laurent, 1841, obtiveram a isatina pela primeira vez como um produto da oxidação do índigo pelos ácidos nítrico e crômico. Posteriormente, foi encontrada na natureza em plantas do gênero *Isatis* (GUO e CHEN, 1986), nas espécies *Calanthe discolor* Lindl (figura 9A) (YOCHIKAWA e cols., 1998) e *Couroupita guianensis* Aubl (figura 9B) (BERGMAN e cols., 1985).



Figura 9 – *Calanthe discolor* Lindl (A) e *Couroupita guianensis* Aubl (B).

1.8.1 Ações da Isatina

No sistema nervoso central (SNC), foi demonstrado que a isatina melhora a bradicinesia e os níveis de dopamina na região estriatal, em modelos de ratos com doença de Parkinson (MEDVEDEV e cols., 2005). Igosheva e cols. (2005) avaliaram os efeitos da isatina no crescimento e sobrevivência de células neurais, usando um modelo de neurônios dopaminérgicos.

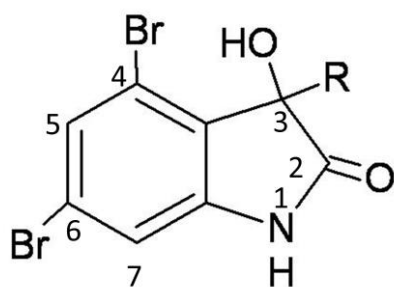
Dentre suas ações, descritas em experimentos *in vitro*, pode-se destacar sua ação como antagonista da função do peptídeo natriurético atrial e da sinalização do óxido nítrico (NO) (MEDVEDEV e cols., 2005). Foi mostrado que a isatina, em concentrações fisiológicas (10^{-8} a 10^{-6} M), diminui o estímulo da guanilato ciclase solúvel pelo óxido nítrico (NO), em plaquetas humanas (MEDVEDEV e cols., 2002). Mais recentemente, Hou e cols. (2008) mostraram que a isatina era capaz de promover apoptose em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, além de interferir no processo de angiogênese devido à inibição do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF).

1.8.2. Ações dos derivados da isatina

A isatina é uma molécula heterocíclica com considerável versatilidade sintética (SHEVKHGEIMER, 1996; SILVA e cols., 2001) e várias ações farmacológicas comprovadas (SILVA e cols., 2001). Alguns análogos sintéticos foram identificados como inibidores da MAO, como a 5-hidroxiisatina, que é seletiva para MAO-A (MEDVEDEV e cols., 1992). Vários outros derivados já foram estudados e também apresentaram efeitos farmacológicos tais como analgésico, antipirético e anti-inflamatório (SRIDHAR e RAMESH, 2001), inibidor da produção de NO, prostaglandina E₂ (PGE₂) e fator de necrose tumoral (TNF), devidos em parte à inibição na expressão das enzimas ciclo oxigenase-2 (COX-2) e óxido nítrico sintase induzida (NOSi) (MATHEUS e cols., 2007), e amplamente descritos como agentes citotóxicos (VINE e cols., 2006; MATESIC e cols., 2008), pró-apoptóticos (CANE e cols., 2000; KOPKA e cols., 2006) e antitumorais (SATHISHA e cols., 2008).

1.9 Convolutamidina

As convolutamidinas A até E (figura 9) são membros da família de alcaloides oxindólicos que tem em comum o esqueleto 4,6-dibromo-3-hidroxioxindol. Estas substâncias, derivadas da isatina, foram isoladas do briozoário *Amathia convoluta* (figura 10), um organismo marinho coletado no Golfo do México, na Flórida. As convolutamidinas A e B apresentaram atividade inibitória na diferenciação de células de leucemia pró-mielocítica humanas HL-60 (KAMANO e cols., 1995). As convolutamidinas C, D e E não foram avaliadas por ensaios farmacológicos em virtude da pouca quantidade isolada (ZHANG e cols., 1995).



Convolutamidina	Substituinte (R)
A	CH ₂ COCH ₃
B	CH ₂ CH ₂ Cl
C	CH ₃
D	CH=CH ₂
E	CH ₂ CH ₂ OH

Figura 10 – Estrutura química das Convolutamidinas A, B, C, D e E.



Figura 11- Fotografia do briozoário marinho *Amathia convoluta* (Adaptado de KAMANO e cols., 1995).

As promissoras atividades farmacológicas estimularam a síntese da convolutamidina A pelo grupo do professor Ângelo da Cunha Pinto e professora Bárbara Vasconcellos da Silva, do Instituto de Química da UFRJ. O grupo foi o primeiro a propor uma rota sintética para a obtenção da convolutamidina A na forma racêmica (GARDEN e cols., 1997).

[Digite texto]

A literatura tem mostrado que derivados da convolutamidina A apresentam efeitos farmacológicos tais como secreção do hormônio de crescimento (TOKUNAGA e cols., 2001), neuroproteção por ativação dos canais de potássio ativados por cálcio (HEWAWASAM e cols., 2002), e anticonvulsivante (POPP, 1985), anticolinesterásica, anti-hipertensivas, anti-hipóxica, antimicrobiana, antineoplásica, antiulcerativa, antiviral e anti-inflamatória (DA SILVA e cols., 2001; MATHEUS e cols., 2007; ZAPATA-SUDO e cols., 2007; VINE e cols., 2008; HALL e cols., 2009; PEDDIBHOTLA, 2009; BHRIGU e cols., 2010; SILVA e cols., 2010). Recentemente foi publicado um trabalho do nosso grupo, Laboratório de Farmacologia da Inflamação e na dor da UFRJ, mostrando a ação antinociceptiva da convolutamidina A e dois derivados, em modelos *in vivo* (FIGUEIREDO e cols., 2012).

Devido a grande variedade de análogos sintetizados pela profa. Bárbara Silva e seus colaboradores, bem como o potencial farmacológico desta série química, vários outros estudos são necessários.

1.10 Relevância do estudo

Visto que o processo de tumorigênese, bem como o desenvolvimento do câncer, estão relacionados com a desregulação do processo apoptótico, é de suma importância a procura de novos fármacos com atividade antitumoral relacionada à ativação e regulação do processo de morte celular por apoptose.

2. OBJETIVOS

[Digite texto]

2.1 Objetivos Gerais

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar uma possível ação citotóxica e antitumoral do análogo da Isatina (ISA017) e do derivado da Convolutamidina A (ISA161) em modelos *in vitro*.

2.2 Objetivos Específicos

- 1) Investigar uma possível ação citotóxica do análogo da Isatina (ISA017) e do análogo da Convolutamidina A (ISA161) sobre a linhagem de tumor de mama humano, MCF7, através de ensaios para viabilidade celular (MTT);
- 2) Investigar a possível ocorrência de processo apoptótico após o tratamento das células MCF7 por análise morfológica.
- 3) Avaliar quantitativamente a apoptose e necrose celular, utilizando o ensaio de Annexina V- APC, por citometria de fluxo.
- 4) Avaliar quantitativamente sinais intracelulares de ativação da apoptose, verificando os níveis da caspase efetora de apoptose Caspase 3, utilizando o método RT-PCR.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

[Digite texto]

3.1 Reagentes

Foram utilizados DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose), soro fetal bovino, solução tripsina-EDTA (1X), dimetilsulfóxido (DMSO), MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol), Tamoxifeno, Paclitaxel, todos adquiridos da Sigma-Aldrich (*St. Louis*, Estados Unidos). Surfactante BD FACSFlow, partículas de calibração Rainbow 8 peaks, solução de iodeto de propídeo, Annexina V APC, adquiridos da BD Biosciences (Oxford, Reino Unido). RNaseZap Wipes, água nuclease free adquiridos na Invitrogen (Carlsbad, Estados Unidos). Kit para RT-PCR DNA-free™ RNA Isolation, RNAqueous®-4PCR, adquiridos na Ambion (Carlsbad, Estados Unidos). TaqMan® Gene Expression Assays (primers para genes 18s e caspase 3), kit para transcriptase reversa alta capacidade cDNA, TaqMan Universal PCR Master Mix no AmpErase® UNG, adquiridos da Applied Biosystems (Nova Jersey, Estados Unidos). As células da linhagem MCF7(ATCC® HTB-22™) foram adquiridas da ATCC (American Type Culture Collection, Estados Unidos).

3.2 Derivado da Isatina – ISA017

O derivado da Isatina foi sintetizado pelo grupo do Prof. Dr. Ângelo da Cunha Pinto e da Profa. Dra. Bárbara Vasconcellos da Silva, do Laboratório de Produtos Naturais e Transformações Químicas do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

O análogo *N*-metil-isatina (ISA017) foi obtido pela metilação no átomo de nitrogênio do anel indólico (figura 12).

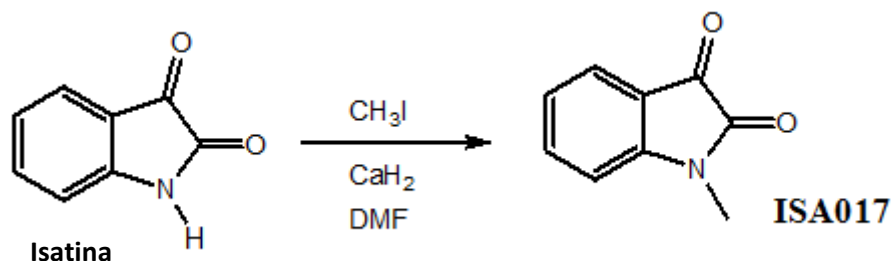


Figura 12 – Síntese da ISA017 a partir da molécula da Isatina

3.3 Derivado da Convolutamidina A – ISA161

A Convolutamidina A é membro da família de alcaloides oxindólicos e apresenta esqueleto 4,6-dibromo-3-hidroxioxindol. O seu derivado, ISA161, foi sintetizado pela Profa. Dra. Bárbara Vasconcelos da Silva e pelo Prof. Dr. Ângelo da Cunha Pinto do Laboratório de Produtos Naturais e Transformações Químicas, do Instituto de Química da UFRJ. A estratégia sintética para preparação da convolutamidina A (figura 13) em sua forma racêmica envolveu etapas de bromação da p-nitro-anilina, formação do sal de arenodiazônio (diazotação) com substituição do nitrogênio por hidrogênio e, em seguida, a redução catalítica e hidrólise (2, figura 13). Em seguida utilizando a reação de Sandemeyer modificada por Marvel e Hiers (1941) foi preparada a α -isonitroacetanilamida 3,5-dibromada (3, figura 13). Essa foi ciclizada com H₂SO₄ concentrado resultando na formação de 4,6-dibromo-isatina (4, figura 13) que após ser solubilizada em acetona e em seguida em gotas de dietilamina, resultou na síntese da convolutamidina A (5, figura 13) (SANDMEYER, 1919; MARVEL e HIERS, 1941; SILVA e cols., 2008).

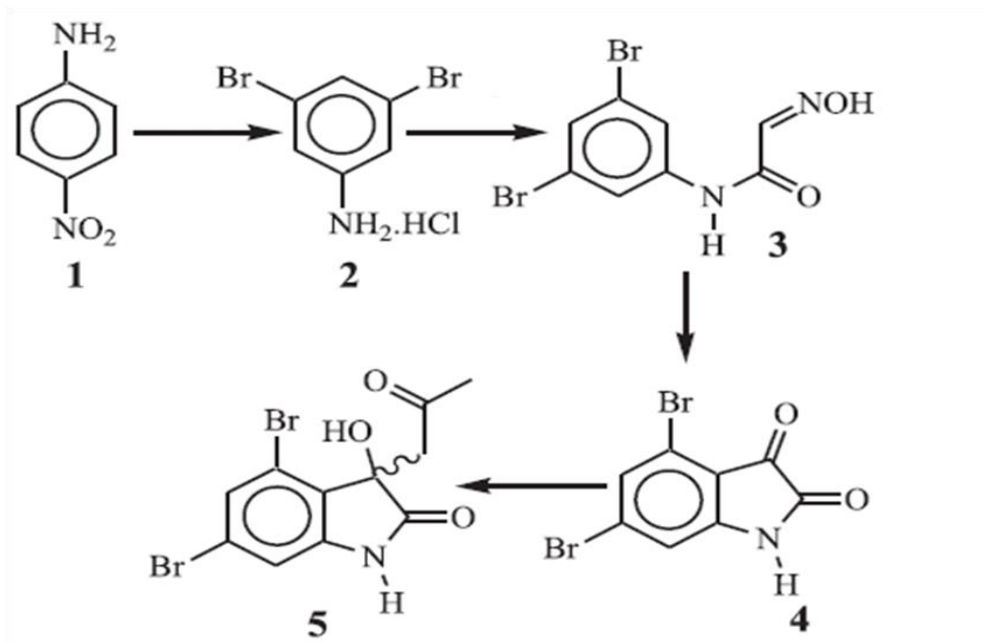


Figura 13- Rota sintética utilizada para a preparação da Convolutamidina A.

O análogo da Convolutamidina A, o 5-cloro-3-(2-oxopropil)-3-hidroxi-2-oxindol (ISA161) (figura 14), possui um átomo de cloro na posição 5 do anel aromático da convolutamidina e não possui os 2 bromos em C4 e C6.

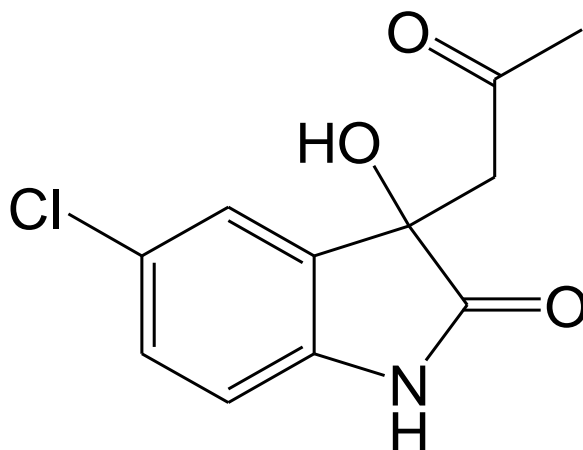


Figura 14: Estrutura Química da ISA161

3.4 Preparo das soluções de uso das substâncias testadas

As substâncias (ISA017, ISA161, Tamoxifeno e Paclitaxel) foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) de modo a preparar soluções estoque de 50 mg/mL que foram armazenadas à -20°C. Em todos os experimentos a concentração de DMSO não excedeu a 0,5% de modo a não produzir qualquer efeito *per si*. Da solução inicial em DMSO, todas as substâncias foram então diluídas em meio de cultura DMEM, sem o acréscimo de soro fetal bovino. As concentrações utilizadas variaram de 1 nM a 100 µM. Os fármacos utilizados como controle positivo foram Paclitaxel, com concentrações variáveis de 10 nM a 1 µM, e Tamoxifeno (10 µM). O controle negativo foi composto pelo veículo (DMSO).

3.5 Cultura de células

As células da linhagem MCF7 (ATCC® HTB-22™) são células epiteliais mamárias humanas derivadas de tumor metastático de efusão pleural. Foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas em garrafas plásticas em uma atmosfera contendo 5% de CO₂ a 37°C. O meio foi trocado a cada 2-3 dias quando as culturas atingiam a confluência e crescimento exponencial. As células, então, eram coletadas após incubação com solução Tripsina-EDTA por 2 minutos, à 37°C. Todo o conteúdo coletado era centrifugado (1.500 rpm, 5 min), ressuspensão em DMEM e plaqueado, na concentração de $2,5 \times 10^4$ células/mL em placas de 96, 24 ou 6 poços.

3.6 Proliferação Celular

As células ($2,5 \times 10^4$ células/mL) plaqueadas, em placas de 24 poços, foram incubadas por 24 horas em estufa à 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, foram adicionadas

[Digite texto]

ISA017 e ISA161, nas concentrações de 1000, 500, 100, 50, 10 e 1nM. Após serem incubadas por 24 e 48 horas, as células foram coletadas, centrifugadas, ressuspensas em meio de cultura, retirados 10 µL e diluídos em 10 mL de solução tampão fosfato (PBS) e as células viáveis foram contadas em contador de células Z1 Coulter (Particle Counter, Beckman Coulter).

3.7 Ensaio de viabilidade celular (MTT)

A redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol) para MTT-formazan, que ocorre na mitocôndria foi usada como um indicador da viabilidade das células.

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços ($2,5 \times 10^4$ células/mL) e cultivadas por 24 horas em estufa a 37°C e 5% CO₂. Prosseguindo, as células foram tratadas com as substâncias teste (ISA017 e ISA161) nas concentrações de 1, 10, 50, 100, 500, 1000 nM e incubadas por 24 ou 48 horas, à 37°C e 5% de CO₂. Após o tempo de incubação, adicionou-se 100 µL de DMEM com 0,5 mg/mL de MTT (5 mg/mL). As células foram incubadas por 4 horas, nas mesmas condições anteriores. Finalmente, o meio de cultura de todos os poços foi aspirado e às células adicionou-se 100 µL de DMSO para que os cristais de MTT-formazan formados fossem dissolvidos. A absorbância foi medida em leitor de microplaca a 570 nm. Os grupos controle foram compostos por células somente com DMEM e células com DMEM e 2% de DMSO. O grupo controle composto por células e DMEM somente foi considerado como 100% das células viáveis.

3.8 Ensaios de Apoptose

3.8.1 Avaliação da morfologia celular

As células MCF7 ($2,5 \times 10^4$ células/mL), foram plaqueadas em placas de 24 poços e incubadas por 24 horas em estufa à 37°C e 5% CO₂. Em seguida, foram adicionadas as substâncias, ISA017 e ISA161, nas concentrações de 1000 e 10 nM, Paclitaxel nas concentrações de 50 e 10 nM e as células foram incubadas por 24 e 48 horas nas mesmas condições anteriores. Ao fim das incubações, as células foram observadas e fotografadas em microscópio Zeiss Cell Observer SD e câmera AxioCam Zeiss.

3.8.2 Citometria de Fluxo – APC Annexin V

Para a realização deste ensaio é necessário o preparo de um tampão (BB buffer) que foi preparado a partir de uma solução primária concentrada contendo 0,1 M de HEPES, 1,4 M de NaCl e 25 mM de CaCl₂ em água ultrapura e pH 7.4. Desta solução concentrada, foi feita a diluição em 10 vezes, com água ultrapura, para o tampão de uso.

As células ($2,5 \times 10^5$ células/mL) foram cultivadas em placas de 6 poços por 24 horas e tratadas com concentrações de 100 µM de ISA017 e ISA161, Paclitaxel 1 µM e Tamoxifeno 10 µM e incubadas por 48 horas em estufa à 37°C e 5% CO₂. Após o período de incubação, as células foram lavadas e coletadas em PBS. Foram colocadas em tubos e centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm. Descartou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuspensão em 100 µL de tampão (BB buffer).

Adicionou-se 5 µL de Annexin APC e 5 µL de Iodeto de Propídeo em 20 µL do tampão com células. Completou-se o volume para 100 µL com 70 µL de tampão. A solução foi então incubada por 15 minutos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após esse período, acrescentou-se 400 µL de tampão à solução e 300 µL foi colocado

nos poços da placa de 96 poços seguindo o protocolo do ensaio. O equipamento utilizado para a realização do ensaio foi BD FACSArray e a intensidade da fluorescência foi avaliada pelo software BD FACSArray System. Como controle negativo foram usadas células não tratadas.

3.8.3 RT-PCR para avaliar a ativação de genes da Caspase 3

As células ($2,5 \times 10^5$ células/mL) foram cultivadas em placas de 6 poços por 24 horas e tratadas com concentrações de 100 μ M, 1000 nM, 100 nM e 10 nM de ISA017 e ISA161. O controle negativo foi avaliado pelas células sem tratamento. As células foram incubadas por 48 horas em estufa à 37°C e 5% CO₂. Após o período de incubação, o meio foi retirado e as células foram coletadas com solução de lise (400 μ L/poço), fornecido pelo kit de ensaio. Todo o protocolo de ensaio foi seguindo as especificações do fabricante do kit RNAqueous®-4PCR da Ambion, Life Sciences.

3.8.3.1 Isolamento do RNA

Após a obtenção do lisado, a solução foi colocada em eppendorfs e adicionou-se 400 μ L de solução água/álcool 64% e filtrou-se então a solução em filtros de eppendorfs centrifugando a 10000 rpm por 30 segundos. O líquido filtrado foi descartado.

Foi adicionada solução de lavagem número 1 (700 μ L) e filtrado por centrifugação. Descartou-se o líquido filtrado. Em seguida, adicionou-se 500 μ L de solução de lavagem número 2 e filtrou-se por centrifugação. Esse processo foi realizado por 2 vezes, descartando-se o líquido filtrado.

Os filtros então foram transferidos para um eppendorf novo e adicionou-se solução de eluição (40 μ L) a 80°C e filtrou-se por centrifugação. Essa etapa foi

realizada 2 vezes e o líquido filtrado não foi descartado pois o RNA isolado foi coletado na solução.

Foi feita a quantificação do RNA usando o software Nanodrop.

3.8.3.2 Síntese de cDNA

Num tubo eppendorf foi colocada uma mistura de reagentes, já descrita pelo fabricante do kit utilizado, constituída por:

14 μ L de “10X RT buffer”;

5,6 μ L de “25X dNTP mix”;

14 μ L de “10X RP”;

7 μ L de “reverse transcriptase”;

29,4 μ L de água livre de nuclease

Desse preparado foi pipetado 10 μ L e transferido para micro eppendorfs de acordo com o número de amostras. Adicionou-se aos eppendorfs 10 μ L de RNA das amostras obtidos anteriormente.

Em seguida as amostras foram colocadas no termociclador (Mastercycler Realplex² Eppendorf) com o seguinte protocolo de ciclização:

Tempo de incubação	Temperatura °C
10 minutos	25
120 minutos	37
5 minutos	85
5 minutos	4

Tabela1 – Protocolo de ciclização para a síntese de cDNA.

3.8.3.3 Replicação do DNA

Nesta etapa foi usado o primer para 18s como controle, 18S-primer (5'-GAGCTGGAATTACCGCGGCT-3'), e primer para Caspase 3 (5'-GAGCTGCCTGTAAGTTG-3') TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems).

Foi preparado um mix para cada poço:

- Água sem nuclease – 7,5 µL
- TaqMan – 10 µL
- Primer 18s/caspase 3 - 1 µL

Desse mix preparado foram adicionados 18,5 µL em cada poço de uma placa de 96 poços para PCR acrescido de 1,5 µL de amostra. A placa foi coberta com plástico adesivo e centrifugada para retirar as bolhas. A placa então foi colocada no aparelho ciclizador Mastercycler Realplex² (Eppendorf) e o protocolo de replicação foi então inserido no software Realplex:

Ciclos	Tempo	Temperatura °C
1	10 minutos	95
40	15 segundos	95
40	1 minuto	60

Tabela 2 – Protocolo de replicação do DNA.

Os resultados então obtidos foram calculados como:

Caspase 3 – 18s: Quantidade de DNA para Caspase 3 ativado

3.9 Análise Estatística

Todos os ensaios, com todas as concentrações das substâncias utilizadas, foram realizados em triplicata, com $n=3$ por ensaio. A significância estatística entre os grupos foi calculada pelo teste de análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Bonferroni. Valores de p menores de 0,05 foram usados como indicador de significância. A plotagem dos gráficos e análise estatística foram realizadas usando o software GraphPad Prism 5.

4. RESULTADOS

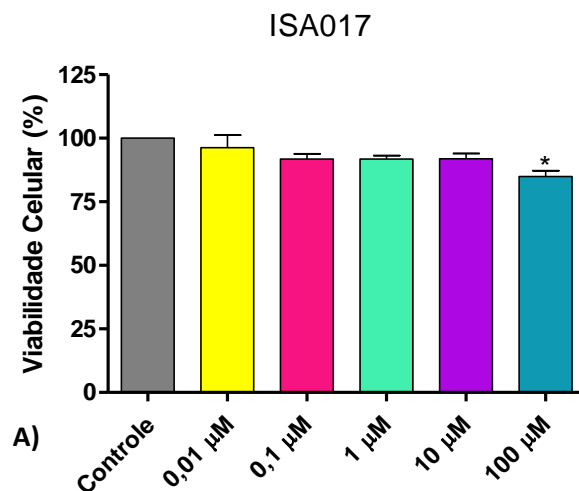
[Digite texto]

4.1 O análogo da Isatina, *N*-metil-isatina (ISA017), e o análogo da Convolutamidina A, 5-cloro-3-(2-oxopropil)-3-hidroxi-2-oxindol (ISA161), inibem a viabilidade celular da linhagem MCF7

4.1.1 Ensaio de Viabilidade Celular - MTT

Foi realizado o ensaio de viabilidade celular pela técnica de MTT com os análogos ISA017 e ISA161 na linhagem celular de carcinoma de mama (MCF7). Embora se tenha utilizado cinco diferentes concentrações (0,01, 0,1, 1, 10 e 100 μM).

Após 24 horas de tratamento, foi observado um valor significativo de redução da viabilidade celular média de $20 \pm 1,2$ % na concentração de 100 μM com a ISA017 (Gráfico 1A) e de 20 a $32 \pm 1,9$ % nas concentrações de 10 e 100 μM com a ISA161 (Gráfico 1B). As outras concentrações testadas não apresentaram resultados significativos.



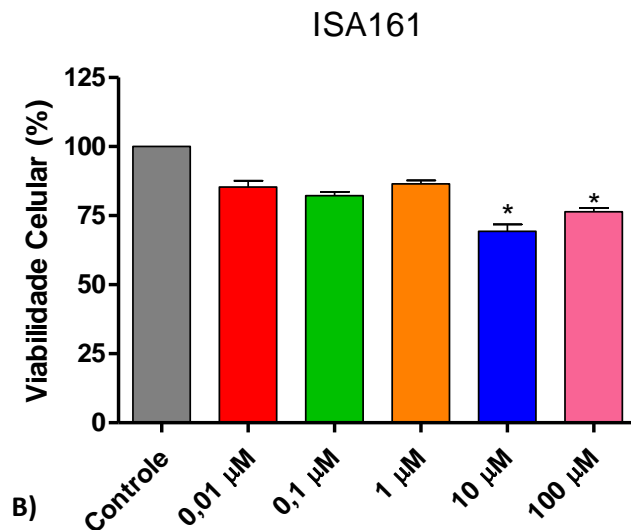


Gráfico 1 – Efeito dos análogos da Isatina (ISA017)(A) e da Convolutamidina A (ISA161)(B) na viabilidade celular da linhagem MCF7 tratadas por 24 horas com as concentrações mostradas nos gráficos. A viabilidade foi determinada por MTT. Os resultados expressam a média \pm DP de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$, em comparação ao controle.

Após tratar as células MCF7 com a ISA017 e a ISA161 e incubá-las por 48h, a viabilidade celular foi reduzida significativamente em todas as concentrações com valor médio de 30 a $45 \pm 2,1\%$ com a ISA017 (Gráfico 2A) e com a ISA161 a viabilidade celular foi reduzida significativamente em todas as concentrações, com valor médio de 30 a $50 \pm 2,9\%$, como mostrado no gráfico 2B.

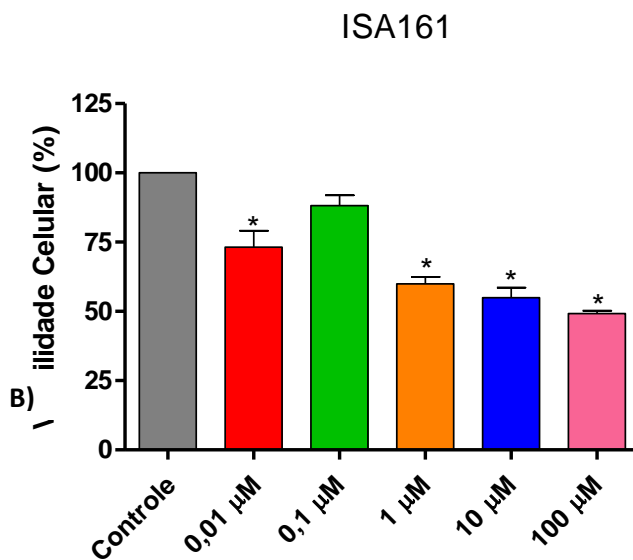
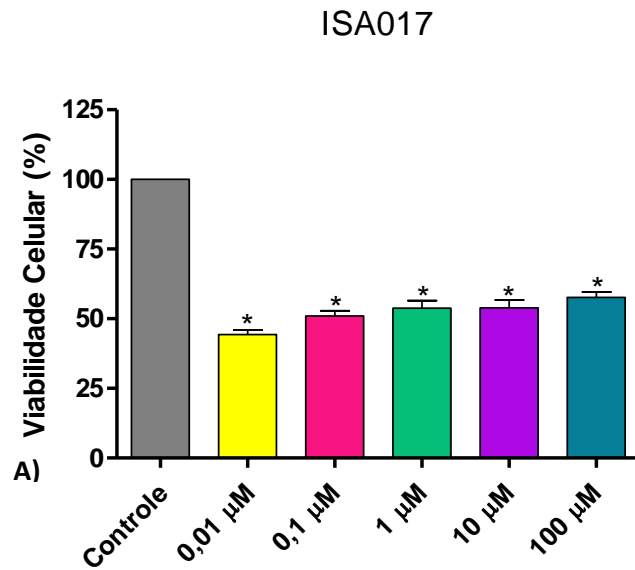


Gráfico 2 – Efeito dos análogos da Isatina (ISA017)(A) e da Convolutamidina A (B) na viabilidade celular da linhagem MCF7 tratadas por 48 horas com as concentrações mostradas nos gráficos. A viabilidade foi determinada por MTT. Os resultados expressam a média \pm DP de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$, em comparação ao controle.

Para melhor visualização da redução da viabilidade celular dos análogos ISA017 e ISA161, o gráfico 3 (A e B) correlaciona os tempos de incubação de 24 e 48 horas das células MCF7 tratadas com as diferentes concentrações das substâncias.

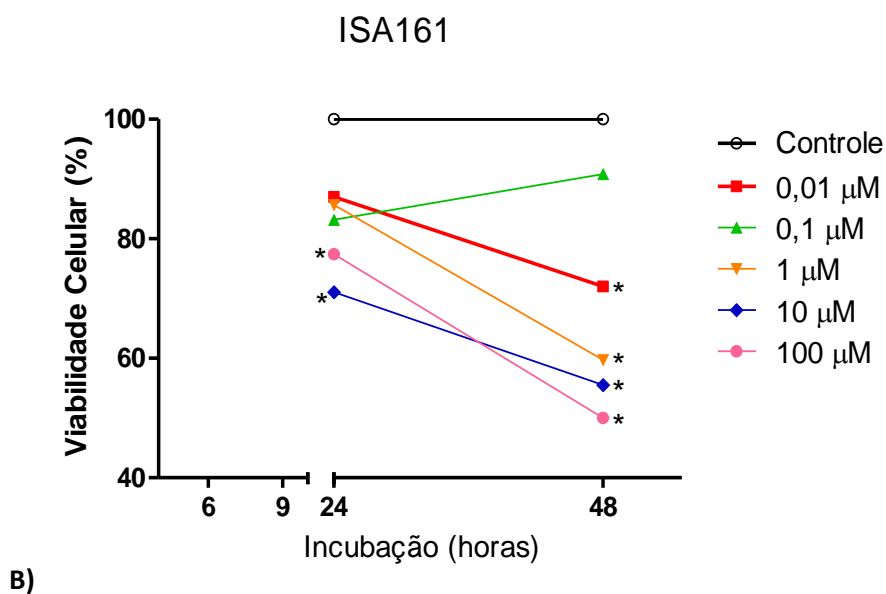
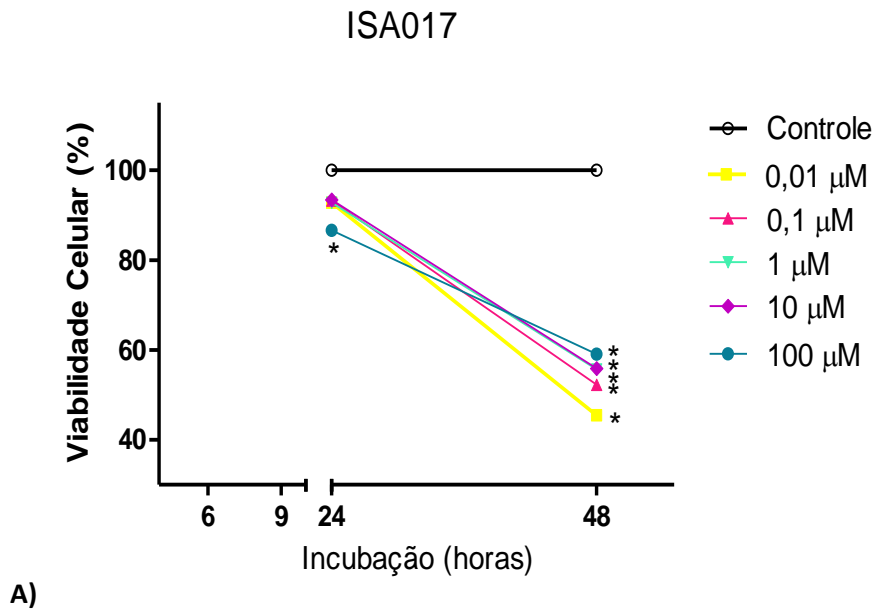


Gráfico 3 - Efeito do análogo da Isatina (ISA017)(A) e da Convolutamidina A (B) na viabilidade celular da linhagem MCF7 tratadas por 24 e 48 horas com as concentrações mostradas nos gráficos. A viabilidade foi determinada por MTT. Os resultados

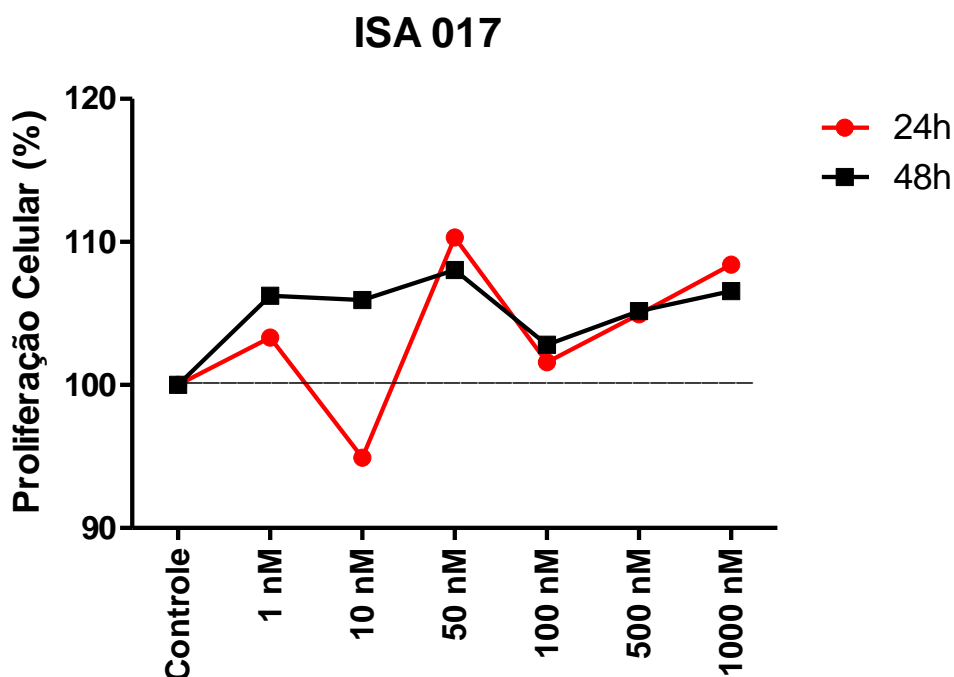
[Digite texto]

expressam a média \pm DP de três experimentos independentes realizados em triplicata.

* $p < 0,05$, em comparação ao controle.

4.1.2 Ensaio da Proliferação Celular

Para confirmar os resultados obtidos nos ensaio de viabilidade celular, realizamos o ensaio de proliferação celular com as células da linhagem MCF7 tratadas com os análogos ISA017 e ISA161. Como as concentrações menores utilizadas no ensaio de viabilidade celular apresentaram resultados significativos de redução dessa viabilidade, decidimos usar concentrações menores dos análogos para o teste de proliferação celular. Assim, utilizamos concentrações que variam de 1 nM a 1000nM. As células foram incubadas com as substâncias por 24 e 48 horas e assim observamos que nenhuma das concentrações utilizadas apresentou resultados significativos de redução na proliferação das células em nenhum dos tempos de incubação avaliados (Gráfico 4A e B).



A)

[Digite texto]

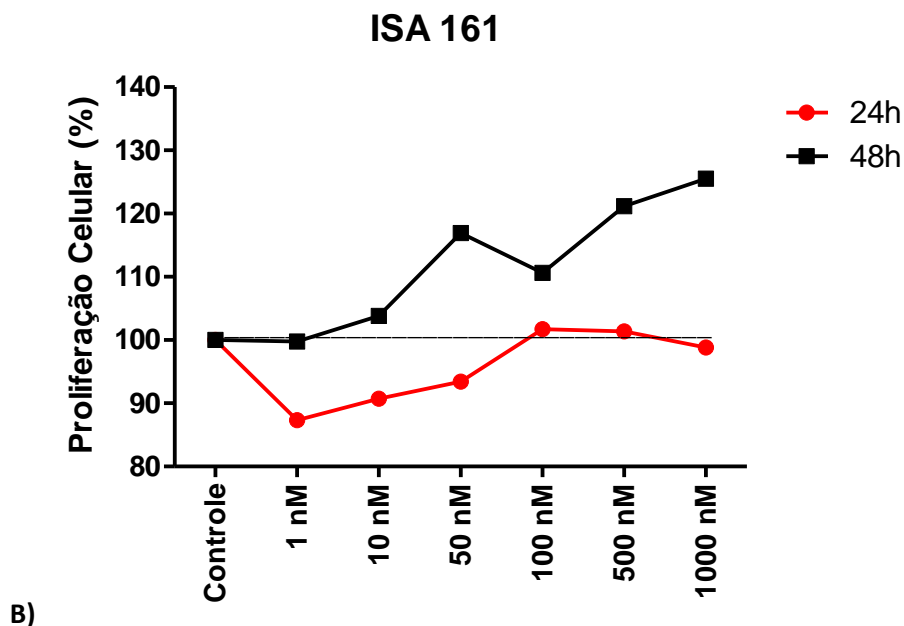


Gráfico 4 - Efeito do análogo da Isatina (ISA017)(A) e da Convolutamidina A (B) na proliferação celular da linhagem MCF7 tratadas por 24 e 48 horas com as concentrações mostradas nos gráficos. A análise da proliferação foi determinada por contagem das células antes e após a incubação com as substâncias teste. Os resultados expressam a média de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$, em comparação ao controle.

4.2 O análogo da Isatina (ISA017) e o análogo da Convolutamidina A (ISA161) induzem morte celular por apoptose em células da linhagem MCF7

4.2.1 Corpos Apoptóticos encontrados por Análise Morfológica

Durante o processo de avaliação da viabilidade celular, observações feitas por microscopia de luz, contraste de fase, mostraram que as células tratadas com os análogos ISA017 e ISA161, na concentração de 1000 nM e incubadas por 48 horas, apresentavam características morfológicas típicas do processo apoptótico, como por

[Digite texto]

exemplo, bolhas de citoplasma partindo da membrana plasmática celular que se desprendiam e formavam corpos apoptóticos e fragmentação do núcleo (figura 15).

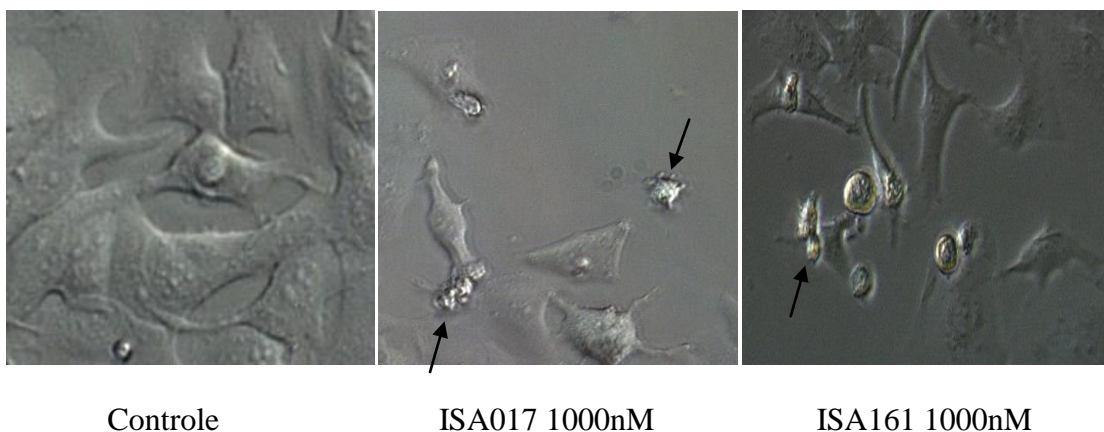


Figura 15 – Análise Morfológica. Micrografia representativa de células controle e células MCF7 tratadas com os análogos ISA017 e ISA161, na concentração de 1000nM, incubadas por 48 horas, aumento de 20X. As setas indicam a formação desses corpos apoptóticos e fragmentação do núcleo.

4.2.2 Indução de Apoptose observada no Ensaio da Annexina V- APC por Citometria de fluxo

Para a avaliação do potencial efeito de apoptose dos análogos ISA017 e ISA161, o ensaio de annexina V-APC por citometria de fluxo foi realizado na linhagem celular MCF7. As células foram tratadas na concentração de 100 μ M de cada um dos análogos (ISA017 e ISA161), 10 μ M de Tamoxifeno ou 1 μ M de Paclitaxel. Os experimentos foram conduzidos para a avaliação de apoptose em células tratadas e incubadas por 48 horas. Como mostrado no gráfico 5, foi possível observar apoptose precoce em 9,1% e apoptose tardia em 18,8% das células tratadas com ISA017. Também se observa apoptose precoce em 10% e apoptose tardia 14,6% das células tratadas com ISA161.

[Digite texto]

Em relação ao controle positivo, Tamoxifeno induziu apoptose precoce em 18% e apoptose tardia em 16,7% das células testadas. O Paclitaxel apresentou 14,3 % de apoptose precoce e 15,6 % de apoptose tardia nas células MCF7.

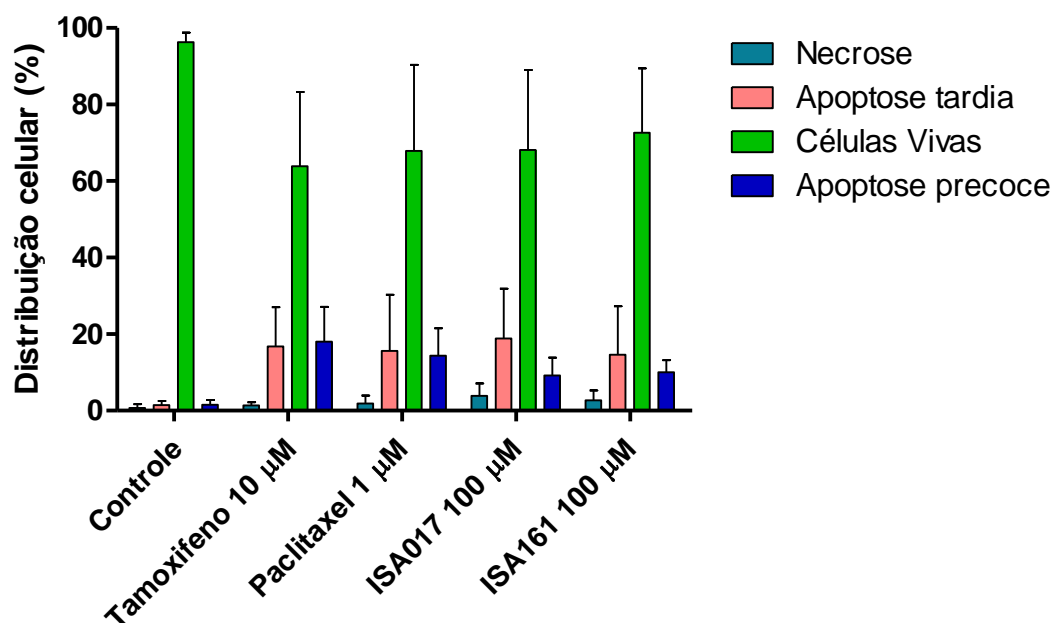


Gráfico 5 - Ensaio de apoptose por citometria de fluxo utilizando annexina V- APC com iodeto de propídio. Os resultados expressam a média de três experimentos independentes.

4.2.3 Ativação de genes da Caspase 3 medida por RT-PCR

A análise da expressão do RNAm para Caspase 3 foi realizada utilizando a técnica de PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR), normalizado pela expressão do gene constitutivo 18S rRNA.

As células da linhagem MCF7 foram tratadas com os análogos ISA017 e ISA161 nas concentrações de 0,01, 0,1, 1 e 100 µM e incubadas por 48 horas. Os resultados mostraram expressão significativa de RNAm para caspase 3 em todas as concentrações testadas após a incubação das células com o análogo ISA017 (gráfico [Digite texto])

6A). Já, quando avaliamos o análogo ISA161, não observamos alterações nos níveis de RNAm para caspase 3 (gráfico 6B).

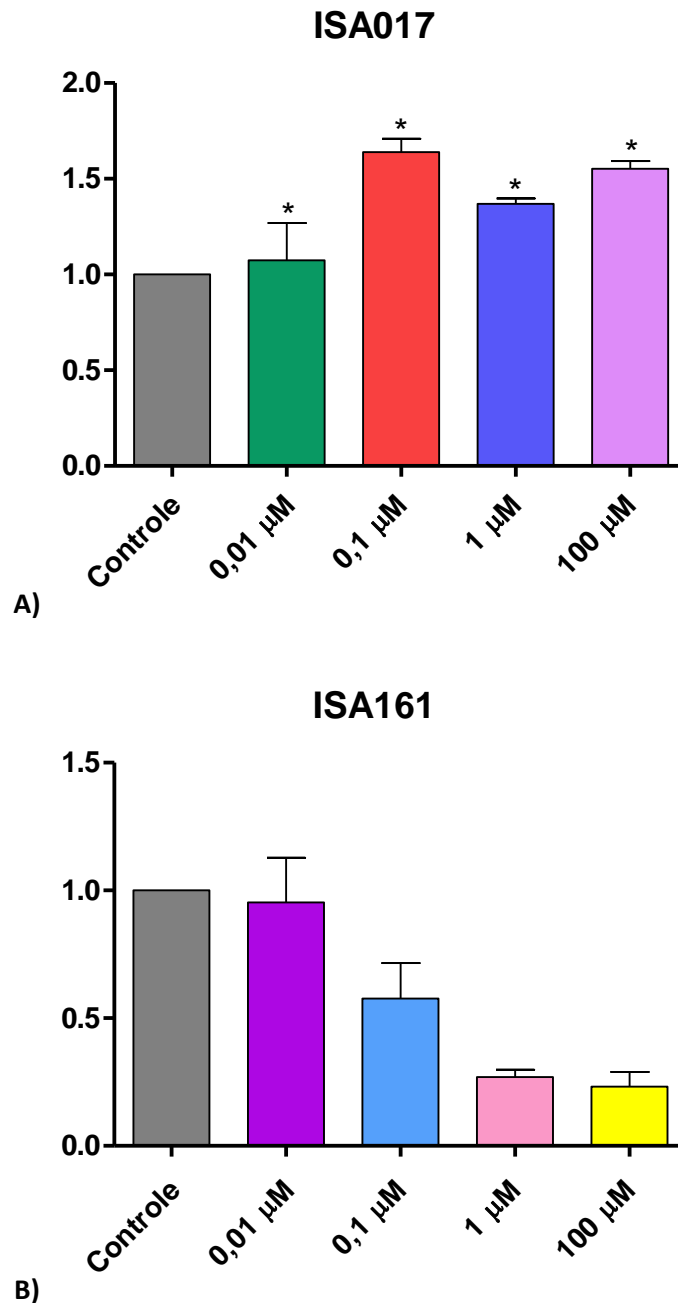


Gráfico 6: Expressão de RNA mensageiro para Caspase 3 em células MCF7. Ensaio de RT-PCR realizado como análogo da Isatina (ISA017)(A) e da Convolutamidina A (B) na linhagem MCF7 tratadas por 48 horas com as concentrações mostradas nos gráficos. A análise da expressão de Caspase 3 foi determinada por absorbância após a incubação

[Digite texto]

com as substâncias teste. Os resultados expressam a média±DP de três experimentos independentes. *p<0,05, em comparação ao controle.

[Digite texto]

5-DISSCUSSÃO

Os tumores malignos representam a segunda causa de mortes no Brasil e no mundo (13%). A morbidade e a mortalidade só tendem a aumentar, de acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2013. O câncer de mama, particularmente, é o tipo de câncer mais comum e a maior causa de mortes por câncer em mulheres (ZHOU e cols., 2013). Com tamanha importância clínica, nos últimos anos, muitos esforços tem se voltado para a descoberta de novas terapias e o diagnóstico precoce deste tipo de câncer, bem como elucidar o processo de tumorigênese e o desenvolvimento de novos marcadores moleculares. Portanto, torna-se imperativa a necessidade de encontrar, desenvolver e introduzir no arsenal médico-farmacológico modalidades terapêuticas mais eficientes, que possam oferecer ao número crescente de pacientes acometidos por esse e outros tumores novas oportunidades no controle das células neoplásicas.

Diversos trabalhos na literatura já relataram que compostos com anel indólico em sua estrutura apresentam atividade citotóxica e antitumoral. É o caso, por exemplo, dos metabólitos indólicos de *Streptomyces* marinho (SANCHEZ-LOPEZ e cols., 2003), que mostraram atividade em pelo menos 14 linhagens celulares tumorais, principalmente linhagens leucêmicas. Também, metabólitos indólicos de esponjas marinhas, sendo estes dibromados, que apresentaram uma grande atividade biológica atuando em diferentes doenças humanas, entre elas atividade antitumoral e ação sobre a inibição de metástase (MOLLICA e cols., 2012). O 1-benzil-3-(5-hidroximetil-2-furanyl) indol (YC-1) é um candidato a fármaco anticâncer muito potente com múltiplas atividades biológicas, incluindo anti-angiogênica, anti-inflamatória e indutora da apoptose, bem como a capacidade de inibir as metaloproteinases da matriz (MMPs). Atividade esta confirmada em modelos animais de tumor de pulmão, câncer renal e câncer de mama (ZHUANG e cols., 2013). Ainda é possível citar o Sunitinib, um

derivado da Isatina, que inibe, pelo menos, 8 receptores de tirosina-quinase, como os receptores para fator de crescimento endotelial vascular necessário para angiogênese tumoral (PAKRAVAN e cols., 2013).

Segundo Giraud e cols, a substituição no núcleo benzênico na posição C-4 ou C-7, quer por um átomo de bromo ou por grupos nitro ou amino e a substituição em C-5 por átomo de iodo ou vários grupos arilo, são particularmente interessantes como inibidores de quinases, inibidores potentes e seletivos de spliceossomos (enzimas que realizam a retirada de íntrons do mRNA, produzindo proteínas anômalas) caracterizando-os como potenciais agentes terapêuticos (GIRAUD e cols., 2011).

O presente estudo não abordou plenamente a atividade antitumoral do análogo da Isatina, *N*-metil-isatina (ISA017) e da Convolutamidina A, 5-cloro-3-(2-oxopropil)-3-hidroxi-2-oxindol (ISA161), mas demonstrou pela primeira vez que os estes análogos podem exercer atividade antitumoral contra a linhagem MCF7 de câncer de mama humano, através da indução de morte celular por apoptose e ativação de caspase 3 (figura 15 e gráfico 6).

Os dois compostos em questão apresentaram efeitos de redução da viabilidade celular de forma equivalente ($20 \pm 1,2$ %), em 24 horas de incubação, porém, o ISA017 apresentou ser mais tóxico (30 a $45 \pm 2,1$ %) para as células tumorais que o ISA161 (30 a $50 \pm 2,9$ %) em 48 horas de incubação. Um estudo realizado por Vine e cols. com o 5,6,7-tribromoisatin não demonstrou atividade citotóxica com 24 horas de incubação para nenhuma das concentrações testadas ($0,1$ a 100 μ M) e apresentou, para o mesmo composto tratado, redução na viabilidade celular em 30% somente a partir da concentração de 10 μ M, quando as células foram incubadas por 48 horas (VINE e cols., 2007). Possivelmente esta diferença na atividade citotóxica dos análogos testados se

deve às diferenças estruturais na substituição dos grupos farmacofóricos das moléculas, já que elas possuem em comum o anel indólico em sua estrutura.

O mesmo estudo realizado por Vine e cols. citado anteriormente, mostrou que a toxicidade dos derivados da isatina varia com a modificação estrutural. A introdução de grupos de retirada de elétrons nas posições 5, 6, 7 do anel indólico, aumentam consideravelmente a atividade citotóxica dos derivados quando comparados com a isatina, e a substituição na posição 5 sendo a mais favorável. A di-halogenação produziu os compostos mais ativos, com aumento da atividade 100 vezes mais citotóxica que a isatina (VINE e cols., 2007).

Embora a ISA017 e a ISA161 demonstrem efeito citotóxico e aumento de morte celular em linhagem de adenocarcinoma de mama, é preciso avaliar qual o tipo de morte celular está sendo induzida.

Atualmente tem sido enfatizada a relação entre apoptose e câncer, sugerindo que a progressão da neoplasia envolve alteração dos estágios de apoptose em células normais. Uma vez iniciada a apoptose, ocorrem inúmeras variações morfológicas, como: perda de volume celular, condensação da cromatina, fragmentação nuclear, formação de vesículas citoplasmáticas que formam os chamados corpos apoptóticos (WU e cols., 2001; YANG e cols., 2006).

O tratamento das células da linhagem MCF7 com os compostos ISA017 e ISA161 resultou na morte celular por apoptose. A formação de corpos apoptóticos, alterações na morfologia celular como retração do citosol e fragmentação nuclear. Esses dados, juntamente com os dados obtidos pelo ensaio da Annexina V-APC, em citometria de fluxo, reforçam a hipótese de morte celular por apoptose induzida pelo tratamento com os análogos testados. O gráfico 4 mostra uma atividade discreta de

indução de apoptose tardia/precoce de ambos análogos, que se manifestaram de forma semelhante. Um aspecto a ser levado em consideração sobre este ensaio é que as células em necrose e em apoptose tardia exibem padrões característicos, especialmente quanto à permeabilidade de membrana para o iodeto de propídio que ao ser permeabilizado no citosol não podem ser distinguidos (MACIOROWSKI e cols., 1998). O processo de indução à apoptose observado por citometria de fluxo dos análogos ISA017 e ISA161, não apresentou melhores resultados que os controles positivos utilizados, Tamoxifeno e Paclitaxel, que possuem sua atividade já bem caracterizada na literatura.

Paclitaxel e Tamoxifeno foram utilizados como controle positivo porque já são grandemente utilizados na clínica e já possuem mecanismo de ação já bem caracterizado. O Paclitaxel é o fármaco de primeira linha para o tratamento do câncer de mama metastático. É um agente antimicrotúbulo que promove a agregação dos microtúbulos a partir dos dímeros de tubulina. Ele estabiliza os microtúbulos prevenindo a despolimerização, resultando na inibição da dinâmica normal de reorganização da rede de microtúbulos essencial para as funções celulares. O paclitaxel também induz a formação anormal ou feixe de microtúbulos durante o ciclo celular e múltiplos ásteres de microtúbulos durante a mitose (YERLIKAYA e cols., 2013). O Tamoxifeno foi o primeiro fármaco empregado como hormonioterapia para o tratamento do câncer de mama e o primeiro a ser usado como quimiopreventivo, tendo sido empregado desde a década de 70 em terapias hormonais de tal carcinoma (JORDAN, 2007). É um pró-fármaco que se liga competitivamente aos receptores de estrógeno em tumores e outros tecidos alvos, produzindo um complexo nuclear que diminui a síntese de DNA e inibe os efeitos do estrogênio e faz com que as células permaneçam em G_0 e G_1 nas fases do ciclo celular. Desta forma, o tamoxifeno impede que as células neoplásicas se dividam e não causa a morte celular (JORDAN, 2007).

Como mencionado acima, apoptose é processo fisiológico essencial e amplo, qualquer tipo de distúrbio deste processo resulta em vários efeitos colaterais. Um dos primeiros mecanismos a sentir esta desestabilização, são as caspases iniciadoras através de várias cascatas de sinalização da apoptose que convergem no ponto alvo crucial anti-apoptótico das caspases executoras.

As modificações morfológicas que ocorrem na célula em apoptose são promovidas pelas caspases. Essas proteases são sintetizadas como precursores inativos, as pró-enzimas, que são convertidas em forma ativa após clivagem proteolítica e ativadas, em caspases, somente quando a célula recebe algum sinal de morte. A caspase 3 é denominada como caspase efetora, que, é ativada pela ativação prévia de caspases 8 e 9, que são iniciadoras (BRATTON e cols., 2001).

Desta forma, em continuidade a este estudo, foi realizada a avaliação da atividade apoptótica pela via da caspase efetora 3. Para isto, foi realizado o ensaio de RT-PCR para avaliar a ativação do gene para caspase 3.

As células MCF7 tratadas com o análogo ISA017 apresentou ativação do gene para caspase 3 em todas as concentrações testadas, não mostrando ativação dose-dependente, como pode ser observado no gráfico 5A.

Diferentemente, a ISA161 não apresentou resultados significativos de ativação do gene de caspase 3 (gráfico 5B), sugerindo que esta molécula provavelmente induz outro tipo de morte celular que não ative a caspase 3, como por exemplo a necrose ou ativa outras vias da sinalização celular.

Em outros estudos, encontrou-se um baixo nível de caspase 3 detectável no tratamento da linhagem MCF7 com paclitaxel (KOTTKE e cols., 2002) e significativo aumento da atividade da enzima das células expostas a doxorubicina. (WANG e cols., 2004; ZOLI e cols., 2005).

Com base nos resultados obtidos, através dos ensaios empregados neste trabalho, consideramos necessários maiores estudos sobre os mecanismos que levam a linhagem de câncer de mama humano MCF-7 à morte celular e que potencialmente os análogos da Isatina (ISA017) e da Convolutamidina A (ISA161) possuem atividade citotóxica.

[Digite texto]

6- CONCLUSÕES

Este trabalho é o primeiro a:

- Verificar a atividade antitumoral dos compostos ISA017 e ISA161 em linhagem de tumor de mama MCF7;
- Relacionar atividade citotóxica a estes compostos;
- Verificar a morte celular por apoptose nas células MCF7, quando tratadas com os compostos estudados;
- Verificar a ativação do gene para caspase 3 na linhagem celular MCF7, quando tratada com ISA017.

Conclui-se que:

- Os análogos da Isatina (ISA017) e da Convolutamidina A (ISA161) foram capazes de reduzir a viabilidade celular das células da linhagem MCF7;
- A morte celular induzida por esses compostos possivelmente ocorreu por apoptose;
- O análogo ISA017 leva à morte celular por apoptose e ativação da via de caspase 3 efetora.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[Digite texto]

AFFELDT, S.; SINGH, P. P.; CASCONI, I.; SELIMOGLU, R.; CAMONIS, J.; ISAMBERT, H. Evolution and cancer: expansion of dangerous gene repertoire by whole genome duplications. **Med. Sci. (Paris)**. 29: 358–361. 2013.

ALMAGRO, M. C.; VUCIC, D. The inhibitor of apoptosis (iap) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. **Exp. Oncol.** 34: 200–211. 2012.

BERGMAN, J.; LINDSTORM, J. O.; TILSTAM, U. The structure and properties of some indolic constituents in *Couroupita guianensis* Aubl. **Tetrahedron**. 41: 2879–2881. 1985.

BHRIGU, B.; PATHAK, D.; SIDDIQUI, N.; ALAM, M. S.; AHSAN, W. Search for biological active isatins: a short review. **Int. J. Pharm. Sci. Drug. Res.** 2: 229–35. 2010.

BRACKE, M. E.; VANHOECKE, B. W. A.; DERYCKE, L.; BOLCA, S.; POSSEMIERS S.; HEYERICK, A.; STEVENS, C. V.; DE KEUKELEIRE, D.; DEYPERE, H. T.; VERSTRAETE, W.; WILLIAMS, C. A.; MCKENNA, S. T.; TOMAR, S.; SHARMA, D.; PRASAD, A. K.; DEPASS, A. L.; PARMAR, V. S. Plant Polyphenolics as Anti-Invasive Cancer Agents. **Anti-Cancer Agents Medic. Chem.** 8: 171-185. 2008.

BRATTON, B. S.; SRINIVASULA, S. M.; SUN, X.M.; BUTTERWORTH, M.; ALNEMRI, E. S.; COHEN, G. M. Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. **Embo J.** 20: 998-1009. 2001.

BRAY, F.; MCCARRON, P.; PARKIN, D. M. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. **Breast Cancer Res.** 6: 229-239. 2004.

BUDIHardjo, I.; OLIVER, H.; LUTTER, M.; LUO, X.; WANG, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Rev. Cell Dev. Biol.** 15: 269–290. 1999.

CANE, A.; TOURNAIRE, M. C.; BARRITAU, D.; CRUMEYROLLE-ARIAS, M. The endogenous oxindoles 5-hydroxyoxindole and isatin are antiproliferative and proapoptotic. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 16: 379-84. 2000.

CARNESECA, E. C.; MAUAD, E. C.; ARAÚJO, M. A.; DALBO, R. M.; FILHO, A. L.; VAZQUEZ, V. The Hospital de Cancer de Barretos Registry: an analysis of cancer survival at a single institution in Brazil over a 10-year period. **BMC Res. Notes.** 6:141. 2013.

CORADINI, D.; DAIDONE, M. G. Biomolecular prognostic factors in breast cancer. **Curr. Opinion Obst. Gynecol.** 16: 49–55. 2004.

CURADO, M. P. Breast cancer in the world: Incidence and mortality. **Salud Pub. Mex.** 53: 372-384. 2011.

DA SILVA, J. F. M.; GARDEN, S. J.; PINTO, A. C. The chemistry of isatins: a review from 1975 to 1999. **J. Braz. Chem. Soc.** 12: 273–324. 2001.

DESAGHER, S.; MARTINOU, J.C. Mitochondria as the central control point of apoptosis. **Trends Cell Biol.** 10: 369-77. 2000.

DOGAN, S.; DIECI, M. V.; GOUBAR, A.; ARNEDOS, M.; DELALOGUE, S.; ANDRE, F. Landscape and evolution of therapeutic research for breast cancer patients. **Breast Cancer Res. Treat.** 138: 319–324. 2013.

EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP (EBCTCG). Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10 801 women in 17 randomised trials. **Lancet.** 378: 1707–16. 2011.

FARIA, M. H. G; PATRICÍNIO, R. M. S. V.; MORAES-FILHO, M. O.; RABENHORST, S. H. B. Expression of BCL-2 and BAX proteins in human astrocytic tumors. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** 42: 271-278. 2006.

FIGUEIREDO, G. S. M.; ZARDO, R. S.; SILVA, B. V.; VIOLANTE, F. A.; PINTO, A. C.; FERNANDES, P. D. Convolutamydine A and synthetic analogues have antinociceptive properties in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 103: 431-439. 2012.

FUENTES-GONZÁLEZ, A. M.; CONTRERAS-PAREDES, A.; MANZO-MERINO, J.; LIZANO, M. The modulation of apoptosis by oncogenic viruses. **Virol. J.** 10:182. 2013.

GARDEN, S. J.; TORRES, J. C.; FERREIRA, A. A.; SILVA, R. B.; PINTO, A. C. A modified Sandmeyer methodology and the synthesis of (±) convolutamydine A. **Tetrahedron.** 38: 1501-1504. 1997.

GARG, A. D.; MARTIN, S.; GOLAB, J.; AGOSTINIS, P. Danger signalling during cancer cell death: origins, plasticity and regulation. **Cell Death Differ.** 17:1038. 2013.

GIRAUD, F.; ALVES, G.; DEBITON, E.; NAUTON, L.; THÉRY, V.; DURIEU, E.; FERANDIN, Y.; LOZACH, O.; MEIJER, L.; ANIZON, F.; PEREIRA, E.; MOREAU, P. Synthesis, protein kinase inhibitory potencies, and in vitro antiproliferative activities of meridianin derivatives. **J. Med. Chem.** 14: 4474-89. 2011.

GLOVER, V.; HALKET, J. M.; WATKINS, P. J.; CLOW, A.; GOODWIN, B. L.; SANDLER, M. Isatin: identity with the purified endogenous monoamine oxidase inhibitor tribulin. **J. Neurochem.** 51: 656-9. 1988.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Apoptosis: Programmed Cell Death. **Rev. Bras. Cancerol.** 53: 335-343. 2007.

GUILLAN, E. M.; NOTLEY, L. M.; CAI, H; DE VOSS, J. J.; GUENGERICH, F. P. Oxidation of indole by cytochrome P450 enzymes. **Biochemistry.** 39: 13817-24. 2000.

GUO, Y.; CHEN, F. TLC-UV-spectrophotometric and TLC-scanning determination of isatin in leaf of *Isatis*. **Zhong**. 17: 8-11. 1986.

HALL, M. D.; SALAM N. K.; HELLAWELL, J. L.; FALES, H. M.; KENSLER, C. B.; LUDWIG, J. A. Synthesis, Activity and pharmacophore development for isatin-beta-thiosemicarbazones with selective activity toward multidrug-resistant cells. **J. Med. Chem.** 52:3191–204. 2009.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**. 407. 2000.

HEWAWASAM, P.; ERWAY, M.; MOON, S.; KNIPPE, J.; WEINER, H.; BLOSSARD, C. G.; POST-MUNSON, D. J.; GAO, Q.; HUANG, S.; GRIBKOFF, V. K.; MEANWELL, N. A. Synthesis and Structure-Activity Relationships of 3-Aryloxindoles: A New Class of Calcium-Dependent, Large Conductance Potassium (Maxi-K) Channel Openers with Neuroprotective Properties **J. Med. Chem.** 45:487-1499. 2002.

HOU, L.; JU, C.; ZHANG, J.; SONG, J.; GE, Y.; YUE, W. Antitumor effects of Isatin on human neuroblastoma cell line (SH-SY5Y) and the related mechanism. **Eur. J. Pharmacol.** 589: 27-31. 2008.

IGOSHEVA, N.; LORZ, C.; O’CORNNER, E.; GLOVER, V.; MERHMET, H. Isatin, an endogenous monoamine oxidase inhibitor, triggers a dose- and time-dependent switch from apoptosis to necrosis in human neuroblastoma cells. **Neurochem. Int.** 47: 216-224. 2005.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA. Estimativa 2012 – Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>. Acesso em: jun/2013.

IRSIK, D. L.; CARMINES, P. K.; LANE, P. H. Classical Estrogen Receptors and ER α Splice Variants in the Mouse. **PLoS One**. 5: 70926. 2013.

JORDAN, V. C. Chemoprevention of breast cancer with selective oestrogen-receptor modulators. **Nat. Rev. Cancer**. 7: 46-53. 2007.

JUO, P.; WOO, M. S.; KUO, C. J.; SIGNORELLI, P.; BIEMANN, H. P.; HANNUN, Y. A.; BLENIS, J. FADD is required for multiple signaling events downstream of the receptor Fas. **Cell Growth Differ**.10: 797-804. 1999.

KAMANO, Y.; ZHANG, H-P.; ICHIHARA, Y.; KIZU, H.; KOMIYAMA, K.; PETTIT, G.R. Convolutamydine A, anovel bioactive hydroxyindole alkaloid from marine bryozoan *Amathia convoluta*. **Tetrahedron**. 36: 2783–2787. 1995.

KELEKAR, A.; THOMPSON, C. B. Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. **Trends Cell Biol**. 8: 324-30. 1998.

KIRKIN, V.; JOOS, S.; ZÖRNIG, M. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. **Biochim. Biophys. Acta.** 1: 229-49. 2004.

KOPKA, K.; FAUST, A.; KEUL, P.; WAGNER, S.; BREYHOLZ, H-J.; HLTKE, C.; SCHOBER, O.; SCHFERS, M.; LEVKAU, B. 5-Pyrrolidinylsulfonyl Isatins as a potential tool for the molecular imaging of caspases in apoptosis. **J. Medic. Chem.** 49: 6704-6715. 2006.

KOTTKE, T. J.; BLAJESKI, A. L.; MENG, X. W.; SVINGEN, P. A.; RUCHAUD, S.; MESNER, P. W.; BOERNER, S. A.; SAMEJIMA, K.; HENRIQUEZ, N. V.; CHILCOTE, T. J.; LORD, J.; SALMON, M.; EARNSHAW, W. C.; KAUFMANN, S. H. Lack of correlation between caspase activation and caspase activity assays in paclitaxel-treated MCF-7 breast cancer cells. **J. Biol. Chem.** 277: 804–815. 2002.

MACIOROWSKI, Z.; DELIC, J.; PADOY, E.; KLIJANIENKO, J.; DUBRAY, B.; COSSET, J-M.; DUMONT, J.; MAGDELÉNAT, H.; VIELH, P. Comparative analysis of apoptosis measured by Hoechst and flow cytometry in Hodgkin's lymphomas. **Cytometry.** 32: 44-50. 1998.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature Rev. Cancer.** 9: 153-166. 2009.

MATESIC, L.; LOCKE, J. M.; BREMNER, J. B.; PYNE, S. G.; SKROPETA, D.; RANSON, M.; VINE, K. L. N-phenethyl and N-naphthylmethyl isatins and analogues as in vitro cytotoxic agents. **Bioorg. Med. Chem.** 15: 3118-24. 2008.

MATHEUS, M. E.; GARDEN, S. J.; PINTO, A. C.; FERNANDES, P. D. Isatins inhibit cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in a mouse macrophage cell line. **Europ. J. Pharmacol.** 556: 200-206. 2007.

MARVEL, C. S.; HIERS, G. S. Isatin. **Org. Synt. Coll.** 327-330. 1941.

MEDVEDEV, A.; GOODWIN, B.; CLOW, A.; HALKET, J.; GLOVER, V.; SANDLER, M. Inhibitory potency of some isatin analogues on human monoamine oxidase A and B. **Biochem. Pharmacol.** 4: 590-2. 1992.

MEDVEDEV, A.; CLOW, A.; SANDLER, M.; GLOVER, V. Isatin: a link between natriuretic peptides and monoamines? **Biochem. Pharmacol.** 9: 385-91. 1996.

MEDVEDEV, A.; BUSSYGYNA, O.; PYATAKOVA, N.; GLOVER, V.; SEVERINA, I. Effect of isatin on nitric oxide-stimulated soluble guanylate cyclase from human platelets. **Biochem. Pharmacol.** 15:763-6. 2002.

MEDVEDEV, A.; IGOSHEVA, N.; CRUMEYROLLE-ARIAS, M.; GLOVER, V. Isatin: role in stress and anxiety. **Stress.** 8:175-83. 2005.

MEDVEDEV, Y. V.; KIM, M. S.; USACHEV, Y. M. Mechanisms of prolonged presynaptic Ca²⁺ signaling and glutamate release induced by TRPV1 activation in rat sensory neurons. **J. Neuroscience.** 28: 5295–5311. 2008.

- MESTER, J.; REDEUILH, G. Proliferation of breast cancer cells: regulation, mediators, targets for therapy. **Anti-Cancer Agents Med. Chem.** 8: 872-885. 2008.
- MOLLICA, A.; LOCATELLI, M.; STEFANUCCI, A.; PINNEN, F. Synthesis and Bioactivity of Secondary Metabolites from Marine Sponges Containing Dibrominated Indolic Systems. **Molecules.** 17: 6083-6099. 2012.
- MUKHERJEE, S. The Emperor of All Maladies: A Biography of Cancer. New York: **Denver Post**. 2012. 583p.
- NIKOLETOPOULOU, V.; PALIKARAS, M. M. K.; TAVERNARAKIS, N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochim. Bioph. Acta** 12: 2-9. 2013.
- OGINO, H.; SHIBAMOTO, Y.; SUGIE, C.; ITO, M. Biological Effects of Intermittent Radiation in Cultured Tumor Cells: Influence of Fraction Number and Dose Per Fraction. **J. Radiation Res.** 46: 401-406. 2005.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS. Disponível em <http://www.who.int>. Acesso em jun/2013.
- OKADA, H.; MAK, T. W. Pathways of apoptotic and Non-apoptotic death in Tumour cells. **Nature Rev. Cancer.** 4: 592-603. 2004.
- PANDEYA, S. N.; SMITHA, S.; JYOTI, M.; SRIDHAR, S. K. Biological activities of isatin and its derivatives. **Acta Pharm.** 55: 27-46. 2005.
- PAKRAVAN, P.; KASHANIAN, S.; KHODAEI, M. M.; HARDING, F. J. Biochemical and pharmacological characterization of isatin and its derivatives: from structure to activity. **Pharmac. Rep.** 65: 313-335. 2013.
- PARKIN, D. M.; BRAY, F.; FERLAY, J.; PISANI, P. Global Cancer Statistics- 2002. **CA Cancer J. Clin.** 55: 74-108, 2005.
- PAULOVICH, A. G.; TOCZYSKI, D. P.; HARTWELL, L. H. When Checkpoints Fail. **Cell.** 88: 315-321. 1997.
- PEDDIBHOTLA, S. 3-Substituted-3-hydroxy-2-oxindole, an emerging new scaffold for drug discovery with potential anti-cancer and other biological activities. **Curr. Bioact. Compd.** 5: 20-38. 2009.
- POPP, F. D. J. Potential anticonvulsants. X (Reisert compounds studies. LI.) 1-methyl-4-(1-isoquinolinyl)piperidin-4-ol and related compounds. **Heterocyc. Chem.** 22: 869-872. 1985.
- PORE, M. M.; HILTERMANN, T. J.; KRUYT, F. A. Targeting apoptosis pathways in lung cancer. **Cancer Lett.** 28: 359-68. 2013.

PREMANATHAN, M.; RADHAKRISHNAN, S.; KULANGIAPPAR, K.; SINGARAVELU, G.; THIRUMALAIARASU, V.; SIVAKUMAR, T.; KATHIRESAN, K. Antioxidant & anticancer activities of isatin (1H-indole-2,3-dione), isolated from the flowers of *Couroupita guianensis* Aubl. **Indian J. Med. Res.** 136: 822-826. 2012.

SÁNCHEZ-LÓPEZ, J. M.; MARTÍNEZ, I. M.; PÉREZ, B. J.; FERNÁNDEZ P. J. L.; CAÑEDO, H. L. M. New cytotoxic indolic metabolites from a marine Streptomyces. **J Nat. Prod.** 66: 863-4. 2003.

SANDMEYER, T. Isonitrosoacetanilides and their condensation to form isatin derivatives. **Chem. Abst.** 13:1840-1841. 1919.

SATHISHA, M. P.; REVANKAR, V. K.; PAI, K. S. R. Synthesis, structure, electrochemistry and spectral characterization of bis-isatin thiocarbohydrazone metal complexes and their antitumor activity against Ehrlich ascites carcinoma in swiss albino mice. **Metal-Based Drugs.** 2008:1-11. 2008.

SHEVKHGEIMER, M. G. Synthesis of heterocyclic compounds by the cyclization of isatin and its derivatives (review). **Chem. Heterocyclic Comp.** 32: 249-276. 1996.

SILVA, B. R.; TORRES, J. C.; GARDEN, S. J.; VIOLANTE, F. A.; REZENDE, M. J. C. Do isolamento à síntese da convolutamidina A. **Quim. Nova.** 31: 924-929. 2008.

SILVA, B.V.; RIBEIRO, N. M.; VARGAS, M. D.; LANZMASTER, M.; CARNEIRO, J. W. M.; KROGH, R. Synthesis, electrochemical studies and anticancer activity of ferrocenyl oxindoles. **Dalton Trans.** 39: 7338-44. 2010.

SILVA, J. F. M.; GARDEN, S. J.; PINTO, A. C. The chemistry of isatins: a review from 1975 to 1999. **Journal of the Brazilian Chemical Society.** 12: 273-324. 2001.

SRIDHAR, S.; RAMESH, A. Synthesis and pharmacological activities of hydrazones, Schiff and Mannich bases of isatin derivatives. **Biol. Pharmac. Bul.** 24: 1149-1152. 2001.

SU, M.; MEI, Y.; SINHA, S. Role of the Crosstalk between Autophagy and Apoptosis in Cancer. **J. Oncol.** 2013: 1-15. 2013.

TOKUNAGA, T.; HUME, W.E.; UMEZOME, T.; OKAZAKI, K.; UEKI, Y.; KUMAGAI, K.; HOURAI, S.; NAGAMINE, J.; SEIKI, H.; TAJI, M.; NOGUCHI, H.; NAGATA, R. Oxindole Derivatives as Orally Active Potent Growth Hormone Secretagogues. **J. Med. Chem.** 44: 4641-4649. 2001.

THOMADAKI, H.; TALIERI, M.; SCORILAS, A. Prognostic value of the apoptosis related genes BCL2 and BCL2L12 in breast cancer. **Cancer Lett.** 247: 48-55. 2007.

VINE, K. L.; LOCKE, J. M.; RANSON, M.; PYNE, S. G.; BREMNER, J. B. An investigation into the cytotoxicity and mode of action of some novel N-alkyl-substituted isatins. **J. Medic. Chem.** 50: 5109-5117. 2006.

VINE, K. L.; MATESIC, L.; LOCKE, J. M.; RANSON, M.; SKROPETA, D. Cytotoxic and anticancer activities of isatin and its derivatives: a comprehensive review from 2000–2008. **Anti-Cancer Agents Med. Chem.** 9: 397–414. 2008.

WANG, S.; KONOREV, E. A.; KOTAMRAJU, S.; JOSEPH, J.; KALIVENDI, S.; KALYANARMAN, B. Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms. Intermediacy of H₂O₂- and p53-dependent pathways. **J. Biol. Chem.** 279: 25535–25543. 2004.

WU, X. X.; KAKEHI, Y.; MIZUTANI, Y.; L. U, J.; TERACHI, T.; OGAWA, O. Activation of caspase-3 in renal cell carcinoma cells by anthracyclines or 5-fluorouracil. **Int. J. Oncol.** 19: 19–24. 2001.

XU, G.; MCLEOD, H. L. Strategies for enzyme/Prodrug cancer therapy. **Clin. Cancer Res.** 7: 3314-3324. 2001.

YANG, H.; CHEN, C.; CHANG, W.; LU, F.; LAI, Y.; CHEN, C.; HSEU, T.; KUO, C.; HSEU, Y. Growth inhibition and induction of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells by Antrodia camphorate. **Cancer Lett.** 231: 215-227. 2006.

YERLIKAYA, F.; OZGEN, A.; VURAL, I.; GUVEN, O.; KARAAGAOGLU, E.; KHAN, M. A.; CAPAN, Y. Development and Evaluation of Paclitaxel Nanoparticles Using a Quality-by-Design Approach. **J. Pharm. Sci.** 2013: 1-14. 2013.

YOCHIKA, W. A.; MURAKAMI, T.; KISHI, A.; SAKURAMA, T.; MATSUDA, H.; NOMURA, M.; KUBOO, M. Novel indole S,O-bisdesmoside, calanthoside, the precursor glycoside of tryptanthrin, indirubin and isatin, with increasing skin blood flow promoting effects, from two *Calanthe* species (Orchidaceae). **Chem. Pharm. Bull.** 46: 886-888. 1998.

ZAPATA-SUDO, G.; PONTES, L. B.; GABRIEL, D.; MENDES, T. C.; RIBEIRO, N. M.; PINTO, A. C.; TRACHEZ, M. M.; SUDO, R. T. Sedative-hypnotic profile of novel isatin ketals. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 86: 678-85. 2007.

ZHANG, H. P.; KAMANO, Y.; ICHIHARA, Y.; KIZU, H.; KOMIYAMA, K.; ITOKAWA, H.; PETTIT, G. R. Isolation and structure of convolutamydines B ~ D from marine bryozoan *Amathia convolute*. **Tetrahedron.** 51: 5523-5528. 1995.

ZHOU, L.; LI, K.; LUO Y.; TIAN, L.; WANG, M.; LI, C.; HUANG, Q. Novel prognostic markers for patients with triple-negative breast cancer. **Human Pathol.** 2013: 1-8. 2013.

ZHUANG, S. H.; LIN, Y. C.; CHOU, L. C.; HSU, M. H.; LIN, H. Y.; HUANG, C. H.; LIEN, J. C.; KUO, S. C.; HUANG, L. J. Synthesis and anticancer activity of 2,4-disubstituted furo[3,2-b]indole derivatives. **Eur. J. Med. Chem.** 66: 466-79. 2013.

ZIYAIE, D.; HUPP, T. R.; THOMPSON A. M. p53 and breast cancer. **The Breast**. 9: 239-246. 2000.

ZOLI, W.; ULIVI, P.; TESEI, A.; FABBRI, F.; ROSETTI, M.; MALTONI, R.; GIUNCHI, D. C.; RICOTTI, L.; BRIGLIADORI, G.; VANNINI, I.; AMADORI, D. Addition of 5-fluorouracil to doxorubicinpaclitaxel sequence increases caspase-dependent apoptosis in breast cancer cell lines. **Breast Cancer Res**.7: 681–689. 2005.

ZÖRNIG, M.; HUEBER, A.; BAUM, W.; EVAN, G. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. **Biochim. Biophys. Acta**. 1: 1-37. 2001.