PAMELA CASTILHO DE CARVALHO

**DIARILSULFETOS ANÁLOGOS DA COMBRETASTATINA
A-4: AVALIAÇÃO TOXICOGENÉTICA,
IMUNOMODULATÓRIA, APOPTÓTICA E PROSPECÇÃO DE
UM NOVO QUIMIOTERÁPICO**

CAMPO GRANDE

2014

PAMELA CASTILHO DE CARVALHO

**DIARILSULFETOS ANÁLOGOS DA COMBRETASTATINA
A-4: AVALIAÇÃO TOXICOGENÉTICA,
IMUNOMODULATÓRIA, APOPTÓTICA E PROSPECÇÃO DE
UM NOVO QUIMIOTERÁPICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Andreia Conceição
Milán Brochado Antonioli Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Juliano
Oliveira

CAMPO GRANDE

2014

FOLHA DE APROVAÇÃO

PAMELA CASTILHO DE CARVALHO

DIARILSULFETOS ANÁLOGOS DA COMBRETASTATINA A-4: AVALIAÇÃO TOXICOGENÉTICA, IMUNOMODULATÓRIA, APOPTÓTICA E PROSPECÇÃO DE UM NOVO QUIMIOTERÁPICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Resultado _____

Campo Grande (MS), _____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Andreia Conceição Milan Brochado Antonioli Silva
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Prof^a. Dr^a. Renata Matuo
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Prof. Dr. Fabrício Garmus Sousa
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS

Dedicatória

À Deus fonte de inspiração e sabedoria.

Aos meus pais, Romilda e Manoel,
que me proporcionaram anos de estudos para
meu desenvolvimento profissional. Agradeço

a presença em todos os momentos, a
esperança dos seus sorrisos. O brilho dos
seus olhares me fizeram tão grande quanto
o amor de vocês por mim. Se eu pudesse
lhes fazer eternos...eternos eu lhes
faria!

A vocês que sempre compartilharam meus
sonhos e desalentos, vitórias e derrotas,
alegrias e tristezas, incentivando-me a
prosseguir a jornada, fossem quais fossem
os obstáculos, mantiveram-se ao meu lado,
lutando pelo meu sucesso.

Meu muito obrigada.

A mais profunda admiração e gratidão!

Às minhas irmãs Mitsu e Camila,
Pela paciência com a irmã “chata e
estressada” . Pelo amor, companheirismo e
apoio, mesmo de longe.

Aos meus sobrinhos Ana Luisa e João Lucas,
Amo vocês.

Agradecimentos

A Deus,

De ti Senhor recebi o dom mais precioso: a vida.

As minhas irmãs Camila e Mitsu,

Pela companhia, pela força, pelas orações que com certeza fizeram a diferença, pelas piadas nas horas mais inoportunas, amo vocês.

A minha família,

Sem vocês nada seria, deixo aqui meus agradecimentos, por tanto carinho recebido, amo todos vocês.

A minha amiga Beatriz,

Se aqui pudesse expressar o vigor desta amizade! Só Deus é testemunha do quanto meu coração guarda de carinho, de afeição, de respeito por esta grande amizade. Querida amiga, palavras são poucas para expressar minha eterna gratidão e amizade. Amo você.

As meninas do laboratório, Mayra, Nath e Steph, obrigada por tudo, vocês sabem o quanto foram importantes nessa etapa da minha vida, obrigada pelas risadas até a barriga doer.

Ao Edson dos Anjos dos Santos, pelo esforço e pela grande contribuição no trabalho.

A Professora Andréia Conceição Brochado Antonioli, minha orientadora, pelo carinho, atenção e cuidado, serei eternamente grata.

Ao Professor Rodrigo Juliano Oliveira, meu co-orientador, obrigada pela paciência, compreensão, amizade e pelo esforço dedicado à concretização deste trabalho. Muito obrigada também pela confiança depositada em mim e por acreditar no meu potencial.

Aos animais utilizados para a realização deste experimento, muito obrigada.

A CAPES e a FUNDECT, pelo auxílio financeiro concedido.

“Antes do egoísmo, do orgulho e da ambição, lembra-te de que és pó....”
Desconhecido

RESUMO

CARVALHO, Pamela Castilho de. Diarilsulfetos análogos da combrestatatina A-4: avaliação toxicogenética, imunomodulatória e apoptótica. Dissertação(Mestrado Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, MS.

Resumo

A combretastatina A-4 possui eficiente potencial anticancerígeno em tumores humanos e inclusive naqueles resistentes a multidrogas. Esse fato estimulou a pesquisa com dois diarilsulfetos análogos. Foram utilizados 70 camundongos machos Swiss, divididos em 14 grupos: controle negativo, ciclofosfamida (100mg/Kg), análogo 1 e 2 nas doses de 5, 7,5 e 10,0 mg/Kg e associações desses com a ciclofosfamida. Os resultados permitiram inferir que ambos são genotóxicos, mutagênicos e apoptóticos. O análogo 1 tem uma tendência de aumentar a fagocitose esplênica enquanto o 2 a aumenta significativamente. Quando associado à ciclofosfamida o análogo 1 potencializa os efeitos mutagênicos e apoptóticos desse quimioterápico e o análogo 2 não potencializa os efeitos da ciclofosfamida e ainda impede a ocorrência de apoptose, na menor dose. Assim, propõe-se que o análogo 1 pode funcionar como adjuvante quimioterápico e, possivelmente, melhorar o efeito antineoplásico desse medicamento. O que, por sua vez, sugere a sua inclusão deste composto em processos de prospecção de um novo quimioterápico e/ou para a produção de um adjuvante para uso em terapias antineoplásicas combinadas.

Palavras chave: Diarilsulfetos; combrestatatina A-4; toxicogenética; imunomodulação; apoptose.

ABSTRACT

CARVALHO, Pamela Castilho de. Diaryl sulfide combrestatatin A-4 analogs: Toxicogenetics evaluation, immunomodulatory, apoptotic and exploration of a new chemotherapeutic Dissertation (Mestrado Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, MS.

Abstract

Combretastatin A-4 (CA-4) is an effective anticancer compound that is also able to overcome multidrug resistance, which have been promoting the development and research of CA-4 analogues. In this work, we determined the genotoxic, apoptotic and immunomodulatory activities of two CA-4 analogues based on diaryl-sulfide in male Swiss mice. In addition, we also evaluated their activities when combined with cyclophosphamide, a DNA damaging agent commonly used in cancer therapy. The results showed that both compounds were able to induce DNA damage and apoptosis, but the analogue number 1 has a modest immunomodulatory activity, while the analogue number 2 increased splenic phagocytosis considerably. Furthermore, the analogue number 1 association with cyclophosphamide led a strong increase in both DNA damage and apoptosis, while the analogue number 2 combination with cyclophosphamide was slightly antagonist. These diverse activities indicate that, despite their structural similarity, the CA-4 analogues studied here can affect different molecular processes. In turn, this peculiarity suggests that distinct therapeutic applications can be prospect for these compounds.

Keywords: Diaryl-sulfide; Combretastatin A-4; DNA damage; apoptosis; immunomodulatory activity.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos experimentais e dosagem dos compostos	33
Tabela 2. Média dos pesos inicial e final, e ganho de peso dos animais no período experimental.....	55
Tabela 3. Valores médios $\pm$ erro padrão da média do peso relativo dos órgãos dos animais após o período de experimentação	55
Tabela 4. Valores médios $\pm$ erro padrão da média da frequência de células lesionadas, distribuição entre as classes de danos e escore referentes aos testes de (anti)genotoxicidade dos diarilsulfetos 1 e 2 no ensaio do cometa em sangue periférico de camundongos.	56
Tabela 5. Frequência total e valores médios $\pm$ erro padrão da média referentes ao ensaio de micronúcleo em sangue periférico de camundongos:.....	57
Tabela 6. Número total, frequência média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e porcentagem de células com evidência de fagocitose esplênica em camundongos:.....	58
Tabela 7. Avaliação da apoptose em fígado, rins e baço de camundongos: ..	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (A) Estrutura da CA-4; (B) estrutura dos diarilsulfetos 1, 2 e 3.....	31
Figura 2. Média do ganho de peso durante o período experimental. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.	36
Figura 3. Média do número de células com danos no DNA. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.	37
Figura 4. Média da frequência de células micronucleadas. Série 1 24h, série 2 48h, série 3 72h. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.	38
Figura 6. Média do número de células apoptóticas. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.	40
Figura 7. Média do ganho de pesos. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.	41
Figura 8. Células com danos no DNA. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.	42
Figura 9. Média do número de células micronucleadas. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.	43
Figura 10. Média do número de células com evidência de fagocitose. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.	43
Figura 11. Média do número de células apoptóticas. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.	44

SUMÁRIO

1. Introdução	12
1.1 Considerações iniciais	12
1.1.1 Câncer.....	12
1.1.2 Quimioterapia.....	14
1.1.3 Relação entre as tubulinas e o câncer	15
1.1.4. Combretastatina A4	17
1.2 Ensaio Biológicos.....	18
1.2.1 Ensaio do cometa	18
1.2.2 Ensaio do micronúcleo em sangue periférico.....	20
1.2.3 Ensaio de Fagocitose Esplênica	21
1.2.4 Ensaio de apoptose	22
1.3 Referencias.....	23
2. Objetivos	28
2.1 Objetivo Geral.....	28
2.2 Objetivos específicos.....	28
3. Manuscrito.....	29
4. Anexos	55