

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

*Utilização de Peróxidos com atividade antiparasitária
como agentes anticancerígenos*

Maria Inês Alves de Sena

Monografia

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação da Professora Doutora
Maria de Lurdes dos Santos Cristiano

2014

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

*Utilização de Peróxidos com atividade antiparasitária
como agentes anticancerígenos*

Maria Inês Alves de Sena

Monografia

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação da Professora Doutora
Maria de Lurdes dos Santos Cristiano

2014

Utilização de Peróxidos com atividade antiparasitária como agentes anticancerígenos

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Copyright© Maria Inês Sena, Setembro de 2014. A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de outra forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho à minha família, em especial à minha mãe, pai, avó e irmã pela confiança que depositaram em mim e pelo apoio e ajuda prestados em todos os momentos menos bons do meu percurso acadêmico. Sem eles não era possível chegar onde cheguei.

Aos meus amigos que muitas vezes massacrei com o tema: “A Tese” mas, mesmo assim me deram força para continuar.

À minha orientadora de tese, a Professora Maria de Lurdes Cristiano, excelente professora e profissional, pela grande ajuda prestada. Pelas suas sugestões, críticas e conselhos, que foram uma mais valia para todo este trabalho. Pela sua atenção e apoio, pelo estímulo inculcado e pelos ensinamentos que me transmitiu ao longo dos dois anos em que foi minha professora. Agradeço ainda a sua amabilidade por me ter facultado a possibilidade de ter realizado o trabalho prático no seu laboratório e ter integrado parte da sua investigação.

À Lília, a minha “professora” de laboratório, que me apoiou incondicionalmente, gastou muita da sua paciência comigo e que se mostrou sempre disponível para me esclarecer todas as dúvidas e me ensinar, sem ela a escrita da segunda parte deste trabalho teria sido muito mais complicada. Ao Aminn e ao Pedro Horta, companheiros de laboratório, pela ajuda.

A todos os professores que se cruzaram no meu caminho ao longo deste percurso acadêmico, todos eles contribuíram para os conhecimentos que adquiri até hoje e sem os quais a realização desta monografia não teria sido possível.

RESUMO

Cancro é um termo genérico que se utiliza para designar doenças em que as células se dividem sem controlo, podendo invadir outros tecidos do corpo através do sistema sanguíneo e linfático.

Nas células cancerígenas, o ácido desoxirribonucleico lesado não é reparado e a célula não morre, originando novas células de que o corpo não necessita e que possuem o mesmo erro genético que a célula inicial.

O tratamento do cancro (neoplasia) requer cuidado na seleção de uma ou mais intervenções, sendo a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia as estratégias mais utilizadas.

Face às limitações associadas aos fármacos existentes e ao rápido desenvolvimento de resistência, a procura de soluções mais eficazes e seguras para o tratamento de neoplasias representa um premente desafio.

A exploração de fármacos já aprovados para o tratamentos de outras doenças é atrativa, pois grande parte da informação relativa ao perfil farmacocinético e toxicológico é conhecida. Exemplo disso são os peróxidos, derivados da Artemisinina, aplicados no tratamento da Malária. A sua atividade anticancerígena está associada aos mecanismos de indução de apoptose, sendo a ligação endoperóxido existente na estrutura destes compostos, crucial para a atividade.

Com este trabalho pretende-se rever os estudos relativos à utilização de peróxidos como agentes antineoplásicos e as vantagens da sua aplicação em combinação com a terapia convencional.

A preparação relativamente económica e a estabilidade da função trioxolano permitem a síntese de derivados com estruturas diversas, alargando a possibilidade de desenvolvimento de novos fármacos. Durante o trabalho de investigação sintetizaram-se diversos trioxolanos que demonstraram ter uma atividade antimalárica semelhante à dos derivados da Artemisinina aplicados atualmente no tratamento da Malária. Estes compostos também se mostram promissores na área do tratamento do cancro.

Palavras-chave: Cancro, tratamento do cancro, peróxidos, Artemisinina, trioxolanos

ABSTRACT

Cancer is a generic term used to describe diseases in which the cells divide without control and can invade other tissues in the body through the blood and lymphatic system.

In cancer cells, the damaged desoxyribonucleic acid isn't repaired and the cell doesn't die, originating new cells that the body doesn't need but retain the original genetic error.

The cancer's treatment requires a careful selection of one or more interventions. Surgery, radiotherapy and chemotherapy are now the most applied strategies.

Because of the limitations linked to the existing drugs and the rapid development of resistance by cancer cells, the search towards more effective and safe solutions for the treatment of cancer represents an urgent challenge.

The exploitation of chemotypes already approved for the treatment of other diseases is attractive, because much of the information regarding pharmacokinetic and toxicological profile is available. Examples are peroxides derived from Artemisinin, widely applied in the treatment of Malaria. Their proven anticancer activity is associated to interference with mechanisms of apoptosis induction. The endoperoxide bond existing in the structure of these compounds is crucial for their activity.

With this work we intend to review the existing knowledge concerning the use of peroxides as antineoplastic agents and the advantages of their use in combination with conventional therapy.

Relatively easy access to trioxolanes through synthesis and the stability of the trioxolane function allows for the preparation of derivatives with chemical diversity, extending the possibility of developing better and safer drugs. The synthesis of a small library of trioxolanes is described. Compounds prepared demonstrated a similar antimalarial activity to that exhibited by artemisinin derivatives currently used in the treatment of malaria. These compounds have also shown potential for cancer chemotherapy.

Keywords: Cancer, cancer therapy, peroxides, artemisinin, trioxolanes

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE QUADROS	11
LISTA DE TABELAS	11
I – Introdução	12
1. Evolução do Cancro ao longo da história.....	12
1.1. Epidemiologia do Cancro	12
1.2. O que é o cancro?.....	13
1.3. O desenvolvimento do Cancro.....	13
1.4. Causas do Cancro.....	14
1.5. Características das células cancerígenas	17
1.5.1. Independência do fator de crescimento	17
1.5.2. Insensibilidade aos sinais supressores de crescimento	18
1.5.3. Imortalidade celular: Resistência ao estímulo apoptótico	18
1.5.4. Invasão e Metástase	19
1.5.5. Angiogénese	20
1.5.6. Reprogramação do metabolismo energético.....	21
2. Terapias existentes no combate ao cancro	21
2.1. Cirurgia	22
2.1.1. Riscos e efeitos secundários da cirurgia	23
2.2. Radioterapia	24
2.2.1. Riscos e efeitos secundários da radioterapia	26
2.3. Quimioterapia	27
2.3.1. Agentes alquilantes.....	30
2.3.2. Antimetabolitos	35
2.3.3. Antibióticos anti tumorais	37
2.3.4. Inibidores de topoisomerase	39
2.3.5. Inibidores de mitose	41
2.3.6. Corticosteroides	43
2.4. Desvantagens da terapia convencional	44
2.5. Terapia direcionada.....	44
2.6. Aplicação de quimiótipos no tratamento do cancro aprovados para a terapia de outras patologias	49

2.6.1. Artemisinina	49
2.6.1.1. Mecanismo de bioativação e ação da Artemisinina e derivados nas células tumorais	51
II – Síntese e atividade de peróxidos com potencial atividade farmacológica	65
1. Introdução/Objetivo do projeto de investigação	65
1.1. Estratégias de síntese e compostos alvo preparados	68
2. Materiais e Métodos	72
3. Procedimentos de síntese e caracterização dos compostos obtidos	73
3.1. Síntese da adamantil metil oxima (MIS1/LC29)	73
3.2. Síntese de 1-fenil-tetrazolona (MIS2/LC133)	73
3.3. Síntese de <i>tert</i> -butil- N-(4-aminobutil)carbamato (MIS3/LC64)	74
3.4. Procedimento geral para a síntese de 1,2,4- trioxolanos.....	74
3.4.1. Síntese do trioxolano MIS4/LC67.....	75
3.4.2. Síntese do trioxolano MIS5/LC50.....	76
3.4.3. Síntese do trioxolano MIS6/LC90.....	76
3.4.4. Síntese do trioxolano MIS7/LC28.....	76
3.5. Procedimento geral para a síntese da amina primária: cis-adamantano-2-espiro-8-(aminometil)-1-2-4-trioxaspirodecano (MIS10/LC95)	77
3.5.1. Redução do éster a álcool (MIS8/LC93).....	77
3.5.2. Conversão do álcool (MIS8/LC93) no derivado de ftalimida (MIS9/LC94) 77	
3.5.3. Síntese da amina primária(MIS 10/LC95) a partir da ftalimida (MIS9/LC9) 78	
3.6. Síntese do ácido carboxílico (MIS11/LC68) a partir do éster (MIS4/LC67)....	78
3.7. Procedimento geral para síntese de amidas	78
3.7.1. Síntese da amida a partir do ácido carboxílico (MIS12/LC92).....	79
4. Resultados e Discussão	80
III – Conclusão.....	85
IV - Bibliografia	88

LISTA DE ABREVIATURAS

ARM - Artemisona

ART- Artemisinina

ARTs - Artemisininas

AS - Artesunato

ATP - Trifosfato de adenosina

CBP - Carboplatina

Cis-Pt - cisplatina

CTX – Ciclofosfamida

DCM - Diclorometano

DHA - Dihidroartemisinina

DNA - Ácido Desoxirribonucleico (deoxyribonucleic acid)

DOXO - Doxorubicina

EDC - 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

EM - Espetrometria de Massa

Fe - Ferro

GEM - Gemcitabina

HOBt - Hidroxibenzotriazole

HRMS - Espetrometria de Massa de Alta Resolução (High Resolution Mass Spectrometry)

IC₅₀ - Concentração que inibe 50% do crescimento celular

nM - Nanomolar

OXP - Oxaplatina

P. falciparium - *Plasmodium falciparum*

P.f – Ponto de fusão

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RNA - Ácido ribonucleico (ribonucleic acid)

ROS - radicais livres de oxigênio

TGF-β - Fator de crescimento de transformação β

THF - Tetrahidrofurano

TLC - Cromatografia em camada fina (Thin layer chromatography)

VEGF - Fator de crescimento do endotélio vascular

μM – Micromolar

LISTA DE FIGURAS

Figura I-1: Diferentes fases do ciclo celular G1,S,G2 e M e respetiva duração que varia de acordo com o tipo e taxa de crescimento da célula. A atividade óptima de diferentes classes de alguns agentes utilizados na quimioterapia do cancro nas diferentes fases do ciclo celular.....	30
Figura I-2: Estrutura química das mustardas nitrogenadas.....	31
Figura I-3: Proposta de mecanismo de ação das mustardas nitrogenadas.....	32
Figura I-4: Estrutura química das Nitrosoureas.....	33
Figura I-5: Estrutura química do Bussulfano.....	33
Figura I-6: Estrutura química das Triazinas.....	34
Figura I-7: Estrutura química das Etileniminas.....	34
Figura I-8: Estrutura química dos complexos de Platina.....	35
Figura I-9: Estrutura química do ani metabolito Metotrexato.....	36
Figura I-10: Estrutura química das Antraciclina.....	37
Figura I-11: Estrutura química da Actinomicina D.....	38
Figura I-12: Estrutura química da Bleomicina A2.....	38
Figura I-13: Estrutura química da Mitomicina e respetivo mecanismo de ação.....	39
Figura I-14: Estrutura química das Camptotecinas.....	40
Figura I-15: Estrutura química das indenoisoquinolinas.....	40
Figura I-16: Estrutura química das Epipodofilotoxinas.....	41
Figura I-17: Estrutura química dos Alcalóides da Vinca.....	42
Figura I-18: Estrutura química dos Taxanos.....	43
Figura I-19: ART e o farmacóforo 1,2,4 – trioxano.....	50
Figura I-20: Estrutura química da ART e dos seus análogos.....	50
Figura I-21: Possível mecanismo de ação da ART.....	52
Figura I-22: Possíveis mecanismos de atuação da ART e dos seus análogos.....	54
Figura I-23: Estrutura química dos dímeros de trioxanos derivados da Artemisinina.....	62
Figura I-24: Estrutura química de um dímero de ácido artesúnic.....	62
Figura I-25: Estrutura química de dímeros de ART.....	63
Figura I-26: Estrutura química do trímero de DHA.....	63
Figura I-27: Estrutura química geral das ARTs substituídas com um grupo triazolilo.....	63
Figura II-1: Estrutura química geral de 1,2,4-trioxolanos.....	66
Figura II-2: Estrutura química preferencial dos 1,2,4-trioxolanos.....	67

Figura II-3: Estrutura química base dos trioxolanos sintetizados.....	68
Figura II-4: Esquema de síntese da metiloxima de adamantanona.....	68
Figura II-5: Esquemas sintéticos do trabalho experimental.....	70
Figura II-6: Esquema da síntese de MIS5/LC50, por ozonólise.....	70
Figura II-7: Esquema da síntese de MIS6/LC90, por ozonólise.....	71
Figura II-8: Esquema da síntese de MIS7/LC28, por ozonólise.....	72
Figura II-9: Esquema do método de ozonólise de Griesbaum.....	74
Figura II-10: Esquema do processo de ozonólise. Síntese de 1,2,4-trioxolanos através do método de Griesbaum.....	75

LISTA DE QUADROS

Quadro I-1: Fatores de risco que contribuem para o aparecimento do cancro, tipos de cancro associados e idade dos grupos afetados.....	16
Quadro I-2: Terapia de combinação: radioterapia e derivados da ART. Síntese dos estudos efetuados e resultados, linhagens celulares testadas, efeito observado, mecanismo de ação.....	59
Quadro I-3: Combinação da quimioterapia convencional com compostos análogos da ART: Estudos comprovativos, doses aplicadas, tipo de cancro e linhagem celular utilizados, efeito observado e mecanismo subjacente.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela II-1: Valores de IC50 dos compostos MIS5/LC50, MIS10/LC95, MIS1/LC29 e MIS12/LC92, bem como dos compostos comparativos DHA e AS.....	80
Tabela II-2: Valores de IC50, referentes ao estudo de <i>Vennerstrom et al.</i> , dos compostos MIS5/LC50, MIS10/LC95, bem como do composto comparativo, AS.....	82

I – Introdução

1. Evolução do Cancro ao longo da história

O desenvolvimento do cancro em Seres Humanos e animais tem sido descrito ao longo da história. O físico Grego Hipócrates, considerado o pai da Medicina, foi o responsável pela origem da palavra cancro. As palavras carcinos e carcinoma eram usadas para descrever tumores não ulcerosos e ulcerosos, uma vez que a forma como a doença se projeta faz lembrar a forma de um caranguejo. Algumas das evidências mais antigas de cancro foram encontradas em tumores ósseos, da cabeça e pescoço fossilizados em múmias humanas no Antigo Egito, e em manuscritos antigos. As descrições, mais antigas da doença e do seu tratamento datam de 1600 A.C, no Egito e estão contidas no Papiro cirúrgico de Edwin Smith. Este tratado referia o cancro como uma doença sem tratamento. (1,2)

1.1. Epidemiologia do Cancro

Hoje em dia, o Cancro é a principal causa de morte no Mundo e constitui um grave problema de Saúde Pública, sendo responsável por provocar um enorme sofrimento nos doentes e nas pessoas que com eles convivem. Desta doença também resultam custos económicos substanciais para toda a sociedade. (2,3)

De acordo com a World Cancer Research Fund Internacional, em 2012 existiam 14,1 milhões de casos de cancro em todo o Mundo. Em 2035 estima-se que este número atinja os 24 milhões e que 70% das mortes por cancro ocorram nos países pouco desenvolvidos. Esta projecção está baseada no crescimento da população global e no seu envelhecimento mas também com a melhoria dos meios de rastreio, diagnóstico e tratamento. Em 2012 o cancro do pulmão prevalecia, constituindo 13% dos novos casos diagnosticados, sendo este cancro o mais comum no sexo masculino. A seguir encontrava-se o cancro da mama, com prevalência no sexo feminino, e o cancro colorretal. De acordo, com a mesma associação, a taxa de prevalência do cancro é mais elevada nos países desenvolvidos. O cancro dos rins, melanoma, linfoma de Hodgkin e mieloma múltiplo, surgiram como os cancros mais comuns nos países desenvolvidos. Os países da Europa, Oceânia, América do Norte e Ásia foram os que apresentaram maior incidência de cancro. Em 2012, Portugal, encontrava-se no 36.º lugar, com 246,2 casos diagnosticados por 100000 habitantes.(4)

O cancro constitui, deste modo, um enorme desafio para a ciência.(5)

1.2.O que é o cancro?

Cancro é um termo usado para designar um grupo de doenças em que as células se dividem sem controlo e podem invadir outros tecidos do corpo, através do sistema linfático e sanguíneo. Uma das principais características do cancro é a rápida criação de células anormais que crescem para além dos limites habituais e que podem invadir as partes do corpo adjacentes, podendo difundir-se para os outros órgãos. Este processo é designado por metástase e é a maior causa de morte associada ao cancro. Existem mais de cem tipos de cancro. (1,6) É uma doença genética, que se desenvolve quando ocorre lesão da informação presente no ácido desoxirribonucleico (DNA) celular, que está presente em todas as células e que controla todas as funções celulares. Em consequência disto, os genes que controlam as funções celulares normais, como o crescimento, sobrevivência e propagação, são intensificados, e os genes que suprimem estes efeitos são reprimidos. Apesar de haver uma contribuição de alterações não mutagénicas (epigenéticas), a acumulação de mutações é o principal mecanismo responsável pela ocorrência de danos no material genético.(7,8) Quando o material genético das células normais é danificado, a célula repara o erro ou morre. Nas células cancerígenas, o DNA lesado não é reparado e a célula não morre como deveria, originando novas células de que o corpo não necessita e que possuem o mesmo erro genético que a célula inicial.(9) Nestas células, a expressão de genes anormais gera alterações nos processos biológicos fundamentais, que caracterizam o cancro. (7)

Assim, assegurar a correta realização da replicação do DNA é fundamental para preservar a integridade do genoma e a reparação de lesões do DNA é essencial para manter a fidelidade da replicação. (9)

1.3.O desenvolvimento do Cancro

A transformação de uma célula normal em cancerígena é um processo que envolve vários passos, que vão desde uma lesão pré-cancerosa a um tumor maligno. Estas alterações resultam da interação entre fatores genéticos e os agentes externos, físicos, químicos e biológicos. A idade é um outro fator fundamental para o desenvolvimento do cancro.(6) Deste modo, acredita-se que o cancro tem que ter um período de latência longo e devem existir estadios múltiplos no processo de carcinogénese, sendo necessário muito

tempo para o cancro se desenvolver e se detetar a neoplasia. Durante o processo de desenvolvimento, o cancro passa por vários estádios, o que indica que durante a evolução da doença ocorrem mudanças sequenciais. A genética é a principal responsável pelo aparecimento da doença, mas numa fase mais avançada são os fatores ambientais que completam o processo de carcinogénese. Estes últimos fatores podem ser controláveis e, por isso, têm sido de especial interesse na prevenção do cancro. (10)

Uma vez que o cancro ainda não tem cura, várias hipóteses ou teorias relativas à sua génese têm sido propostas desde o início do último século. As teorias atuais consideram que o cancro é consequência da proliferação descontrolada a partir de uma célula somática, que resulta da acumulação progressiva de mutações que ocorrem ao acaso em genes essenciais para o controlo do crescimento e diferenciação celular. A teoria da vigilância imunológica tem um papel adjuvante na teoria da mutação, uma vez que um tumor poderá formar-se quando uma mutação escapa à vigilância imunológica. No entanto, várias contradições relativas à teoria da mutação têm sido reportadas.(10)

1.4.Causas do Cancro

O processo de transformação de uma célula normal numa célula cancerígena compreende várias etapas e pode iniciar-se em qualquer tipo de tecido do corpo. Tal como muitas outras doenças, o cancro tem uma origem multifatorial, o que sugere a contribuição de vários fatores para o seu desenvolvimento e a inexistência de uma causa específica para um determinado tipo de cancro. (8,11–13)

Muitas vezes o cancro pode ser hereditário (5-10%) e resulta de um gene anormal que é transmitido à descendência, o que faz com que a incidência de cancro numa família seja elevada.(14,15) Muitos indivíduos também possuem genes que, não sendo muito importantes para desenvolver cancro, aumentam um pouco o seu risco.(14) No entanto, ao longo da vida, há a possibilidade dos genes saudáveis sofrerem mutações e serem alterados, tornando as células que os possuem cancerosas. Cancros diferentes possuem diferente número de processos de mutação.(16) Estas mutações podem ser causadas pelo fumo do cigarro, radiação, hormonas e dieta (10). A idade também parece ser um fator crucial para o desenvolvimento do cancro, uma vez que, ao longo dos anos, há uma acumulação da exposição a estes fatores de risco, e consequentemente um aumento da ocorrência de mutações, que é conjugado com uma diminuição da efetividade dos mecanismos de reparação celular. Estas alterações podem ocorrer por acidente, quando a

célula se está a dividir, ou porque a célula sofreu alguma lesão que passou durante o processo de divisão, para a célula da descendência.(14)

Indivíduos que foram sujeitos a transplante de órgãos e que tomam fármacos que suprimem o seu sistema imunitário, indivíduos com o vírus da Imunodeficiência Humana ou pessoas possuidoras de síndromes que afetam o sistema imunitário, apresentam problemas no seu mecanismo de defesa e estão mais predispostos à ocorrência de certos tipos de cancro, como os linfomas e aqueles que são causados por vírus como o caso do cancro cervical, cancro do fígado e cancro do estômago. As infeções crónicas ou os órgãos transplantados induzem continuamente a divisão celular, o que leva a ocorrência de mutações nas células imunitárias e ao seu desenvolvimento em linfoma. (14)

Na última década, as mudanças rápidas e significativas, observadas na incidência do cancro, têm sido atribuídas a alterações bruscas na exposição da população aos fatores ambientais, sendo estes referidos como os principais responsáveis pelo aparecimento do cancro em vários estudos epidemiológicos. Os fatores ambientais incluem todos os fatores não genéticos, que não são controlados pelos indivíduos e que não dependem das suas escolhas. Deste modo, estão neles incluídos o estilo de vida, fumo do tabaco, agentes biológicos como o vírus do Papiloma Humano (VPH), medicamentos, alimentação, fatores geofísicos e exposição aos fatores de risco resultante da atividade laboral. (17)

Os vírus e as bactérias são agentes que podem ajudar a originar alguns cancros, uma vez que vão causar alterações genéticas nas células, fazendo com que estas se tornem cancerígenas. Os vírus estão associados à ocorrência de certos cancros, como o cancro cervical (Vírus do Papiloma Humano), o cancro do fígado (vírus da hepatite B e C) e o linfoma (vírus Epstein-Barr). No entanto o vírus só causa o cancro em certas situações, existindo muitas pessoas infetadas por vírus capazes de originar cancro, mas que nunca o desenvolvem. Algumas bactérias também estão correlacionadas com o surgimento do cancro, como é o caso de *Helicobacter pylori*. (8,18,19) Existem mais de 200 tipos de cancro em humanos, que parecem ser causados, de forma aleatória, por acidentes inevitáveis da Natureza, e que ocorrem com frequências comparáveis em várias populações. Contudo, este padrão constante de alguns cancros tem vindo a ser influenciado por outros fatores que, em certas populações, aumenta de forma abrupta a ocorrência de novos casos. Os fatores contribuintes com mais peso são os genéticos e os ambientais, que conduzem a uma variabilidade na incidência do cancro de país para país.

Diferentes populações apresentam diferentes frequências de alelos suscetíveis para o desenvolvimento da doença, não sendo este facto explicativo das diferenças observadas, o que leva a deduzir que os fatores ambientais têm um enorme peso no risco de aparecimento da doença.(5) Nos países pouco desenvolvidos e em vias de desenvolvimento o álcool, o fumo do tabaco e o baixo consumo de vegetais e fruta são os principais fatores de risco responsáveis pela morte causada pelo cancro, enquanto que, nos países desenvolvidos, o álcool, o fumo do tabaco, o excesso de peso e a obesidade lideram.(19) Assim, torna-se fundamental a adoção de estilos de vida saudáveis, uma vez que esta medida pode eliminar 2,8 milhões de casos de cancro em todo o Mundo.(20)

No quadro I-1 encontram-se listados alguns fatores de risco ambientais e outros relacionados com o estilo de vida, bem como os diferentes tipos de cancro a eles associados, num projeto elaborado pela Organização Mundial de Saúde com o objetivo de avaliar o impacto dos fatores de risco, que podem ser evitados, na mortalidade. (19)

Quadro I-1: Fatores de risco que contribuem para o aparecimento do cancro, tipos de cancro associados e idade dos grupos afetados adaptado de Danaei et al., 2005 (19).

Fatores de risco	Tipos de cancro (idade grupos afetados)
Dieta e inatividade física	
Excesso de peso e obesidade	Cancro do colo do útero; cancro colorretal (≥ 30 anos); Cancro da mama pós-menopausa (≥ 45 anos)
Baixa ingestão de vegetais e fruta	Cancro colorretal, cancro do estômago, cancro do pulmão, cancro do esôfago (≥ 15 anos)
Inatividade física	Cancro mama; Cancro colorretal (≥ 15 anos)
Vícios	
Tabaco	Cancro do pulmão, boca e orofaringe; cancro do esôfago; cancro do estômago; cancro do fígado; cancro do pâncreas; cancro do cervix do útero; cancro da bexiga, leucemia
Álcool	Cancro do fígado, boca e orofaringe, cancro mama, cancro do esôfago, outros cancros (≥ 15 anos)
Saúde sexual e reprodutiva	
Sexo não seguro	Cancro do colo do útero
Riscos ambientais	
Poluição do ar ambiental	Cancro do pulmão (≥ 30 anos)
Inalação de vapores de combustíveis devido a nível laboral	Cancro do pulmão (≥ 30 anos)
Outros riscos	
Injeções contaminadas nos cuidados de saúde com hepatite B e hepatite C	Cancro do fígado

As alterações observadas na mortalidade causada pelo cancro, têm sido conduzidas por modificações na exposição aos fatores de risco e pela realização de um rastreio e tratamento adequados. (18)

1.5. Características das células cancerígenas

Existem seis alterações chave, que ocorrem nas células cancerígenas e que são responsáveis pelo comportamento maligno: as células tumorais tornam-se independentes face ao fator de crescimento (crescimento automático), mostram-se resistentes aos sinais supressores de crescimento, deixam de sofrer apoptose e mantêm o seu potencial de replicação, angiogénese e invasão/metástase, ao escaparem ao sistema imunitário. A incapacidade das células em adquirir estas alterações limita o seu desenvolvimento maligno, tendo a reprogramação do metabolismo energético e a destruição do sistema imunitário, bem como a inflamação e a instabilidade genómica, influência nessa conduta. (7,21)

O desenvolvimento de terapêuticas farmacológicas que tenham como alvo de atuação pelo menos um destes mecanismos-chave, contribui para o tratamento efetivo do cancro e evita a disseminação das neoplasias malignas.(21)

1.5.1. Independência do fator de crescimento

Fatores de crescimento são proteínas presentes em baixa concentração nos tecidos mas que têm um papel importante no controlo do crescimento celular. São responsáveis por controlar o crescimento, a diferenciação e a sobrevivência, funções essenciais para a célula.(21)

Em tecidos normais, a ativação dos recetores dos fatores de crescimento é rigorosamente controlada, assim como a síntese e libertação dos ligandos que os estimulam. As células cancerígenas modificam o funcionamento das vias de sinalização dos fatores de crescimento, através da produção e libertação de fatores de crescimento que estimulam os seus próprios recetores ou os das células vizinhas, alterando o número, estrutura e função destes recetores presentes na sua superfície, o que faz com que a frequência com que um sinal de crescimento chega ao núcleo aumente, mesmo na ausência do ligando, e desregulam a jusante a via do recetor de fator de crescimento, o que faz com que esta esteja permanentemente ativada.(7)

O fator de crescimento de transformação β (TGF- β) é um agente anticancerígeno potente, uma vez que controla e previne a proliferação autónoma das células epiteliais, endoteliais e hematopoiéticas, induzindo a paragem do ciclo celular, e/ou estimulando a diferenciação ou apoptose, dependendo do contexto celular.(21) Também apresenta um papel importante na ativação e resolução das fases da angiogénese e afeta a produção de matriz extracelular e a remodelação dos microambientes das células endoteliais, o que contribui para que tenha impacto nas interações e comunicação entre as células endoteliais e as células do mesênquima que as suportam.(21)

1.5.2. Insensibilidade aos sinais supressores de crescimento

Alguns sinais normais, supressores de crescimento, neutralizam os sinais de indução de crescimento. Estes atuam mantendo as células no estado de repouso, fase G0 do ciclo celular, ou induzindo a sua diferenciação final, fazendo com que estas percam a capacidade de entrar novamente no ciclo celular. (21)

A capacidade das células pré-neoplásicas adquirirem resistência à paragem do ciclo celular é a principal causa de desenvolvimento de muitos dos cancros humanos. Como consequência, ocorre um descontrolo das vias que coordenam as funções biológicas essenciais, como o crescimento, a apoptose, a invasão e a reparação do DNA lesado, o que contribui para o aparecimento de tumores malignos. Esta resistência pode estar associada a anomalias genéticas e epigenéticas nos fatores de crescimento, que são muitas vezes hereditárias, estando os indivíduos que as possuem mais predispostos ao desenvolvimento de cancro. (7,21)

As células cancerígenas apresentam, com frequência, anormalidades nas vias de inibição de crescimento, o que contribui para que estas progridam no ciclo celular.(7)

1.5.3. Imortalidade celular: Resistência ao estímulo apoptótico

Os telómeros são nucleoproteínas complexas, encontradas nas extremidades dos cromossomas eucariotas, formadas por DNA de cadeia dupla associado a proteínas que mantêm a integridade e estabilidade dos cromossomas. (21)

À medida que a célula se replica os telómeros tornam-se cada vez mais curtos, o que faz com que estes funcionem como um relógio molecular que faz a contagem decrescente do tempo de vida restante da célula. Como consequência, as células somáticas

normais apenas são capazes de sofrer um número finito de divisões celulares antes de entrarem em senescência celular, fase G1 do ciclo celular. (7)

As células malignas têm a capacidade de se tornar imortais, através de um processo que envolve a reativação da atividade de transcriptase reversa do enzima telomerase humana (hTERT) e, em consequência da sua atividade, o alongamento dos telómeros dos cromossomas.(21) A integridade celular é prolongada e os cromossomas protegidos da degradação.(22) Nas células somáticas normais, a expressão do componente hTERT da telomerase é silenciada e não é detetada. Deste modo, em cada ciclo celular ocorre degradação dos telómeros, o que conduz à senescência celular e apoptose. Estes acontecimentos, atuam de modo organizado no sentido de regular o crescimento e sobrevivência celular e, assim, impedir a formação de tumores.(21) Nas células cancerígenas ocorre reiniciação e ativação da atividade da telomerase e aquisição de imortalidade celular. Esta alteração é a deficiência mais comum apresentada pelas células tumorais e é usada como marcador para diagnóstico de cancro.(22)

1.5.4. Invasão e Metástase

Na grande maioria dos casos de cancro, a principal causa de morbilidade e mortalidade é a formação de metástases por células cancerígenas. A capacidade de metástase de alguns tumores malignos é responsável por cerca de 90% das mortes.(7) Este tipo de tumores apresenta a capacidade de metastizar, ou seja, as células tumorais têm a capacidade de deixar o seu tecido de origem e disseminar, através do sangue e vasos linfáticos, colonizando outros tecidos normais anatomicamente distantes, onde se instalam e crescem. Este processo, complexo e seletivo, não é característico de todas as células cancerígenas, dependendo das suas propriedades intrínsecas e de fatores que derivam do microambiente onde estas se encontram.(23)

Um dos pontos-chave que permite a invasão e metástase dos tumores epiteliais é a transição epitélio-mesênquima, em que as células epiteliais, imóveis e polarizadas, sofrem uma transdiferenciação, tornando-se células mesenquimais, móveis e apolares formando uma subpopulação no tumor que é responsável pela iniciação, crescimento invasivo e possível disseminação para órgãos mais distantes. Apesar de apresentar um papel fulcral na morfogénese e reparação dos tecidos normais, a sua iniciação de forma inapropriada pode despoletar o desenvolvimento de doenças, entre elas a inflamação crónica, artrite reumatoide e fibrose crónica dos pulmões, fígado e rins.(7,21,24)

Também o sistema imunitário tem um papel fundamental nestes processos. O aparecimento dos tumores está associado a uma falha do sistema imunitário, que deixa de reconhecer, rejeitar e destruir as células tumorais, que apresentam antígenos alterados.(7,25) Os mecanismos pelos quais as células tumorais evadem o controlo realizado pelo sistema imunitário implicam a diminuição da imunogenicidade das células tumorais, em que deixa de ser possível obter uma resposta imune forte, e a resistência das células tumorais à apoptose.(26) Esta incapacidade de o sistema imunitário controlar o crescimento do tumor é uma característica chave do cancro. (7,25,27) A supressão crónica do sistema imune está associada a uma exacerbação do aparecimento de cancros específicos, principalmente aqueles que são provocados por vírus.(7)

1.5.5. Angiogénese

Os organismos multicelulares para assegurarem o seu crescimento, necessitam que novos vasos sanguíneos se formem por vasculogénese ou angiogénese. A angiogénese é um processo fisiológico normal em que novos vasos sanguíneos se desenvolvem a partir de uma rede vascular primitiva já existente. Este é essencial para o desenvolvimento embrionário, cicatrização de feridas e ciclo de reprodução feminino. (21,28) Nos tecidos normais, ocorre como resultado de um balanço rigoroso e definido entre sinais positivos (pro-angiogénicos) e negativos (anti-angiogénicos), sendo ou não favorecido conforme o balanço existente. Os sinais que desencadeiam este processo são vários, entre eles o stress metabólico, como por exemplo baixa pressão de oxigénio, valores de pH baixos ou hipoglicemia; o stress mecânico provocado pela pressão gerada pelas células proliferativas; a resposta inflamatória/imunológica, em que as células inflamatórias e imunológicas se infiltram no tecido; e as mutações genéticas, como a ativação de oncogenes ou a inativação de genes supressores de tumores que controlam a produção dos fatores reguladores da angiogénese.(29)

A angiogénese tumoral contorna a limitação do crescimento tumoral, resultante de uma deficiente difusão de nutrientes para o microambiente do tumor, ao contribuir para o desenvolvimento de neoplasias com um eficiente aporte de nutrientes, e ao garantir uma via que permite a disseminação metastática do tumor.(21)

1.5.6. Reprogramação do metabolismo energético

Durante a transformação das células normais em células cancerígenas, um dos principais processos afetados é o metabolismo energético das células. A reconfiguração que ocorre determina a proliferação ou a morte das mesmas.(30)

Nas células saudáveis, a fosforilação oxidativa garante as necessidades energéticas, sendo a glucose a principal fonte de energia. (25,31) A fermentação ou glicólise anaeróbia é menos eficaz na produção de ATP (trifosfato de adenosina). (25,30)

As células cancerígenas alteram o seu metabolismo, que passa a ser diferente do observado nas células normais diferenciadas, para conseguirem suportar a sua proliferação exacerbada e para aumentarem a capacidade de síntese de substratos para as membranas celulares, ácidos nucleicos e proteínas. Deste modo, muitas destas células passam a transformar a glicose, usando a via da glicólise anaeróbia, mesmo na presença de grandes quantidades de oxigênio. Normalmente, estas células apresentam níveis de glicólise aumentados, com muito piruvato a ser convertido em lactato, em vez de entrar na mitocôndria e ser convertido em acetil coenzima-A. Este processo garante apenas uma pequena fração de ATP, mas garante uma produção mais rápida de energia, o que torna este mecanismo mais eficiente no aumento da biossíntese necessária para a rápida proliferação celular, uma vez que o lactato excretado pelas células pode ser utilizado quer para a produção de ATP, quer para a produção de precursores macromoleculares importantes para a biossíntese, permitindo um aumento mais rápido da velocidade de divisão celular, ao assegurar níveis mais elevados de anabolismo de DNA, proteínas e lípidos.(30,31) Também nas células cancerígenas é observado um aumento do metabolismo do aminoácido glutamina, que assegura a formação de precursores para a síntese de nucleótidos, proteínas e unidades de carbono para o ciclo de Krebs.(31)

Estas alterações metabólicas são provocadas pela ocorrência de mutações em oncogenes específicos e em genes supressores de tumores, sendo um princípio importante para a biologia do cancro e uma característica do cancro.(7)

2. Terapias existentes no combate ao cancro

Apesar de se ter assistido a alguns avanços no tratamento de alguns cancros específicos, as intervenções terapêuticas até agora apresentadas não se têm mostrado tão efetivas como as que se encontram disponíveis para a cura de outras doenças crónicas, uma vez que a sua contribuição para a redução da mortalidade se mostra pouco

significativa.(18) Tendo em conta, estes factos, torna-se necessária a pesquisa/investigação de novos tratamentos que se mostrem eficazes no combate ao cancro, para que a resolução deste problema de Saúde Pública fique mais próxima.

A terapia usada no tratamento do cancro requer cuidado na seleção de uma ou mais intervenções, sendo a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia as estratégias mais utilizadas.(32) O objetivo é tratar a doença, ou controlar os seus sintomas, potenciar a qualidade de vida, aumentar o intervalo de tempo sem recorrência da doença e o tempo de vida dos doentes. Contudo, a capacidade de atingir estas metas depende do estadió de desenvolvimento em que se encontra um cancro específico. Se o cancro é localizado e não apresenta evidências de metástases, o tratamento implementado visa a eliminação do cancro e, conseqüentemente, a cura do doente. Caso contrário, se o cancro se espalhou para outro local do corpo e se encontra numa fase avançada, o importante é a execução de um tratamento paliativo.(33,34) Aquando da metastização do tumor, a terapia sistémica é a principal modalidade terapêutica, uma vez que, quando no interior do corpo, através dos vasos sanguíneos permite, o acesso dos agentes terapêuticos aos vários locais para os quais o cancro se disseminou. Este tipo de terapia inclui a quimioterapia, a terapia dirigida e a terapia hormonal.(35) A seleção da terapêutica instituída para cada doente deve ser específica e não generalizada. Por isso, para além do tipo e da extensão do cancro, é necessário ter em conta as condições de cada doente e a presença de outras doenças.(8) Também é importante considerar o estado psicológico e as condições sociais de cada doente. (32)

2.1. Cirurgia

A cirurgia é o tratamento que se mostra mais eficaz na cura de cancros que estão confinados apenas a uma área restrita do corpo e que estão associados aos vasos linfáticos dessa região, ou seja, que não se encontram metastizados. Assim, quanto mais cedo for detetado o cancro mais fácil se torna removê-lo.(35) Esta é definida como a modalidade terapêutica mais antiga, altamente complexa e especializada, aplicada no tratamento do cancro e que constitui um dos grandes pilares no tratamento de doentes que possuem cancros sólidos.(32) Por isso, é aquela que, normalmente, é usada em primeiro lugar, na sequência das terapias aplicadas. A cirurgia garante a remoção no tumor das células cancerígenas imunossupressoras, o que faz com que o sistema imunitário consiga destruir as micro-metástases que não apresentam sintomas de existência e, conseqüentemente,

promover a cura de doentes com metástases distantes.(36) A sua combinação com outras terapias, numa fase anterior (terapias neoadjuvantes) ou posterior (terapias adjuvantes), tem contribuído para o aumento do tempo sem ressurgimento da doença e para o aumento do número de anos de vida dos doentes, uma vez que a cirurgia permite a remoção de cerca de 100% das células cancerígenas e os tratamentos não cirúrgicos concomitantes contribuem para a eliminação das células tumorais residuais que ainda se encontrem presentes.(36) No entanto, a aplicação da radioterapia e quimioterapia previamente ao procedimento cirúrgico também apresenta resultados promissores, porque contribui para a diminuição da massa tumoral ao destruir as células cancerígenas que são sensíveis a estes tratamentos. Deste modo, torna-se mais fácil a remoção do tumor e garante-se a manutenção do tecido/função do órgão onde a neoplasia está presente.(36) O uso concomitante da quimioterapia tem vindo a aumentar no cancro da mama e no cancro gastrointestinal e do pulmão (35,37,38), assim como o uso da radioterapia, no cancro colorretal (38,39) e o uso conjugado destes tratamentos adjuvantes, no cancro do esófago.(38,40,41)

A cirurgia também mostra ter um papel importante no diagnóstico e deteção da distribuição do tumor, nos cuidados paliativos (38) e na profilaxia, no cancro da mama (42)

2.1.1. Riscos e efeitos secundários da cirurgia

A cirurgia apresenta alguns riscos, quer durante, quer após a sua realização, que aumentam com a sua complexidade.(43,44) A ocorrência de infeções no local da intervenção e de efeitos secundários inerentes à anestesia utilizada, são algumas das complicações que podem advir das cirurgias mais simples, sendo que a dor no local da intervenção é o problema mais comum. No que concerne às cirurgias mais complexas, apesar dos riscos implicados serem pouco comuns, são superiores, e incluem a ocorrência de hemorragia, o que pode levar à necessidade de realização de uma transfusão sanguínea durante o processo. Os órgãos e vasos sanguíneos que se encontrem perto do local da intervenção podem sofrer lesões. Após a cirurgia é possível a ocorrência de hemorragias internas e externas e a formação de trombos nas veias das pernas e alterações no funcionamento dos intestinos, em pessoas que permanecem em repouso após a cirurgia.(44) Dependendo da cirurgia realizada a cada tipo de cancro, existem efeitos secundários específicos.(43)

Associado às complicações que podem advir da cirurgia, acresce ainda a necessidade de internamento do doente no hospital e a limitação da sua alimentação e atividade física. (44)

2.2.Radioterapia

Depois da cirurgia, a radioterapia constitui o principal tratamento curativo utilizado no combate ao cancro e é aplicada em mais de metade dos doentes, sendo a cirurgia preterida em cancros que podem ser curados de ambas as formas, pois a radioterapia preserva a função dos órgãos.(45) A duração deste tratamento depende da localização, do tamanho e do tipo de tumor.(45,46) A radioterapia implica o uso de radiação de elevada energia, normalmente raios X, e pode ser administrada através de uma máquina externa ao corpo, o que permite tratar grandes áreas e mais do que uma região do corpo, ou através de material radioativo que é colocado no interior do corpo junto das células que se pretende eliminar (braquiterapia), onde se inclui a radioembolização, que é aplicada exclusivamente no cancro do fígado quando este não pode ser removido cirurgicamente. (47,48) A radioterapia sistémica usa substâncias radioativas, radiofármacos, que são fármacos que contêm materiais radioativos chamados radioisótopos que, quando no interior do corpo, se distribuem para diferentes locais, tratando ou aliviando os sintomas da doença.(45,48–50) Esta terapia pode ser administrada ao doente por via intravenosa (i.v) ou oralmente, e quando no interior da corrente sanguínea, vai permitir a morte das células cancerígenas. Este tratamento pode também ser utilizado para a diminuição da dor local, que ocorre muitas vezes nas metástases ósseas e hemoptise que advêm do cancro do pulmão.(46)

A radiação aplicada provoca a morte celular, por induzir lesão no material genético das células, ao provocar a quebra de uma ou mais cadeias de DNA. Consequentemente, os genes que controlam a divisão e o crescimento celular são afetados, o que faz com que as células não consigam crescer nem dividir-se. Verifica-se assim um atraso na divisão celular, com o aparecimento de algumas anormalidades cromossómicas que se tornam evidentes, e suficientes para parar a divisão celular.(45,46) Assim, a capacidade das células para formar colónias diminui e, ocorre a morte das células tumorais, o que contribui para a redução da massa tumoral.(45,46,48) As lesões provocadas podem ser parcialmente ou totalmente reparadas, podendo ocorrer de forma

direta ou através da formação de partículas carregadas (iões) ou de radicais livres que exercem esse efeito.(48)

A quantidade e o tipo de radiação que atinge as células, bem como a velocidade de crescimento da célula são fatores que influenciam a lesão e a morte celular provocadas pela radioterapia, uma vez que esta mostra ter um efeito mais significativo sobre as células que se dividem de forma rápida e constante, sendo a sua ação pouco evidente nas células que se encontram na fase de repouso do ciclo celular (G₀). As células cancerígenas, por apresentarem uma divisão celular descontrolada, são aquelas que mais sofrem o efeito do tratamento. Contudo, células normais que constituem tecidos que se dividem rapidamente, como a pele, revestimento dos intestinos e a matriz óssea, também são afetadas, o que provoca o aparecimento de efeitos secundários não desejados, apesar destas possuírem uma maior capacidade de reparar as lesões nelas induzidas.(45,47) Deste modo é essencial que esta terapia seja aplicada tendo em consideração o balanço entre as células cancerígenas afetadas e a minimização das lesões efetuadas nas células normais do corpo. (45)

Para reduzir os efeitos nas células normais, a radioterapia é administrada em frações, ou seja, os doentes são sujeitos a baixas doses de radiação durante o tratamento para que as células saudáveis sejam capazes de recuperar.(46,48) A resposta dos tecidos, quer dos normais quer dos malignos, a esta radioterapia fracionada, é influenciada pela capacidade de reparação da lesão provocada entre os tratamentos, que depende de diferentes fatores: (i) da fase do ciclo celular em que as células se encontram. Em diferentes tempos de aplicação do tratamento é possível atingir células que anteriormente se encontravam numa fase do ciclo menos sensível à radiação; (ii) da renovação celular que ocorre durante o tratamento; (iii) da oxigenação dos tecidos tratados. Tecidos em hipoxia apresentam uma menor resposta; (iv) da sensibilidade intrínseca das células à radioterapia. Os tecidos linfoides, por exemplo, apresentam uma maior sensibilidade, face aos melanomas malignos e sarcomas, que são mais resistentes.(46)

Este tratamento é usado para curar e limitar o tamanho da neoplasia e/ou evitar a recorrência da doença. Uma vez que muitos cancros são sensíveis à radiação, esta é aplicada para provocar a eliminação ou diminuição do volume do tumor e pode ser administrada antes da cirurgia, como tratamento neoadjuvante, para facilitar a remoção do tumor, ou após a cirurgia, como tratamento adjuvante, na tentativa de eliminar

quaisquer células tumorais que permaneçam no corpo após a cirurgia e assim evitar o reaparecimento da doença. (45,47) Nas situações em que há a possibilidade de o cancro se disseminar para outras regiões do corpo a radiação é utilizada como medida preventiva, de forma a evitar o desenvolvimento de futuros tumores.(45)

No tratamento de alguns cancros, têm-se tornado habituais as terapias que conjugam a radioterapia com a cirurgia e a quimioterapia. A quimioterapia atua em alguns tipos de cancro, tornando-os mais sensíveis à radiação aplicada, o que aumenta a eficácia do tratamento. A desvantagem que advém desta combinação é o aumento dos efeitos secundários e o facto de nem todos os agentes citotóxicos poderem ser utilizados nesta combinação.(46) Consoante o tipo de cancro em tratamento, a radioterapia pode ser instituída anteriormente ou posteriormente à quimioterapia.(45)

2.2.1. Riscos e efeitos secundários da radioterapia

A radioterapia é um tratamento que não destrói apenas as células cancerígenas, na área do corpo onde esta é administrada. A sua aplicação implica o aparecimento de lesões e a morte de algumas células normais, que se encontram em redor dessa área, e ao aparecimento de efeitos secundários. Diferentes indivíduos, com diferentes tipos de tumor, sujeitos a esta terapia, vão reagir de forma diferente, o que leva a diferenças na gravidade dos efeitos secundários. Os efeitos secundários podem desenvolver-se no decorrer do tratamento ou num curto espaço de tempo após a radioterapia, quando as células normais se dividem rapidamente e são lesadas, ou meses/anos após o tratamento.(48)

Os efeitos secundários mais comuns no decorrer do tratamento são a fadiga, que pode ser explicada pelo efeito no organismo de substâncias produzidas pelo sistema imunitário e pelo decréscimo na quantidade de glóbulos vermelhos, que provoca anemia nos doentes, pela nutrição pouco equilibrada, pela situação de stress, depressão e por certos fármacos utilizados na quimioterapia ou esteroides. Alterações na pele também são frequentes. Este tratamento provoca a queda do cabelo, na área em que é administrado, e quando a radiação é aplicada na cabeça e pescoço leva a lesões nos dentes. (45,48)

A radioterapia sistémica direccionada a antigénios específicos pode levar ao desenvolvimento de reações alérgicas quando é aplicada pela primeira vez ao doente e pode provocar a diminuição do número de células sanguíneas, o que contribui para o aumento do risco de infeções, hemorragia ou hematoma.(45)

Os efeitos secundários que podem ocorrer mais tardiamente incluem o desenvolvimento de fibrose e pneumonia, no tratamento do cancro do pulmão; lesão dos intestinos com conseqüente inflamação, diarreia, hemorragia, limitação na capacidade de alimentação, náuseas e vômitos, aquando a aplicação de radiação no tórax e abdómen; perda de memória, associada ao tratamento do cancro da cabeça e infertilidade decorrente da administração nos testículos do homem e na zona pélvica da mulher.(45,48) Apesar da probabilidade ser baixa, uma das maiores complicações que advém deste tratamento, principalmente em crianças que sobreviveram a cancros e em indivíduos cujos cancros foram tratados, é a possível ocorrência de cancros secundários, cuja zona de aparecimento depende da parte do corpo sujeita à radiação.(48,51,52) O risco de desenvolvimento de uma neoplasia secundária é tanto maior quanto mais cedo ocorrer a exposição à radiação durante a vida ou durante períodos de rápido crescimento dos tecidos, como nos sarcomas ósseos, durante a adolescência. Contudo, as técnicas aplicadas têm melhorado ao longo dos anos, sendo a radioterapia administrada de forma mais precisa e as doses aplicadas escolhidas criteriosamente, o que tem contribuído para a redução deste problema.(45)

Além dos efeitos nefastos para o doente, esta terapia apresenta elevados custos, pois requer equipamentos complexos e o envolvimento de muitos profissionais de saúde. (45)

2.3. Quimioterapia

A quimioterapia consiste no uso de agentes químicos para o tratamento de qualquer doença. No caso do cancro, esta terapia envolve o uso de agentes citotóxicos com o objetivo de destruir as células cancerígenas.(52) Esta modalidade de tratamento atua nas células cancerígenas presentes em qualquer local do corpo. O seu uso a nível local tem vindo a ser mais explorado.(53) Hoje em dia são usados mais de 100 fármacos em quimioterapia do cancro, isolados (monoterapia) ou em combinação com outros fármacos (terapias de combinação) ou tratamentos, assumindo um papel fundamental na cura e no controlo de uma enorme variedade de neoplasias.(54,55) A quimioterapia mostra benefícios nos cancros da mama(53,56,57), colorretal(58,59) e dos pulmões(54,60), quando aplicada antes ou após a realização de cirurgia.

Quando aplicada antes da cirurgia ou radioterapia (tratamento neoadjuvante), o objetivo é tratar micrometástases e reduzir o tumor, o que faz com que a cirurgia seja menos agressiva, sendo mais fácil a remoção de todas as células cancerígenas, e se torne

possível a remoção de tumores locais anteriormente inoperáveis. A radioterapia, se necessária, passa a ser aplicada numa área mais restrita do corpo. A aplicação primária de quimioterapia mostra-se vantajosa em situações de osteossarcoma e cancro do esófago. (54) No entanto, para muitos cancros localizados, a cirurgia ou radioterapia são o melhor tratamento para ser aplicado em primeiro lugar e a quimioterapia é administrada posteriormente, como terapia adjuvante, em doentes com risco elevado de recorrência, pois, ao circular por todo o corpo, o agente citotóxico consegue atingir as células malignas que se difundiram para diferentes locais, o que aumenta a probabilidade de cura.(53)

A quimioterapia é influenciada pelo tipo de cancro e pelo estadio em que ele se encontra. Os tumores que se dividem rapidamente apresentam uma maior quimiossensibilidade. Este grau de sensibilidade aos fármacos administrados difere de tumor para tumor, o que faz com que a resposta à terapêutica difira entre eles. Cancros que são do mesmo tipo histológico também podem apresentar diferentes padrões de quimiossensibilidade e comportamento. Deste modo, o uso clínico de fármacos antineoplásicos deve ser ajustado ao indivíduo e às características da neoplasia.(61)

Para alguns tumores que mostram boa quimiossensibilidade aos fármacos citotóxicos este tratamento pode ser curativo, mesmo no caso de cancros volumosos ou que apresentam metástases. Contudo, a cura apenas é alcançada quando se utiliza uma quimioterapia combinada, que retarda o aparecimento de resistência por parte dos tumores aos fármacos. O regime de combinação implica a seleção de antineoplásicos que tenham uma atividade contra um determinado tipo de tumor quando usados isoladamente. A combinação deve acarretar uma toxicidade diminuta e permitir a redução do risco de lesão dos sistemas de órgãos. Os fármacos combinados devem apresentar modos de ação diferentes, contribuindo para um efeito sinérgico no combate ao tumor, devem possuir mecanismos de resistência distintos, evitando o aparecimento de resistência cruzada e devem ainda diferir na toxicidade provocada pela dose máxima tolerada. Além disto, os fármacos devem ser administrados na dose que garante o maior efeito e em intervalos repetidos e regulares.(54) A quimioterapia de combinação permite maximizar a morte celular, atuar em toda a população de células heterogêneas do tumor que desenvolveram resistência (maior espectro de ação) e retardar o desenvolvimento de resistência por parte das células aos novos fármacos. Seria impossível alcançar estes objetivos com apenas um agente antineoplásico.(62)

Quando a cura não é possível, o objetivo da sua aplicação visa controlar a doença, contribuindo para a diminuição do tamanho do tumor e/ou inibição do seu crescimento e disseminação. Nestas circunstâncias, o cancro é controlado e gerido como uma doença crónica. (52)

Em tumores que se encontram numa fase avançada, ou seja, que apresentam metástases sem possibilidade de controlo e cuja oportunidade de cura é nula, os fármacos antineoplásicos são administrados como tratamento paliativo. Pretende-se a redução da dimensão do tumor, a atenuação dos sintomas e, conseqüentemente, a melhoria da qualidade de vida dos doentes, prolongando a vida. Este tipo de tratamento é continuado apenas quando os doentes obtêm benefícios e a toxicidade é aceitável.(61)

Muitos fármacos citotóxicos só atuam em células que se encontram ativamente em divisão e alguns fármacos atuam especificamente em células que se encontram numa fase particular do ciclo celular. Assim, é importante descrever neste contexto o ciclo celular. Este envolve uma série de fases que tanto as células normais como as células cancerígenas atravessam para formar novas células, ou seja, em que se preparam para sofrer mitose. O ciclo celular compreende 5 fases: fase de repouso, em que a célula ainda não está preparada para se dividir (G0), fase em que a célula aumenta o seu tamanho e ocorre a produção de enzimas necessárias para a síntese de DNA, outras proteínas e RNA (G1), fase de síntese de DNA (S), período pré-mitótico (G2) e mitose (fase M). Todas as etapas conduzem à fase de repouso (G0), que corresponde ao ponto de partida. Nas fases anteriores à fase S, a taxa de síntese celular é elevada e a célula é preparada para entrar nesta fase, onde sinais específicos regulam o ciclo celular e permitem a replicação do genoma. Quando completa, a célula entra numa segunda fase de repouso (G2). Seguidamente sofre mitose e origina duas células filhas idênticas, que vão passar por este ciclo quando novas células forem necessárias.(52,62) Os fármacos antineoplásicos exercem o seu efeito por desregularem o ciclo celular, através de um ou mais processos, que incluem a perturbação de pontos de controlo, fatores de crescimento, recetores dos fatores de crescimento e sinais de transdução, o que causa a paragem ou atraso no crescimento das células tumorais e, por fim, apoptose.(54,61)

Estes fármacos induzem a morte celular por apoptose, interferindo diretamente no DNA, ou atuando nas proteínas chave responsáveis pela ocorrência da divisão celular normal. Contudo, também podem apresentar efeitos citotóxicos nas células que se

dividem normalmente, principalmente aquelas com uma elevada taxa de renovação, como a medula óssea e mucosas. (61)

Os agentes quimioterápicos podem ser classificados de acordo com a fase do ciclo celular em que são ativos, o que se torna útil para a programação e combinação da quimioterapia que pode trazer maior eficácia no tratamento (figura I-1).(61,62)

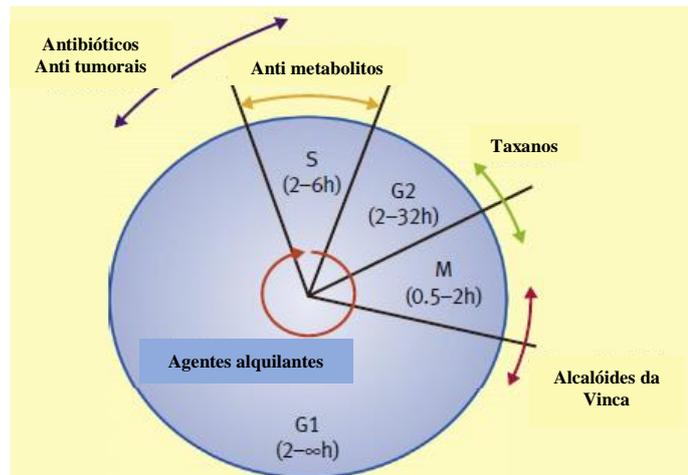


Figura I-1 :Diferentes fases do ciclo celular G1,S,G2 e M e respetiva duração que varia de acordo com o tipo e a taxa de crescimento da célula. A atividade óptima de diferentes classes de alguns agentes utilizados na quimioterapia do cancro nas diferentes fases do ciclo celular adaptado de Caley, A.et al.(61)

Os fármacos administrados na quimioterapia das neoplasias também podem ser classificados de acordo com o seu mecanismo de ação.(62) De acordo com esta classificação, as classes mais utilizadas na quimioterapia do cancro são os agentes alquilantes, os anti metabólitos, os antibióticos, os inibidores de topoisomerase, os inibidores de mitose e os corticosteroides. Os fármacos que pertencem a estas classes são designados por antineoplásicos tradicionais, interferindo diretamente com a mitose, a síntese de DNA e os mecanismos de reparação. Outras classes de agentes anti tumorais têm vindo a emergir desde 1990, em resultado dos avanços no conhecimento ao nível da biologia molecular e da genética do cancro, que revelaram vias de sinalização anormais nas células tumorais, envolvidas na proliferação e invasão celular ou em mecanismos de morte celular, e que rapidamente se revelaram possíveis alvos terapêuticos.(63) Estes avanços conduziram a outras abordagens terapêuticas, tais como terapias direcionadas, terapia hormonal, imunoterapia, agentes de diferenciação e terapia fotodinâmica.(52)

2.3.1. Agentes alquilantes

Os agentes alquilantes diminuem a função celular por transferirem grupos alquilo para macromoléculas que desempenham funções biológicas cruciais para a célula, através

da alquilação de grupos funcionais amina, carbonilo, tiol ou fosfato presentes nestas macromoléculas.(62) O DNA, o ácido ribonucleico (RNA) e as proteínas são os alvos mais favoráveis à alquilação, após a qual ocorre alteração de estrutura e de função.(61) No DNA, a alquilação ocorre preferencialmente no azoto em posição sete da guanina, de densidade eletrónica e caráter nucleofílico elevados. Esta reação pode conduzir à quebra de cadeias de DNA ou à ligação cruzada inter ou intracadeias. Estes são os principais determinantes da citotoxicidade destes compostos, uma vez que vão conduzir a apoptose e limitar a multiplicação celular.(54)(55)

Estes agentes exercem efeito em todas as fases do ciclo celular, inibindo a proliferação celular sem apresentarem qualquer especificidade. São aplicados no tratamento de cancros muito diferentes, incluindo leucemia, linfoma, linfoma de Hodgkin, mieloma múltiplo e sarcoma, assim como cancros do pulmão, mama e ovário. (55,62,64)

Os agentes alquilantes podem ser divididos em diferentes grupos, de acordo com as suas estruturas químicas e mecanismos de transferência do grupo alquilo. As mustardas azotadas, as nitrosoureas e os complexos de platina são classes bem conhecidas, mas existem outras que também atuam por alquilação.(61,62)

As mostardas azotadas como a Clormetina (Mustargen[®]), o Clorambucilo (Leukeran[®]), o Melfalano (Alkeran[®]), a Ciclofosfamida (CTX) (Endoxan[®]) e a Ifosfamida (Holoxan[®]), cujas estruturas químicas se encontram na figura I-2,(50) originam metabolitos no interior do organismo que são altamente reativos, resultantes de ciclização, com eliminação de cloreto.(62,64)

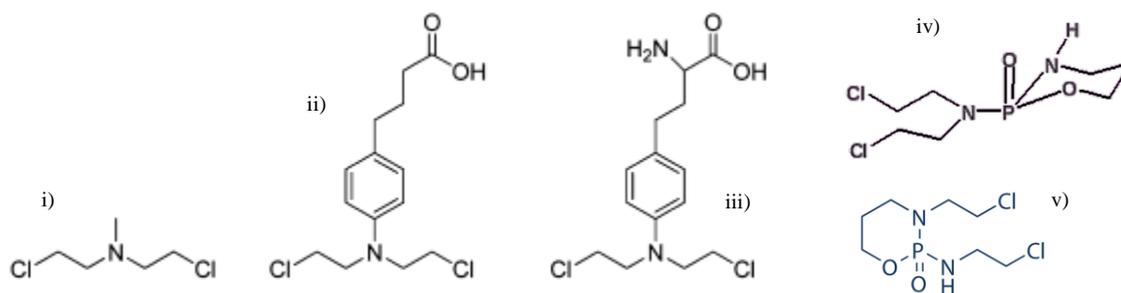


Figura I-2: Estrutura química das mustardas nitrogenadas. i) Clormetina; ii) Clorambucilo; iii) Melfalano; iv) ciclofosfamida ; v) ifosfamida. Adaptado de Polavarapu et al.(64)

Um destes metabolitos é um cátion aziridínio, um poderoso eletrófilo que sofre ataque por parte de um azoto nucleofílico da guanina do DNA, formando-se assim o primeiro produto alquilado. Uma

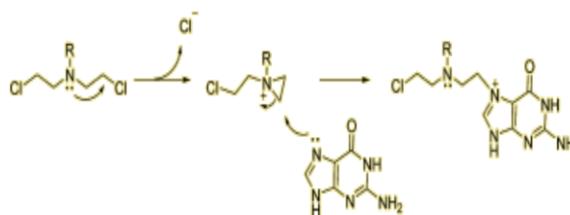


Figura I-3: Proposta de mecanismo de ação das mostardas nitrogenadas. Adaptado de Polavarapu et al.(64)

segunda alquilação conduz a formação de uma ligação cruzada intra- ou intercadeias de DNA. (62,64) (Figura I-3)

A CTX e a Ifosfamida são pró-fármacos que foram desenvolvidos na tentativa de contornar a elevada toxicidade associada aos agentes alquilantes, com perda de seletividade para o tumor. (64)

O sistema hematopoiético é especialmente suscetível a estes compostos, uma vez que, ao provocarem lesões no DNA, podem provocar danos na matriz óssea, a longo prazo. Em casos raros, podem conduzir ao desenvolvimento de leucemia aguda, que se manifesta alguns anos após o tratamento. Este efeito é dependente da dose administrada e, por isso, o risco é menor com doses mais pequenas.(55)

As Nitrosoureas incluem a Carmustina (Bicnu[®]) Lomustina (Cecenu[®]) e Estreptozocina (Zanosar[®]) (figura I-4).(50) Estes agentes apresentam alguma instabilidade química, decompondo-se, espontaneamente ou em presença de um aceitador de prótons, em dois intermediários reativos, um com atividade alquilante, outro com atividade como agente carbamoilante. O íon 2-cloroetil carbónio é um eletrófilo forte capaz de alquilar a guanina, citosina e adenina, e formar ligações intra ou intercadeias de DNA, de modo análogo às mostardas de uracilo. As ligações cruzadas que se geram na mesma cadeia de DNA, são associadas à citotoxicidade destes compostos. A Estreptozocina é a única nitrosourea que não contém o grupo 2-cloroetilnitrosourea. O outro intermediário reativo que resulta da degradação espontânea é um isocianato, agente reativo que conduz a carbamoilação, por exemplo de resíduos de lisina em proteínas, o que pode contribuir, por exemplo, para a inativação dos enzimas de reparação do DNA. (65)

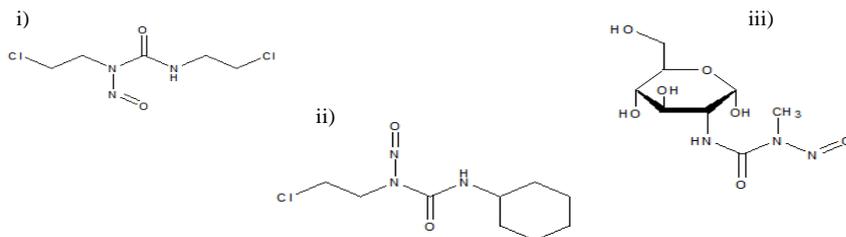


Figura I-4: Estrutura química das Nitrosoureas. i) Carmustina; ii) Lomustina; iii) Estreptozocina. (66)

As nitrosoureas, por possuírem uma natureza lipofílica, conseguem atravessar a barreira hematoencefálica, alcançando elevadas concentrações no sistema nervoso central, o que justifica a sua aplicação no tratamento dos tumores cerebrais. Também são usadas como tratamento secundário do linfoma de Hodgkin.(62)

Apesar de usadas frequentemente, a sua eficácia terapêutica é limitada devido ao desenvolvimento de resistência.(67)

O Bussulfano (Myleran[®], Busilvex[®]) (figura I-5)(50) é outro agente alquilante bifuncional que contém dois grupos abandonantes sulfato em cada extremidade da cadeia alquílica. Em meio aquoso, este composto

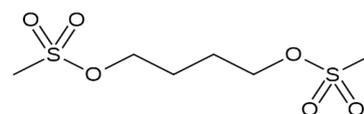


Figura I-5: Estrutura química do Bussulfano. Adaptado de Missailids et al.(67)

sofre hidrólise e formam-se iões carbónio capazes de alquilar o DNA. No interior do organismo, quando ativado, afeta principalmente os granulócitos, o que o torna útil quer no tratamento da leucemia mielóide crónica, quer no tratamento da leucemia, antes ou após o transplante de medula óssea, em conjugação com outros agentes quimioterápicos, como a CTX, sendo esta a sua principal aplicação terapêutica. A mielossupressão é um dos efeitos adversos que depende da dose instituída, manifestando-se através de leucopenia, trombocitopenia e, por vezes, anemia. Também pode ocorrer hiperpigmentação. Reações adversas raras como lesão do fígado, ginecomastia ou cataratas foram também reportadas. Quando administrado em doses elevadas pode originar convulsões e, em crianças e jovens, pode interferir com o desenvolvimento e função das gónadas.(67)

A Dacarbazina (Dacarbazina Medac[®], Deticene[®], Fauldetic[®])(50) e a Procarbazina (Natulan[®])(50) (figura I-6), são triazinas que também estão inseridas nesta classe de compostos. Para exercer a sua ação alquilante necessitam de ser primeiramente ativadas no fígado, num processo mediado pelo citocromo P450. Após a conversão, ocorre o bloqueio da síntese de proteínas, subsequente à lesão do DNA, RNA ou do RNA

de transferência. Ambas são usadas, principalmente, para tratar doentes com melanoma maligno, sarcoma dos tecidos moles e neuroblastoma. Nas crianças, em combinação com outros fármacos, conduzem a bons resultados na tentativa de cura do linfoma de Hodgkin. Estas triazinas têm como efeitos secundários comuns o aparecimento de infeções relacionado com a diminuição dos glóbulos brancos, anemia, diminuição do número de plaquetas, com subsequente possibilidade de hemorragia, e fotossensibilidade.(68) Outra triazina utilizada é a Temozolomida (Temodal[®])(50) que, em conjugação com a radioterapia, constitui o tratamento padrão dos tumores cerebrais (figura I-6). Contudo, este fármaco apresenta uma toxicidade hepática elevada, o que impõe limitações ao seu uso.(69)

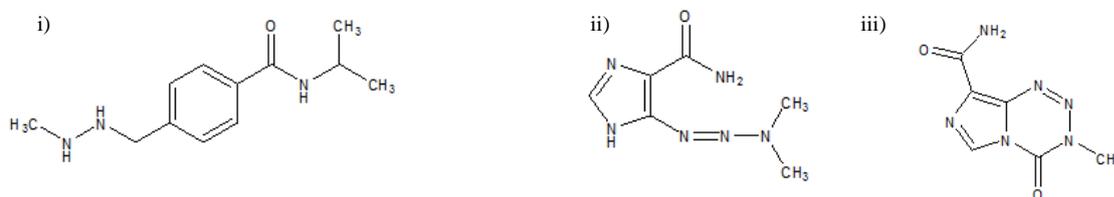


Figura I-6: Estrutura química das Triazinas. i) Procarbazina ii) Dacarbazina iii) Temozolomida .(66)

A alquilação realizada pelas Etileniminas, como a Tiotepa (Thiotepa Injection[®], Thiotepa Pharminvest Patrimonial[®])(50) e a Altretamina, (figura I-7) parece resultar de ataque nucleofílico com abertura dos anéis de aziridina, tal como ocorre no caso das mustardas nitrogenadas. As etileniminas têm na sua estrutura anéis de aziridina estáveis, análogos do ião intermediário reativo das mustardas nitrogenadas. Os baixos valores de pH característicos do ambiente tumoral provocam a protonação dos grupos aziridina, aumentando a reatividade destes compostos. Estes fármacos são administrados em quadros de cancro da mama, tumor cerebral, cancro do ovário, mieloma, linfoma de Hodgkin e não Hodgkin, leucemia e tumores das células germinativas.(55) A Altretamina tem uma menor toxicidade que outros agentes alquilantes, mas a sua atividade anti tumoral é baixa e apenas é aplicada em cancros recorrentes do ovário. (71)

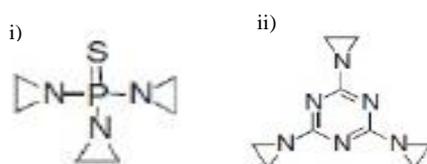


Figura I-7: Estrutura química das Etileniminas. i) Tiotepa; ii) Altretamina. (70)

Os complexos de platina incluem a cis-Pt (Faulplatin[®], Cisplatina[®])(50), a Carboplatina (CBP) (Carboplatina[®], Neolorin[®], Novoplatinum[®])(50) e a Oxalapatina (OXP) (figura I-8) e contribuem em grande parte para a terapêutica sistêmica de vários câncros, por constituírem uma das classes mais ativas de antineoplásicos. Estes, tal como os outros agentes alquilantes, conduzem a ligações entre cadeias de DNA ou entre grupos diferentes da mesma cadeia, o que conduz a alteração de estrutura e função, com consequente inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas.(62)

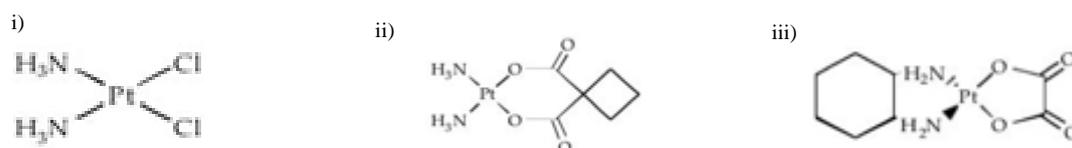


Figura I-8: Estrutura química dos complexos de Platina. i) cis-Pt; ii) CBP; iii) OXP. (66)

Devido à toxicidade da cis-Pt, foram sintetizados análogos com eficácia clínica semelhante, mas com menor toxicidade. A diminuição da toxicidade destes análogos está relacionada com a menor reatividade dos seus grupos abandonantes. A Oxaliplatina (OXP) é um sal divalente que apresenta um anel di-amino-ciclohexilo ligado à molécula de platina, que interfere com os mecanismos de resistência ao fármaco, alterando a capacidade de reparação dos adutos de DNA.(62)

O uso destes compostos foi aprovado para a terapia de muitos câncros e a sua capacidade de induzir o desenvolvimento de leucemia é menor do que a de outros agentes alquilantes. (52,53)

2.3.2. Antimetabolitos

Nos últimos anos, o conhecimento dos processos metabólicos que ocorrem a nível celular e de enzimas neles envolvidos tem aumentado, e com ele novos alvos terapêuticos têm sido identificados. Os fármacos que interagem com estes alvos são denominados anti metabolitos, por serem análogos estruturais das purinas, pirimidinas e de outros metabolitos normais, envolvidos na síntese das cadeias de DNA e RNA. Podem exercer o seu efeito ao competir com estes substratos naturais pelo sítio ativo ou de regulação de enzimas que sintetizam os ácidos nucleicos, ou ao serem incorporados nas cadeias de DNA e RNA.(54) Quando isto ocorre, a síntese de DNA e RNA termina, o que impede a proliferação celular.(72) Devido aos mecanismos de ação inerentes, esta classe de anticancerígenos apresenta uma maior atividade nas células que se encontram em fase S

do ciclo celular.(62) Esta classe de fármacos é normalmente usada no tratamento de cânceros da mama, ovário, trato intestinal, leucemias, entre outros e de doenças como a psoríase e artrite reumatoide, inibindo ou bloqueando os processos metabólicos normais que ocorrem nas células.(52)

Os anti metabolitos podem ser agrupados em análogos de folatos, análogos de purinas, análogos de adenosina, análogos de pirimidina e ureias substituídas. Nos análogos de folatos encontra-se um dos anti metabolitos mais antigos, o Metotrexato (Ledertrexato[®], Metotrexato[®],

Fauldexato[®])(50) (figura I-9) que, por ser semelhante ao ácido fólico presente no organismo, é responsável por inibir o enzima dihidrofolato redutase. Este enzima é responsável por catalisar a conversão do ácido fólico em

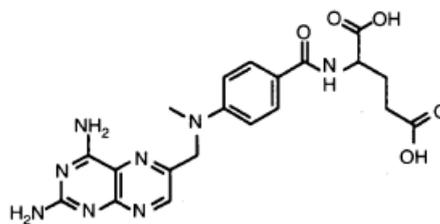


Figura I-9: Estrutura química do anti metabolito Metotrexato adaptado de Kaye et al.(72)

tetrahidrofolato, que é um co-fator importante em muitas reações metabólicas, incluindo as envolvidas na síntese de purinas e pirimidinas, o que compromete a síntese dos ácidos nucleicos. Este grupo apresenta toxicidade para as células que se dividem rapidamente, sendo a mielossupressão e a trombocitopenia, os efeitos indesejados mais comuns. (72)

Os análogos de purinas, Fludarabina (Fludara[®], Fludarabina[®])(50), Mercaptopurina (Puri-Nethol[®])(50), Tioguanina (Lanvis[®])(50); análogos de pirimidina, Capecitabina, Citarabina (Citaloxan[®], ARA-cell[®], Citarabina[®])(50), Floxuridina, 5-Fluorouracilo (Cinkef-U[®], Fluoro-Uracil[®], Fluorouracilo[®])(50), Gemcitabina (GEM) (Gemcitabina[®], Gemzar[®])(50); e os análogos de adenosina, como a Cladribina (Leustatin[®])(50) e a Pentostatina (Nipent[®])(50), são todos análogos de nucleósidos, que quando incorporados nas macromoléculas de ácidos nucleicos que estão a ser sintetizadas, interrompem o processo.(62)

As ureias substituídas usadas em terapia tumoral incluem a hidroxireia. Vários mecanismos de ação foram propostos para explicar a sua interferência na síntese de DNA, quer através da inibição da enzima ribonucleótido redutase, responsável pela conversão dos ribonucleótidos em desoxirribonucleótidos, quer por inibição da incorporação da timidina no DNA ou por provocar danos diretos no DNA.(73)

2.3.3. Antibióticos anti tumorais

Estudos epidemiológicos mostraram uma forte associação entre algumas bactérias, como o *Helicobacter pylori* e a *Salmonella typhi*, e o cancro. Deste modo, os antibióticos anti tumorais são usados na terapia de alguns tipos de cancro associados a infecções, como o cancro do estômago, o cancro do colo do útero e o linfoma.(74) Estes fármacos, isolados de microrganismos, apresentam atividade citotóxica e citostática direta nas células tumorais e também podem tratar ou prevenir infecções que resultam do tratamento do cancro.(74,75)

O mecanismo de ação desta classe não é único e igual para todos os fármacos. Alguns atuam por formação de ligação cruzada (reticulações) ao DNA, outros intercalam em sequências específicas ou ligam-se à dupla hélice. Por vezes, estes agentes conduzem à formação de radicais livres que resultam na clivagem das cadeias de DNA, ou atuam por inibição das topoisomerases, entre outros possíveis mecanismos.(61,62) De uma forma geral, a ação anti tumoral é direcionada preferencialmente para o bloqueio do crescimento das células cancerígenas primárias e metastizadas, para que a lesão induzida nas células vizinhas saudáveis seja a menor possível.(75) Vários tumores, como sarcomas, linfomas, carcinomas e leucemia, respondem de forma eficaz a esta terapia.(76)

As Antraciclinas (figura I-10) são um grupo importante nesta classe de antineoplásicos. Incluem os antibióticos anti tumorais DOXO (Caelyx[®], Doxorubicina[®], Myocet[®], Adiblastina[®], DOXO-cell[®], Fauldoxo[®])(50), Daunorrubina (Daunoxome[®], Daunoblastina[®])(50), Epirrubicina (Epi-cell[®], Epirrubicina[®], Farmorubicina[®])(50) e Idarrubicina (Zavedos[®])(50),(52) cuja estrutura é muito semelhante a uma Antraciclina e contém uma ligação glicosídica a um açúcar aminado.(62)

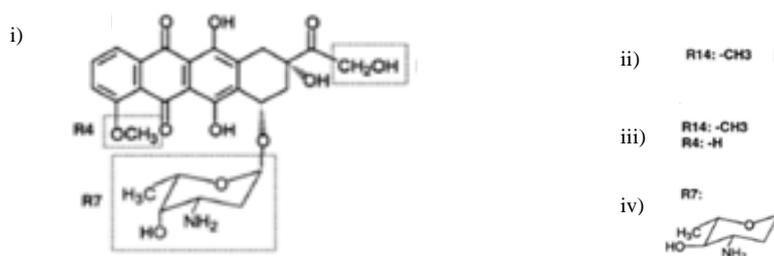


Figura I-10: Estrutura química das Antraciclinas. i) DOXO; ii) Daunorrubina; iii) Idarrubicina; iv) Epirrubicina. Adaptado de Haraguchi et al. (77)

Vários mecanismos de ação foram sugeridos para estes compostos, incluindo a produção de radicais livres, alquilação do DNA, com ligação intra ou intercadeias do

DNA, inibição das topoisomerases I e II e intercalação no DNA. (78,79) Estes dois últimos mecanismos parecem ser os mais relevantes. Contudo, a sua administração pode desencadear o desenvolvimento de cardiomiopatia, principalmente a DOXO que a partir dos seus intermediários reduzidos forma radicais livres de oxigénio (ROS), associados à cardiotoxicidade.(62,72,75)

A Daunorrobicina é apresentada como o agente anticancerígeno mais importante, nesta classe. Provoca alterações em várias funções do DNA, após intercalar entre as bases, o que conduz a um atraso ou paragem no crescimento das células tumorais. A Idarrubicina e Epirrubicina atuam de modo semelhante, por se ligarem ao DNA, impedindo a síntese de moléculas de DNA e RNA.(76)

A Actinomicina D (figura I-11), chamada Dactinomicina (Cosmegen®)(50) é outro antibiótico capaz de se ligar ao complexo de iniciação da transcrição e inibir a elongação pela RNA polimerase, o que bloqueia a síntese de RNA dependente do DNA e, conseqüentemente, das proteínas. Também pode interferir com

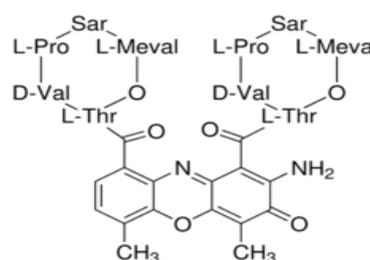


Figura I-11- Estrutura química da Actinomicina D adaptado de Sigma-Aldrich.(80)

a replicação do DNA, ao gerar cortes nas cadeias.(81) Devido aos efeitos provocados na célula este composto consegue inibir a proliferação, quer das células malignas quer das normais. Atualmente, não é muito usada devido à sua elevada toxicidade, responsável por provocar lesão no material genético.(76)

A Bleomicina (Bilo®, Bleocin®)(50)(figura I-12), aprovada para o tratamento do cancro, exerce o seu efeito citotóxico nas células que se encontram na transição da fase G2 para a fase M do ciclo celular, ao bloquear as células na fase G2, o que conduz ao desenvolvimento de mutações em muitas destas células. A sua ação implica a formação de um complexo formado pela própria molécula, oxigénio e ferro (Fe II), que vai gerar radicais livres, com conseqüente quebra de uma ou das

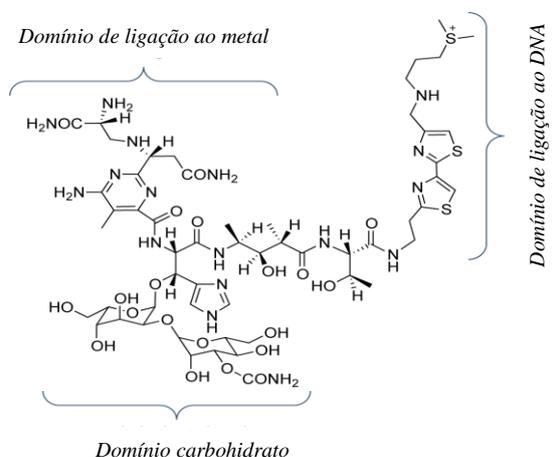


Figura I-12: Estrutura química da Bleomicina A₂ adaptado de ATDBio, LDA. (82)

duas cadeias de DNA.(76) Quando comparada com os outros fármacos anti tumorais, a sua atividade mielossupressora e imunossupressora é muito inferior. (62)

Outro antibiótico com uma forte atividade anti tumoral é a Mitomicina (figura I-13) que é aplicada em combinação com outros antineoplásicos, no tratamento do cancro da mama que se apresenta em fase avançada. Nas células, sofre uma ativação por redução que vai permitir a sua ligação covalente aos resíduos de guanina do DNA e a formação de ligações intra ou intercadeias de DNA que, se não forem reparadas, bloqueiam a transcrição e replicação celular, com posterior morte celular.(84)

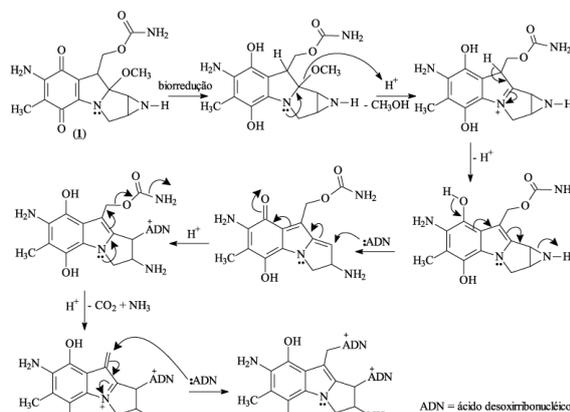


Figura I-13: Estrutura química da Mitomicina e respetivo mecanismo de ação adaptado de Oliveira et.al. (83)

2.3.4. Inibidores de topoisomerase

As topoisomerases medeiam a separação das duas cadeias de DNA, necessária para que estas possam ser copiadas. Além disso, também estão envolvidas na replicação e transcrição do DNA, na reparação de lesões que ocorrem nas cadeias do mesmo, e na sua recombinação.(53,85) Apesar de existirem diferentes tipos, o mecanismo de catálise dos enzimas é comum a todos eles e ocorre através do ataque nucleófilico de um hidroxilo fenólico pertencente a um resíduo de tirosina do enzima a uma ligação fosfodiéster do DNA. De acordo com o tipo de topoisomerase envolvida, pode estabelecer-se uma ligação covalente entre o resíduo de tirosina e o grupo fosfato do DNA, na extremidade 3' do DNA, caso esta seja do tipo I, ou na extremidade 5', para os outros tipos existentes.(86)

As topoisomerases I e II constituem os alvos moleculares de alguns antineoplásicos,(86) sendo estes fármacos especialmente eficazes para as do tipo I, quer pela elevada concentração destas enzimas no interior das células, quer pela baixa capacidade dos mecanismos de reparação em clivar o complexo estável topoisomerase I-DNA. (85)

Os inibidores da topoisomerase I aprovados pela Food and Drugs Administration (FDA), pertencentes à família das Camptotecinas (figura I-14), como o Topotecano (Hycamtin®)(50) e o Irinotecano (Campto®, Faultenocan®, Irinotecano®, Irkan®)(50),

contribuem para a quebra das cadeias do material genético, com consequente atraso do ciclo celular e apoptose das células cancerígenas, que estão em constante divisão, o que faz deles potentes agentes anti cancerígenos. (87)

O Irinotecano, administrado no tratamento do cancro colorretal, é um pró-fármaco, originando o seu metabolito ativo, o SN-38. Esta ativação é conduzida pela carboxilesterase, que se encontra nas células tumorais, fígado e mucosa do intestino. (86)

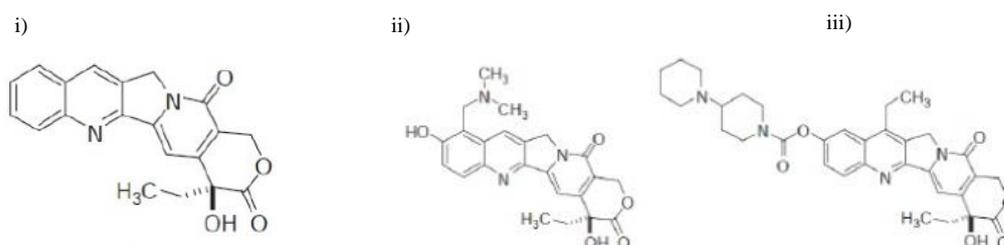


Figura I-14: Estrutura química das Camptotecinas. i) Camptotecina; ii) Topotecano; iii) Irinotecano. Adaptado de Bailly et al. (88)

No entanto, estes compostos apresentam efeitos adversos severos e são rapidamente desativados pelo facto de algumas linhagens celulares desenvolverem resistência e pela sua estrutura ser pouco estável. No sentido de contornar esta situação foram desenvolvidos novos inibidores de topoisomerase I, como as indenoisoquinolonas (figura I-15), os indolocarbazoles e os derivados da fenantridina. Alguns compostos destas classes atingiram a fase de testes clínicos.(86)

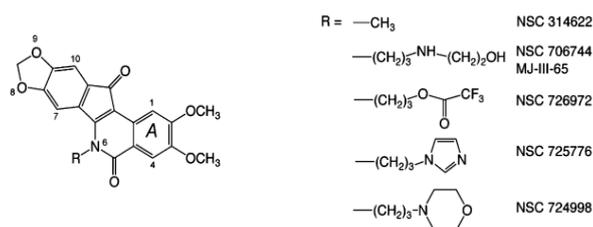


Figura I-15: Estrutura química das indenoisoquinolinas adaptado de Pommier et al. (86)

Existem vários inibidores da topoisomerase II aprovados para o tratamento do cancro. Estes encontram-se divididos em duas classes, de acordo com o modo de atuação: aqueles que formam complexos topoisomerase II-DNA, intercalando ou não no DNA, com consequente quebra de ligações das cadeias de DNA e aqueles que bloqueiam a atividade catalítica do enzima.(89) As Epipodofilotoxinas (figura I-16), como o Etoposido (Lastet[®], Vepesid[®], Eposin[®], Eto-CS[®], Etoposido[®])(50) e o Teniposido

(Vumon[®])(50) estão englobados na primeira classe. O Etoposido é o principal representante da classe e o seu uso está aprovado para a quimioterapia do cancro dos pulmões, cariocarcinoma, cancros do ovário e testículos, linfoma e leucemia mieloide.(88) Estes agentes bloqueiam a síntese de DNA e o ciclo celular na fase G1. O seu uso potencia o desenvolvimento posterior de cancros secundários, como a leucemia mieloide. (52)

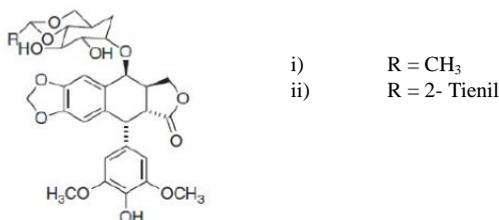


Figura I-16: Estrutura química das Epipodofilotoxinas. i) Etopósido; ii) Tenipósido. Adaptado de Almeida et al. (90)

2.3.5. Inibidores de mitose

A mitose constitui um processo organizado em que ocorrem grandes alterações nos vários componentes celulares. Esta é considerada a fase mais frágil do ciclo celular, por isso a célula encontra-se mais suscetível à morte celular, se exposta a várias ameaças.(91)

Os inibidores de mitose são fármacos aplicados na quimioterapia do cancro que interferem com a progressão deste processo mitótico. Atuam predominantemente durante a fase M do ciclo celular e os microtúbulos constituem o alvo de ação. Os microtúbulos, cuja unidade básica é a tubulina, são importantes na manutenção da forma da célula e no transporte intracelular, e por isso têm um papel essencial quer na interfase (fases G1, S e G2), quer na mitose, onde são responsáveis, em conjunto com outras proteínas, pelo estabelecimento e estruturação do fuso acromático, essencial para a separação dos cromossomas.(62,92) As células quiescentes, que não se encontram em divisão, sofrem um menor efeito quando sujeitas a inibidores de mitose, porque os microtúbulos apresentam uma menor movimentação. (53,91,92)

A ação desta classe de fármacos resulta em alterações na dinâmica dos microtúbulos, com conseqüente montagem anormal do fuso acromático, desalinhamento dos cromossomas e ativação contínua do ponto de controlo da formação do fuso acromático. No entanto, o modo de ação destes compostos varia e, assim, estes agentes terapêuticos podem ser divididos em agentes desestabilizadores dos microtúbulos,

quando impedem a polimerização dos microtúbulos, como os Alcaloides da Vinca e em agentes estabilizadores de microtúbulos, quando estimulam a polimerização, como os Taxanos.(91)

Dos alcaloides da Vinca (figura I-17), apenas a Vincristina (Oncovin®, Vincristina®)(50) e a Vinblastina (Solblastin®, Velbe®)(50) apresentam propriedades anti tumorais, e por isso, em conjunto com os derivados semissintéticos da Vinblastina, como a Vindesina, Vinorelbina (Navelbine®, Vinorel®, Vinorelbina®)(50) e Vinflunina,(67) são administrados na quimioterapia de alguns

cancros, como a leucemia, linfoma, melanoma, cancos da mama e pulmão.(52) A Vincristina é aplicada em conjugação com outros fármacos no tratamento de doenças hematológicas.(93) Estes exercem a sua ação ao interagir com a β -tubulina, numa região denominada de domínio Vinca, adjacente ao sítio de ligação do trifosfato de guanosina (GTP), o que inibe a polimerização dos microtúbulos. Consequentemente, a formação do fuso acromático é afetada e a célula não consegue completar o processo mitótico.(63,91)

Os Taxanos (figura I-18), como o Paclitaxel (Taxol®, Paclitaxel®, Paxene®)(50) e o Docetaxel (Taxofere®, Docetaxel®) apresentam na sua estrutura um anel de 14 membros, o taxano, mostrando atividade na terapia dos cancos da mama, pulmão e ovário.(55,63,67) Tal como os alcaloides de Vinca, atuam no sistema tubulina/microtúbulos. No entanto, diferem destes por estabilizarem os microtúbulos e reduzirem a sua despolimerização. Ligam-se à β -tubulina, ao longo da superfície interna dos microtúbulos, induzindo mudanças na conformação da tubulina que contribuem para o aumento e estabilização das suas interações com os monómeros de tubulina vizinhos, o que bloqueia o ciclo celular na mitose, por inibir a reorganização dos microtúbulos, necessária para a conclusão do processo e proliferação celular. (63,93)

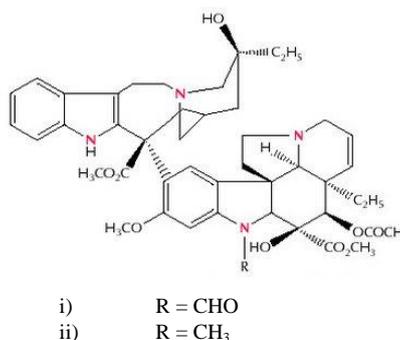


Figura I-17: Estrutura química dos Alcalóide da Vinca. i) Vincristina; ii) Vinblastina adaptado de Pommier et al. (86)

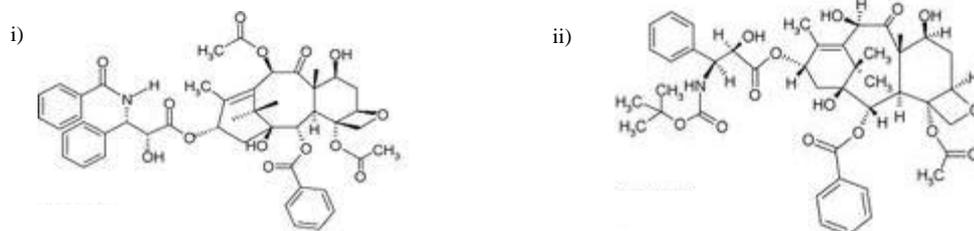


Figura I-18: Estrutura química dos Taxanos. i) Paclitaxel; ii) Docetaxel adaptado de Gaspar et al. (94)

Apesar da elevada eficácia do tratamento, o seu uso é limitado devido à toxicidade a eles inerente, uma vez que também vão afetar a divisão das células normais e, conseqüentemente, despoletar mielossupressão, que mostra ser reversível. Por alterarem a dinâmica dos microtúbulos nas células que não se encontram em divisão, como os neurónios periféricos, pode ocorrer o desenvolvimento de neuropatia irreversível.(63,93)

Na tentativa de contornar estes problemas de toxicidade têm sido desenvolvidos novos fármacos inibidores de mitose, com atividade anti tumoral, encontrando-se alguns em ensaios clínicos.(63,93)

2.3.6. Corticosteroides

Este grupo é constituído por hormonas naturais e fármacos de estrutura semelhante a estas hormonas que, devido à sua atividade anti-inflamatória, são úteis no tratamento de alguns tipos de cancro, como linfoma, leucemia, mieloma múltiplo e cancro da mama, quando associados a outros agentes quimioterápicos.(53,95) No entanto, também se mostram úteis no combate aos efeitos adversos provocados pela quimioterapia instituída, sendo utilizados como antieméticos para prevenir os sintomas de náuseas e vómitos que dela podem advir.(95) Em alguns casos, podem-se administrar estes fármacos antes da quimioterapia, no sentido de prevenir reações de hipersensibilidade nos doentes.(52)

Os corticosteroides como a Prednisona, a Metilprednisolona e a Dexametasona exercem efeitos anti-inflamatório, imunossupressivo, anti-angiogénico, apoptótico e necrótico. Estes compostos, por mimicaem quer o cortisol endógeno, quer os mineralocorticoides, vão ativar os recetores intracelulares de glucocorticoides, presentes nas células promovendo um aumento da expressão das proteínas anti-inflamatórias e uma diminuição da expressão das proteínas pro-inflamatórias.(95)

Contudo, apesar da eficácia apresentada no tratamento de tumores, apenas uma pequena quantidade destes fármacos é capaz de alcançar as células tumorais, tornando-se por isso necessária a administração de doses elevadas destes fármacos, o que resulta em altos níveis de morbidade e mortalidade, resultantes da supressão do sistema imunitário por eles induzida.(96) O aparecimento de osteoporose, perda de massa muscular e hipertensão são outros efeitos secundários associados a esta classe.(95)

2.4.Desvantagens da terapia convencional

As terapias tradicionais “não-específicas” nomeadamente, a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia convencional, apesar de atuarem preferencialmente nas células cancerígenas, também são capazes de lesar as células normais suscetíveis que se encontram em divisão e, conseqüentemente, vários tecidos são afetados.(97)

As células cancerígenas são capazes de desenvolver resistência à quimioterapia que é atualmente aplicada. Em consequência, muitos fármacos que se mostravam eficazes têm perdido eficácia na redução do número de células tumorais, o que torna o reaparecimento do tumor frequente e contribui para o insucesso de muitos dos regimes terapêuticos administrados.(8,61)

Recentemente, tem vindo a ser defendida a utilização de terapias multialvo, com o objetivo de aumentar a eficácia e retardar a seleção de resistência. Neste caso, são associadas duas ou mais entidades farmacologicamente ativas, dirigidas a diferentes alvos terapêuticos ou a pontos diferentes do mesmo alvo.(8,98)

Face às limitações associadas aos fármacos existentes e ao rápido desenvolvimento de resistência, bem como à heterogeneidade associada ao tumor, que faz com que diferentes doentes com o mesmo tipo de cancro respondam à terapia de forma diferente, o desenvolvimento de soluções mais eficazes e seguras para o tratamento de neoplasias representa um desafio primordial.(98)

2.5.Terapia direcionada

Apesar dos avanços que têm ocorrido na área do cancro, poucos progressos têm sido feitos em relação à elucidação da sua etiologia, o que limita a prevenção e tratamento da doença. Muitos dos tratamentos, aplicados hoje em dia, no combate ao cancro, foram desenvolvidos antes do ano de 1975, altura em que o conhecimento, em relação aos mecanismos genéticos e biológicos da sua patogénese, era limitado. Deste modo, a

informação que se tem vindo a obter da investigação, relativamente aos mecanismos celulares e moleculares, tem-se mostrado fundamental para a descoberta de novas terapias efetivas na resolução da doença e para a interpretação da ineficácia de muitas estratégias terapêuticas.(8)

Deste modo, na tentativa de contornar a baixa eficácia de cura associada à terapia convencional, os investigadores têm-se focado na aquisição de conhecimentos relativamente à biologia do cancro que, lhes permitam a descoberta de novos alvos terapêuticos e desenvolvimento de fármacos direcionados para as células tumorais, com mecanismos de ação e perfil de toxicidade diferentes dos apresentados pela quimioterapia tradicional e, por isso, mais seletivos para as células cancerígenas e com efeitos adversos menos severos. Esta nova classe foca-se nas alterações moleculares e celulares específicas do cancro, de forma a encontrar alvos que tenham interferência com os mecanismos e constituintes celulares necessários para o desenvolvimento e crescimento do tumor como as células do estroma e os vasos sanguíneos do tumor, bem como os mecanismos de sinalização celular. A inibição daqueles alvos deverá contribuir para retardar o crescimento do tumor e induzir a apoptose.(97,99) Muitas destas terapias, por serem dirigidas a proteínas envolvidas em vias de sinalização, vão afetá-las e conduzir a modificações nas funções e atividades básicas das células, o que, conseqüentemente, permite bloquear os sinais que promovem o crescimento e a divisão descontrolada das células. Outras podem provocar a morte celular de forma direta, por induzirem especificamente a apoptose, ou indireta, ao estimularem o sistema imunitário a reconhecer e destruir as células cancerígenas e /ou libertar substâncias tóxicas nestas células.(100)

Assim, o objetivo principal da quimioterapia direcionada é eliminar as células tumorais de forma mais precisa e com menos efeitos adversos, ao atuar em moléculas ou vias presentes nas células tumorais e ausentes nas células normais, moléculas que se apresentam mais frequentemente nas células cancerígenas ou moléculas presentes em ambos os tipos de células mas em que o organismo tem a capacidade de repor as células normais lesadas.(99)

A terapia direcionada apresenta-se sob a forma de moléculas pequenas ou anticorpos monoclonais. As moléculas pequenas têm a capacidade de poder penetrar a membrana celular e interagir com os seus alvos, que se encontram no interior da célula.

Normalmente, são inibidores de proteínas quinases e interferem com a atividade enzimática destas proteínas.(97,100) Apresentam uma estrutura química diversa e podem ser classificados como análogos de ATP, ligandos de domínios catalíticos, ligandos de domínios não catalíticos, produtos naturais e ligandos que se ligam à conformação inativa do enzima.(97) Algumas destas moléculas pequenas apresentam um interesse acrescido por conseguirem atuar em proteína quinases da mesma classe, devido à semelhança estrutural que existe entre elas.(99)

Os anticorpos monoclonais são orientados para antígenos específicos encontrados na superfície da membrana celular das células tumorais, como recetores transmembranares ou fatores de crescimento extracelulares. Estes podem ser combinados com agentes citotóxicos ou radioisótopos para aumentar a sua eficácia terapêutica.(97,100)

Tal como a quimioterapia convencional, a terapia direcionada encontra-se dividida em classes, de acordo com o mecanismo de ação e com as moléculas alvo.(99) Os inibidores de transdução de sinal inibem o crescimento dos tumores e a sua disseminação ao bloquearem enzimas específicas e recetores de fatores de crescimento envolvidos na proliferação das células cancerígenas. O sítio de ligação do ATP das tirosinas quinases tem-se mostrado um potencial alvo terapêutico para estes agentes. (100) Uma enorme variedade de inibidores fazem parte desta classe, como os inibidores dos recetores de quinases, inibidores mTOR, inibidores de proteossomas e inibidores de fatores de crescimento.(55,99)

Outra classe que faz parte da terapia direcionada são os modificadores da função das proteínas que regulam a expressão genética e outras funções celulares, chamados moduladores epigenéticos. Estes vão atuar de modo a evitar o distúrbio epigenético global, que medeia eventos responsáveis pelo desenvolvimento de cancro.(97,100)

Nas terapias direcionadas também se incluem os fármacos que induzem a apoptose das células cancerígenas, uma vez que estas células são caracterizadas por exibir resistência aos estímulos apoptóticos ou perda de sinais que induzem a apoptose. Estes fármacos encontram-se direcionados para o tratamento de melanoma e linfoma.(97,100)

Os inibidores de angiogénese constituem outra classe neste tipo de terapia.(55,97) A criação de uma vasculatura própria do tumor, induzida por sinais químicos produzidos pelas células tumorais ou por células vizinhas, após o estímulo das células cancerígenas,

assegura o seu crescimento e metastização.(55,101) Assim, a angiogénese e o endotélio tumoral constituem alvos interessantes. Muitos destes fármacos atuam ao bloquear, os fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGF), cuja expressão se encontra aumentada em alguns tumores, ou os seus recetores (VEGFR). Exemplo disso são o anticorpo monoclonal Bevacizumab (Avastin[®])(50), aprovado para o tratamento do glioblastoma(102), cancro do pulmão(103), cancro do rim metastizado (104) e cancro colorretal metastizado em quimioterapia de combinação(105,106), que se liga-se ao VEGF(97,105); o Sorafinib (Nexavar[®])(50) e o Sunitinib (Sutent[®])(50) que são moléculas pequenas que bloqueiam o processo ao inibirem tirosina quinases envolvidas na via de sinalização do VEGF.(101,107) Outros, como o Regorafenib (Stivarga[®])(50) e o Cabozantinib, são inibidores multiquinase, que bloqueiam a atividade de várias tirosina quinases, incluindo o recetor do VEGF.(108–110) Para a inibição deste processo encontram-se em estudo alguns agentes desestabilizadores de tubulina e flavanóides que, por atuarem em células endoteliais, vão lesar a rede de vasos sanguíneos estabelecida em redor do tumor, desestabilizando e interrompendo o aporte sanguíneo necessário.(97,111–114) Estes inibidores de angiogénese não só matam as células malignas, como evitam o crescimento do tumor, mostrando-se eficazes no combate de cancros em combinação com a quimioterapia convencional. (101,114,115)

Existe ainda outra classe de anticorpos monoclonais, responsável por ajudar o sistema imunitário a destruir as células cancerígenas, uma vez que induzem a sua ativação quando se ligam a antigénios expressos nas células cancerígenas.(100) Esta terapia biológica é utilizada no tratamento de linfomas e melanoma.(100,116,117) Os anticorpos podem ainda ser combinados com moléculas citotóxicas, como isótopos radioativos (radiofármacos) (93) ou outras moléculas tóxicas que, após ligação às células cancerígenas, permitem a libertação específica destes agentes tóxicos, com posterior lesão das mesmas. (117,118)

A utilização de vacinas para a prevenção ou tratamento do cancro, no sentido de estimular o sistema imunitário do hospedeiro a criar imunidade específica contra o tumor, também faz parte das terapias biológicas direcionadas, e tem mostrado resultados promissores nesta área quando combinado com outras terapêuticas convencionais. (78,101,116,119) Contudo, os resultados clínicos apresentados não são muito

significativos, prosseguindo as investigações no sentido de otimizar a sua eficácia. (78,118,120)

Outra estratégia de imunoterapia baseia-se na utilização de citocinas com ação imunomoduladora(101,121) como a interleucina-2 (Proleukin[®]) (50,55,122,123), o interferão alfa (Roferon[®], IntronA[®], Viraferon[®]) (50,121,124–126) e o fator estimulante de colónias de granulócitos e macrófagos(99,127), que podem ser aplicadas como terapia direcionada no tratamento de alguns cancros.(55,128)

Os inibidores de metástases podem também ser aplicados como terapia direcionada.(55,129–131)

Contudo, apesar destas terapias direcionadas serem mais seletivas para as células tumorais, apresentam ainda assim efeitos adversos, principalmente quando atuam em mais do que uma molécula alvo, mecanismo que potencia a eficácia contra o tumor mas, ao mesmo tempo, também potencia a toxicidade relativamente aos tecidos normais.(132) Por fazerem parte de uma quimioterapia recente, ainda se encontra em estudo a melhor forma de manipular as reações adversas, decorrentes da sua administração.(99)

À inexistência de uma eficácia superior face à terapia convencional e à necessidade de conjugar estas terapias com as já existentes para obter uma eficácia clínica significativa, acresce o aparecimento de reações adversas. Também o facto de a aplicação destes fármacos ser relativamente recente, dificulta a determinação dos seus efeitos a longo prazo, o que faz com que o seu uso clínico seja limitado. (99)

Outra desvantagem está associada à necessidade de uma terapêutica de manutenção com estes fármacos, para que as alterações moleculares e celulares nas células alvo permaneçam. Neste caso, a eficácia a curto prazo está comprometida devido ao desenvolvimento de resistência por parte das células cancerígenas, tal como no caso da quimioterapia convencional, o que contrapõe o benefício clínico, referido.(55,116,132)

Os custos elevados em laboratório, que advêm do seu desenvolvimento, são fatores que limitam a aplicação clínica destas novas estratégias.(133–135)

Outros tratamentos incluem o uso de hormonas e antagonistas hormonais, nos cancros da mama(136) e próstata (99,137,138), quimioterapia lipossomal (139), terapia fotodinâmica e fármacos indutores de diferenciação, no tratamento de leucemia promielocítica aguda(55,99,117,140), cuja administração não mostra ser mais vantajosa que a terapia convencional.(133,135,138,139,141,142)

O uso de hipertermia, em combinação com a radioterapia e quimioterapia, e a terapia genética, são modalidades de tratamento que se encontram em ensaios clínicos e que, tal como todos os outros tratamentos enumerados, apresentam inconvenientes que contrastam com a eficácia promissora. (101,142–144)

Assim, a descoberta e o desenvolvimento de novas terapias anti tumorais, que contornem estas limitações, é prioritária.

2.6. Aplicação de quimiótipos no tratamento do cancro aprovados para a terapia de outras patologias

A necessidade urgente da descoberta de novas moléculas eficazes no tratamento do cancro torna a exploração de fármacos já aprovados para o tratamento de outras doenças atrativa, pois grande parte da informação relativa ao perfil farmacocinético e toxicológico é conhecida, o que acelera todo o processo. A informação disponibilizada, relativamente ao perfil de segurança e às doses terapêuticas seguras, simplifica a determinação das concentrações terapêuticas e seguras de fármaco que podem ser administradas, na nova indicação. (145–150) Os compostos de origem natural, devido à sua elevada eficácia em inúmeras doenças e aos baixos efeitos adversos que apresentam *in vivo*, têm vindo a ganhar interesse ao longo dos anos no tratamento do cancro. Como exemplo podemos referir a Artemisinina (ART), e os seus derivados semissintéticos, que são aplicados no tratamento da Malária. Alguns destes compostos mostraram ser ativos contra outros parasitas protozoários, nomeadamente *Perkinsus olseni* (151) e *Leishmania infantum* (152), e também demonstraram atividade citotóxica em várias linhas de células tumorais. (153) Assim sendo, estão em curso ensaios clínicos com o sentido de os introduzir, na terapêutica do cancro. (146,147,154–160)

2.6.1. Artemisinina

A ART é um produto natural obtido da planta *Artemisia annua* (figura I-19), que só foi isolada com sucesso, e identificada como composto ativo no tratamento da Malária, nos anos 80 do século passado, na sequência de investigações no sentido de encontrar novos tratamentos para esta doença, com base em plantas usadas na medicina tradicional. (161) Por atuarem rapidamente no combate à Malária e devido à eficácia e segurança a eles associadas, estes compostos têm vindo a ser aplicados em terapias de combinação, no tratamento de primeira linha da Malária, em todos os países onde esta

doença é endêmica.(162–164) Apesar de já se terem identificado casos de tolerância, o interesse nesta família de peróxidos cíclicos acresce, pelo facto de serem eficazes no tratamento da Malária desencadeada pelos parasitas *Plasmodium falciparum* (*P.falciparum*) e *Plasmodium vivax* (*P.vivax*), resistentes a fármacos usados em monoterapia convencional, como a Cloroquina e a Pirimetamina. Devido a uma semivida curta, as ARTs (Artemisininas) são aplicadas em combinação com outros fármacos com semivida mais longa, a fim de evitar recrudescência.(155,156,162,163)

Quimicamente, a ART é uma lactona sesquiterpénica que pertence à subclasse dos terpenóides. Esta classe é constituída por compostos presentes nas plantas de natureza lipofílica, que são utilizados na medicina tradicional para redução da inflamação e tratamento do cancro. A sua estrutura apresenta um peróxido cíclico (grupo 1,2,4-trioxano), responsável pela sua atividade, o farmacóforo (figura I-19).(156,153,161)

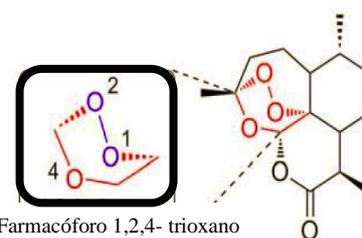


Figura I-19: ART e o farmacóforo 1,2,4-trioxano, adaptado de O'Neill et al.(164)

Apesar, de a ART se mostrar ativa quando aplicada em concentrações nanomolares (nM), a sua atividade é limitada pela sua baixa solubilidade em água ou óleo, pelo reaparecimento do parasita após o tratamento, pelo seu baixo tempo de meia-vida no plasma e pela sua baixa biodisponibilidade quando administrada oralmente.(158) No sentido de ultrapassar estas limitações foram sintetizados, a partir do seu derivado reduzido ativo, a Dihidroartemisinina (DHA), alguns análogos semissintéticos todos eles mantendo a ponte endoperóxido na sua estrutura, essencial para a atividade destes compostos. (157,158,161) Estes encontram-se representados na figura I-20 e são o Artemeter e o Arteter, solúveis em óleo; o Artesunato (AS) de sódio, solúvel em água, o Artelinato de sódio e a Artemisona (ARM), uma ART de segunda geração com propriedades farmacocinéticas otimizadas a nível do tempo de meia-vida e da toxicidade.(158)

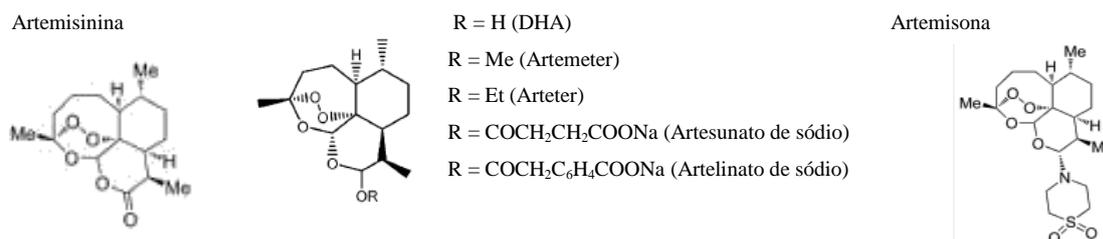


Figura I-20: Estrutura química da ART e dos seus análogos: DHA, Artemeter, Arteter, Artesunato de sódio, Artelinato de sódio; Artemisona adaptado de Chaturvedi(158) et.al e de Terent'ev et al(166).

Devido ao mecanismo citotóxico que lhes está inerente, e que é responsável pela sua atividade anti malárica, estes compostos também exibem atividade anti tumoral, demonstrando a capacidade de afetar vários processos bioquímicos celulares.(167) Por isso, mostram-se promissores no tratamento de vários tipos de cancro, tendo este efeito sido demonstrado em vários estudos envolvendo sistemas de modelos de células cancerígenas. (163,164,168,169) Os estudos realizados têm-se baseado nos compostos mais ativos como o AS e a DHA. O AS exibiu atividade anti tumoral *in vivo* e revelou sucesso no tratamento do melanoma metastásico, quando aplicado em combinação com a quimioterapia convencional. Além disso, também foi descrita a sua capacidade de inibir o crescimento do Sarcoma de Kaposi, por induzir a apoptose das células tumorais. (168) Atualmente, estão em curso vários ensaios clínicos, com o intuito de determinar a atividade e tolerância do AS, em doentes com cancro do cólon e da mama para o tratamento destas neoplasias.(163) A DHA também demonstrou a capacidade de inibir seletivamente o crescimento de células derivadas de leucemia humana, sendo significativamente menos tóxica para os linfócitos humanos normais. (168,170) Outras investigações revelam que este metabolito ativo da ART é uma opção viável no tratamento de vários cancros(169), entre eles o cancro do fígado(168) e da mama(171), destacando-se de entre todos os derivados da ART, a DHA, com o maior efeito citotóxico e anti proliferativo, maior capacidade de indução da apoptose e de regulação do ciclo celular.(168,171)

2.6.1.1. Mecanismo de bioativação e ação da Artemisinina e derivados nas células tumorais

A conversão da ART e dos seus derivados em compostos tóxicos ocorre após a clivagem homolítica da ponte peróxido. Este processo é dependente de Fe (II) e culmina com a formação de ROS que, após isomerização, originam radicais centrados em carbono, com elevada capacidade alquilante.(155,157) Estas espécies geradas vão induzir alterações celulares, que conduzem posteriormente à apoptose celular mediada pela mitocôndria, ao aumento do stress no retículo endoplasmático, ao atraso do ciclo celular através de modulação de genes e proteínas nele envolvidas e à lesão do DNA (figura I-21).(155,172)

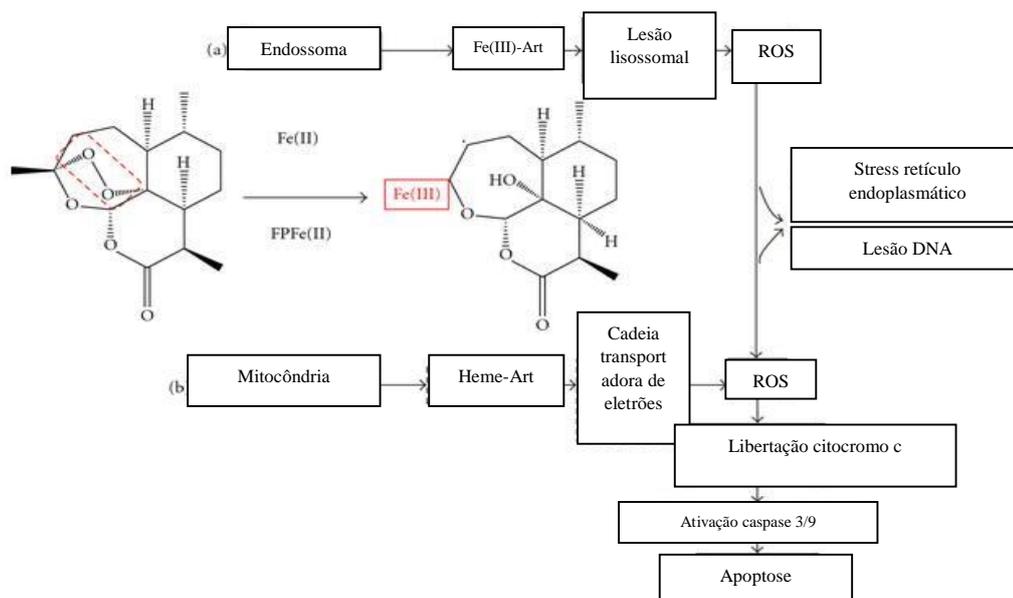


Figura I-21: Possível mecanismo de ação da ART. a) Foi postulado que a bioativação da ART ocorre no endossoma através da liberação do Fe(II), mediada pelo pH, da transferrina internalizada. O Fe(II) ativa a ART que gera radicais centrados em carbono, os quais podem levar a uma lesão lisossomal e formação de ROS que levam a lesão mitocondrial, ativação de caspases e morte celular. b) Alternativamente, foi sugerido que a ativação da ART pelo heme gera radicais centrados em carbono. Na mitocôndria, os adutos interferem com a cadeia de transporte de elétrons ao interagir com o heme ou com as proteínas de ligação ao heme conduzindo à formação de ROS e apoptose. c) Os ROS induzem stress do retículo endoplasmático e d) genotoxicidade. Adaptado de Crespo-Ortiz et al.(172)

O Fe(II) é um elemento essencial para a divisão e proliferação celular, sendo a sua proteína transportadora, a transferrina, de grande importância nos mecanismos celulares dependentes da aquisição intracelular de Fe(II).(157) A ligação e formação dos complexos entre a transferrina e os seus recetores, presentes na superfície celular, permite a entrada deste elemento na célula, por endocitose.(170) As células cancerígenas, para assegurarem a elevada taxa de divisão celular que lhes é característica, necessitam de internalizar grandes quantidades de Fe(II), e por isso estão altamente dependentes da presença de grandes quantidades destes recetores na sua superfície, sendo o conteúdo em Fe(II) nestas células superior ao das células saudáveis. As células que não se encontram em divisão expressam baixos níveis de recetores de transferrina.(155,157,170) Além do nível de recetores de transferrina estar aumentado nas células cancerígenas, a expressão de enzimas antioxidantes também está diminuída nestas células, o que as torna mais sensíveis à lesão por ROS.(172) Deste modo, as células cancerígenas são seletivamente mais suscetíveis ao seu efeito citotóxico.(156,158,159,170) Em estudos realizados com a ART, esta mostrou atuar nas células, tanto de modo direto, provocando lesões no DNA (genotoxicidade), como de modo indireto, interferindo com várias vias de sinalização

envolvidas em vários processos característicos da doença, sendo estes últimos aqueles a que a literatura dá mais ênfase.(169)

No entanto, os mecanismos associados à atividade anti tumoral das ARTs não estão completamente esclarecidos. (figura I-22) Verifica-se por exemplo que derivados destes compostos em que a ponte endoperóxido é substituída por uma ligação éter apresentam ainda assim uma atividade anti tumoral residual que parece estar associada a um mecanismo alternativo, independente do peróxido gerador de radicais.(156,169,172) Estudos dos perfis de expressão em várias classes de células tumorais, após tratamento com a ART, evidenciaram alterações seletivas na expressão de vários oncogenes e genes supressores de tumores, e nem tantas nos genes responsáveis pelo metabolismo do Fe, o que sugere que as propriedades anticancerígenas da ART e dos seus derivados não se devem simplesmente aos efeitos tóxicos globais induzidos pelos radicais gerados.(169)

As ARTs revelam capacidade de regular uma variedade de vias de sinalização nas células tumorais. Um estudo publicado por Huang, C. *et al.* designou a via do PI3K-Akt, a via do recetor tipo Toll, a via do recetor células T, a via do TGF- β e a via de sinalização da insulina, como as de maior importância no efeito biológico determinado pelas ARTs. Apesar de haver versatilidade, a via de sinalização TGF- β parece ser aquela que medeia a influência das ARTs no ciclo celular e na apoptose. As vias de sinalização do recetor das células T e do recetor tipo Toll podem regular a imunidade. A via de sinalização do PI3K-Akt, pode afetar o ciclo celular, apoptose e imunidade, sendo a sua ativação realizada por diversos tipos de estímulos intra e extracelulares e pode regular processos celulares como o crescimento, proliferação, sobrevivência e imunidade. Os resultados obtidos pelos autores indicam que esta via está profundamente envolvida nos efeitos anticancerígenos das ARTs.(173)

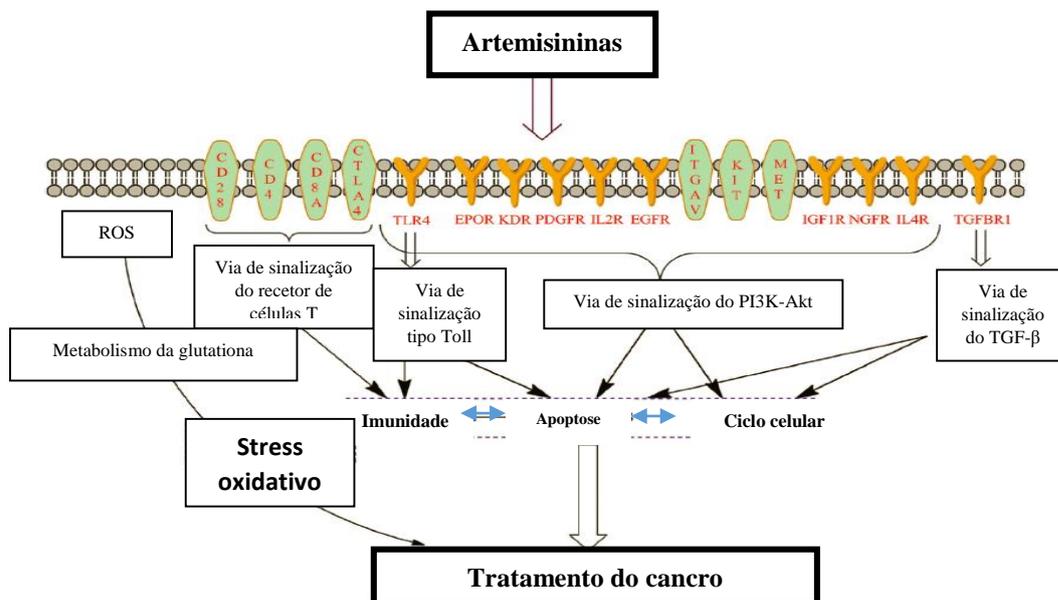


Figura I-22: Possíveis mecanismos de atuação da ART e dos seus análogos. Adaptado de Huang, C et al.(173)

Estes compostos parecem atuar por (i) interferência com proteínas do ciclo celular que medeiam a inibição do crescimento das células tumorais, por atraso no ciclo celular; (ii) indução da apoptose; (iii) inibição da angiogênese; (iv) inibição do processo de invasão e metástase e (v) inibição do fator NF-κB.(156,160,161)

Atualmente, o mecanismo aceite é aquele em que os compostos da família da ART sofrem bioativação a partir do Fe presente no interior das células, com consequente formação de espécies reativas de oxigênio e/ou radicais centrados em carbono que vão interferir com as vias de sinalização anti metástase, induzir lesões no DNA e modificações no ciclo celular, através de modulação de genes e proteínas nele envolvidas.(163,169) Porém o debate continua relativamente à relevância de mecanismos de ação adicionais.

i) Inibição do crescimento das células tumorais

A ART e os compostos que dela derivam mostraram capacidade para alterar a expressão e atividade de enzimas que têm como função a regulação do ciclo celular, o aumento da expressão de inibidores dos mesmos enzimas essenciais para a progressão do ciclo celular e a alteração da expressão de proteínas que participam em diversas vias celulares. Em consequência, estes compostos exercem uma ação citostática e citotóxica nas células cancerígenas. Quando testados em linhagens de células cancerígenas, as ARTs

induziram alterações na cinética do ciclo celular ou interferiram com as vias de proliferação celular.(172)

ii) Indução da apoptose

A ART mostrou induzir a apoptose celular em várias linhagens de células, incluindo as cancerígenas. Este efeito comum e rápido tem sido atribuído à ativação da via intrínseca deste processo quando ocorre lesão da membrana da mitocôndria pelos radicais livres, gerados aquando da ligação destes compostos ao grupo heme presente na mitocôndria.(172) A morte celular, ao ocorrer por apoptose, previne a ocorrência de efeitos adversos de inflamação e lesão celular, que se verificam no caso de necrose, e que podem levar à destruição dos tecidos.(170)

iii) Inibição da angiogénese

Devido ao seu papel importante na sobrevivência do cancro, os fatores pro-angiogénicos e as moléculas envolvidas nas redes de regulação são alvos relevantes para os fármacos anti-tumorais.(169) A atividade anti neoplásica da ART e os seus análogos está relacionada com a capacidade destes inibirem a ocorrência deste processo, através da alteração da expressão de genes nela envolvidos e consequente desregulação dos fatores de crescimento (VEGF, FGF), HIF-alfa, angiogenina (mediador da formação de novos vasos), indutor angiogénico rico em cisteína (CYR61), metaloproteinases (MMP9, MMP11 e BMP1) e colagénio.(172)

iv) Inibição do processo de invasão e metastização

Para que as células cancerígenas consigam invadir e metastizar outros tecidos tem que ocorrer uma diminuição na função e expressão da molécula transmembranar de ligação do cálcio, responsável pela adesão célula-célula.(172)

Os compostos referidos são capazes de modificar e inibir a expressão dos genes das metaloproteinases da matriz que estão envolvidas na tumorigénese, o que faz com que estes tenham a capacidade de impedir a migração celular, em vários cancros agressivos e invasivos. (172)

v) Inibição do NF-kB

O NF-kB é um complexo proteico que atua como fator de transcrição e que é crucial para a regulação de inúmeros processos celulares. Por isso, este está envolvido no

desenvolvimento do cancro aquando uma regulação inadequada, e mostra-se influente na resposta das células a fármacos antineoplásicos. A DHA é capaz de inibir a ligação deste fator ao DNA, e conseqüentemente reduzir os níveis de expressão de alguns fatores envolvidos na angiogénese.(164,172)

As interações complexas que se estabelecem entre as diferentes vias de sinalização celular podem conduzir a um sinergismo nos efeitos anticancerígenos destes, o que garante um maior controlo do cancro e potencia a morte celular.(169)

A toxicidade destes compostos em relação às células tumorais parece também ser regulada pelo metabolismo do cálcio, stress do retículo endoplasmático, expressão da proteína de controlo da tradução do tumor e proteína de ligação do cálcio, que também foi identificada no *Plasmodium* spp. como um alvo da ART e dos seus derivados semissintéticos.(165,172)

Os mecanismos que medeiam a citotoxicidade parecem variar quer com as características próprias da doença em questão, quer com as características dos diferentes tipos de cancro.(172) No entanto, as linhagens de células resistentes à quimioterapia convencional e à radioterapia mostraram-se sensíveis aos compostos desta classe, o que sugere a sua atuação por um ou mais mecanismos diferente(s) daqueles pelos quais a terapia tradicional anticancerígena atua.(165) Por outro lado, a ART e os seus derivados mostraram limitar o desenvolvimento de resistência a múltiplos fármacos em doentes com cancro, o que foi imputado à sua capacidade de inibição da atividade da Glutathione S-transferase, que atua como antioxidante, neutralizando os radicais livres. (169)

Os efeitos celulares associados às ARTs em combinação com a baixa toxicidade que apresentam nos humanos, faz destes compostos fortes candidatos ao tratamento de tumores sólidos.(155)

2.6.1.2. Vantagens e Desvantagens da aplicação da Artemisinina e dos seus derivados na terapia antineoplásica

A ART e derivados selecionados mostram uma potente atividade anti tumoral quando aplicados em concentrações micromolares (μM) e nM em células sensíveis e resistentes à terapia anticancerígena convencional, particularidade que faz deles fármacos efetivos no tratamento do cancro.(172)

A baixa toxicidade e a seletividade demonstrada por esta classe de compostos para as células tumorais e células estaminais cancerígenas, associadas à sua estrutura e

reatividade únicas, contribuem para que atuem nos mecanismos químicos e moleculares de carcinogénese de forma segura e eficaz.(157) A razão pela qual a ART é menos tóxica para as células normais do que para as células tumorais permanece em debate. O facto de as células normais controlarem o Fe livre intracelular mais eficazmente, nomeadamente a sua remoção do endossoma, a sua transferência para os sítios onde vai ser utilizado e o seu armazenamento em ferritina faz com que, nestas células haja uma remoção rápida do Fe(II) dos endossomas, sendo a ativação destes peróxidos mais limitada. Contudo, poucos estudos existem sobre a toxicidade relativamente às células normais.(174)

Além disso, a ART apresenta uma estabilidade química aceitável, não sofrendo decomposição quando armazenada à temperatura ambiente. O farmacóforo endoperóxido consegue suportar uma variedade de reagentes em condições de reação controladas, incluindo alguns agentes redutores, o que permite a síntese de uma variedade de derivados semi-sintéticos, com a mesma reatividade quando em presença de Fe (II) mas com propriedades farmacológicas melhoradas.(157,158)

Todavia também são apontados alguns problemas a esta classe de compostos. A disponibilidade da ART está dependente do seu isolamento da fonte natural, o que pode trazer limitações ao seu uso. Além disso, as lactonas sesquiterpénicas apresentam propriedades alérgicas e têm o inconveniente de se ligarem aos grupos tiol de proteínas e enzimas essenciais para o bom funcionamento do organismo.(164) Devido à elevada biodisponibilidade, apresentam toxicidade genética e neurológica dependente da dose, sendo de elevada importância a monitorização terapêutica dos doentes, quando os compostos são aplicados em regime terapêutico durante um longo período de tempo. (162,172) Esta situação reveste-se de especial importância pelo facto de o tratamento do cancro estar dependente de uma administração mais prolongada no tempo, face ao tratamento da Malária, o que pode induzir o desenvolvimento de resistência do intestino, na absorção dos mesmos, quando estes são administrados por via oral, situação que ocorre alguns dias após o início da terapêutica e que traz limitação na sua aplicação na terapêutica antineoplásica.(169)

Em estudos realizados em células cancerígenas *in vitro*, e *in vivo*, não foram detetados quaisquer efeitos adversos relevantes das ARTs.(162,172) Assim, e apesar de algumas desvantagens reconhecidas, o menor custo a elas associado, a sua disponibilidade na forma natural e semissintética e a capacidade intrínseca de indução de

apoptose sem potenciar o aparecimento de reações inflamatórias, sustenta o elevado interesse nesta classe para a terapia do cancro, sendo estes compostos referidos como líderes na prática clínica.(162,168,170)

2.6.1.3. Combinação da Artemisinina e seus derivados com a terapia anti tumoral convencional

Os compostos da família da ART, por exercerem a sua ação em diversas vias celulares, quando aplicados em combinação com a radioterapia e/ou quimioterapia, tornam as células cancerígenas sensíveis ao tratamento, o que potencia a atividade anti tumoral da terapêutica convencional e, conseqüentemente, a sua eficácia, sem que efeitos adversos adicionais sejam observados.(169,172)

A radiação ionizante aplicada na radioterapia, contribui para o aumento da produção de ROS nas células, o que potencia a ocorrência de lesões e possível morte celular. As células do organismo são dotadas de enzimas antioxidantes capazes de neutralizar os ROS, e por isso, muitas vezes desenvolvem resistência à radioterapia e quimioterapia aplicadas. Pelo facto dos derivados de ART terem potencial para suprimir a atividade dos enzimas antioxidantes, a combinação da administração de radioterapia com alguns análogos da ART, como a DHA, parece aumentar a atividade anti tumoral, uma vez que uma maior quantidade de ROS vai estar presente no meio intracelular, o que torna as células mais sensíveis ao tratamento. Deste modo, a exposição das células tumorais a agentes que potenciem o stress oxidativo permite uma exacerbação do efeito citotóxico da radiação, tornando as células mais sensíveis à sua ação. Estes factos foram comprovados em diversos estudos, nos quais se testou o efeito da aplicação da radioterapia em combinação com alguns derivados da ART, em linhagens de células de diferentes tipos de tumores (quadro I-2). Os resultados permitem verificar as vantagens da combinação da administração de radioterapia com estes agentes, face ao uso isolado de ambas as terapias. (172,175)

Quadro I-2: Terapia de combinação: radioterapia e derivados da ART. Síntese dos estudos efetuados e resultados, linhagens celulares testadas, efeito observado, mecanismo de ação. ¹Estudo *in vitro* e *in vivo*; ²Estudo *in vitro*; ³Estudo *in vivo*. MAPK- proteína quinase mitogênica ativada; *cdc2*- ciclina dependente da quinase1; Fz/CD95 – fator de necrose tumoral.

Composto	Tipo de Câncer (linhagem celular)	Dose	Efeito observado	Indicação sobre o mecanismo de ação	Refs
ART ¹	Câncer Cervical (Hela mutante p53; SiHa WTP53)	2.0 µmol/L- Hela 2,5 µmol/L- SiHa de ART (24horas) + 2Gy; 4 Gy; 6Gy; 8 Gy de Radioterapia	- Aumento da sensibilidade à radiação raios X, resultado estatisticamente significativo para células Hela p53 mutantes; - Aumento da apoptose de células Hela p53 mutantes; - ART aumenta a radiosensibilidade nas células Hela mas não nas células SiHa.	- Complexo. Inclui várias vias como o transporte de RNA, spliceossoma, degradação de RNA, sinalização do p53 e MAPK. - Atrava a passagem da fase G2 para fase M.	(176)
AS ²	Glioblastoma multiforme (LN 229 e U87MG)	4 µg/mL de AS (24horas) + 2Gy; 8 Gy de Radioterapia	- Aumenta a radiosensibilidade das células; - Aumento da percentagem de células em fase G2;	- Indução de apoptose dependente de caspases, com maior significado nas células LN 229. - Diminuição da expressão da proteína survivina; - Atenua a expressão da proteína inibidora de apoptose; - Modula a lesão do DNA.	(177)
DHA ²		<i>In vitro</i> 2,5-40 µM de DHA (24 horas) + 5Gy de radiação	- Diminuição do crescimento tumoral; - Aumento da radiosensibilidade; - Atraso no ciclo celular	- Diminuição da expressão de mRNA da ciclina B1 e <i>cdc2</i> , através da via de transdução de sinal que envolve monóxido de azoto, que leva a uma inibição da proliferação celular e atraso no crescimento celular, com acumulação do p53.	(178)
AS ¹	Câncer das células não pequenas do pulmão (A549)	2,5-40 µM de AS (24 horas) + 5Gy de radiação <i>In vivo</i> 30 mg/kg de AS (1 dose) + 5Gy de radiação (a cada 3 dias) (28 dias)			

A ART e derivados também se mostram vantajosos quando aplicados em simultâneo com outros agentes quimioterápicos por permitirem a redução da dose dos fármacos mais tóxicos para o organismo, sem comprometer o sucesso da terapêutica.(169,172) Várias investigações, conduzidas *in vitro* e *in vivo*, baseadas em terapias combinadas com fármacos convencionais, têm mostrado resultados promissores. (quadro I-3) Além disso, também foram reportados estudos em linhagens de células tumorais resistentes à quimioterapia, em que a adição da ART à terapia convencional as tornou sensíveis aos fármacos. A DHA e o AS foram os que mostraram efeitos mais fortes e marcantes de quimiossensibilização/sinergismo, enquanto que a ART e os outros derivados mostraram apenas interações de adição/antagonismo (modulação da resposta).(169) Assim, a DHA e o AS aparecem como compostos com capacidade elevada de potenciar os agentes antineoplásicos utilizados em quimioterapia e contornar a seleção de resistência do tumor. No entanto, foi reportado por Wu, G. *et al* o

aparecimento de resistência à DOXO em linhagens de células humanas do cancro do cólon, quando utilizada em conjunto com a ART.(179) É necessário ter em atenção que os benefícios que advêm desta terapia de combinação dependem do modo de ação do fármaco e das várias interações que existem entre eles, principalmente nos sistemas e esquemas de tratamento.(172)

Quadro I-3: Combinação da quimioterapia convencional com compostos análogos da ART: Estudos comprovativos, doses aplicadas, tipo de cancro e linhagem celular utilizados, efeito observado e mecanismo subjacente. ¹Estudo in vitro e in vivo; ²Estudo in vitro; ³Estudo in vivo

Combinação fármacos	Dose	Tipo cancro (linhagem celular)	Efeito observado	Indicação sobre o mecanismo de ação	Refs
DHA + DOXO ²	20 µM DHA + 10 µM de DOXO (24 horas)	Cancro da mama (MCF-7)	- Aumento do número de células em fase G1; - Aumento do nível de apoptose; - Efeito sinérgico na proliferação celular: aumento da atividade anticancerígena	- Aumento da ativação das caspases 7 e 9, com consequente clivagem de PARP e apoptose. - Perda de MMP, induz apoptose.	(179)
DHA + Cis-Pt ²	40 µM DHA + 20 µM de cis-Pt (24 - 48 horas)	Cancro do ovário (SKOV3; SKOV3/DDP)	- Aumento do nível de apoptose; - Inibição do ciclo celular.	- Diminuição da expressão do oncogene C-MYC e ciclina; - Diminuição da expressão do BCL-2; - Aumento da expressão do BAX e da caspase 3; - Inibição do efeito de ativação do mTOR pela cis-Pt.	(180)
DHA + GEM ¹	50 µmol/L de DHA + 100 nmol/L de GEM (células BxPC3) 50 µmol/L de DHA + 500 nmol/L de GEM (células PANC-1) (72 horas)	Cancro do pâncreas (BxPC3; PANC-1)	- Aumento da apoptose: diminuição da viabilidade celular em cerca de 70%, em ambas as linhagens celulares; - Atraso no ciclo celular: BxPC3, atraso na fase S e PANC1 atraso na fase G0/G1; - DHA inibe o efeito da Gemcitabina na ativação do NF-κB; - Maior inibição de crescimento celular quando se usa os dois fármacos combinados em baixas, do que em doses altas individualmente.		(181)
DHA + GEM ¹	10 µmol/L de DHA + 10 µg/L de GEM	Cancro do fígado (Hep G2; Hep 3B)	- Pequeno aumento na diminuição do crescimento tumoral;	- Aumento dos níveis dos inibidores de Cdk; - Aumento dos níveis de p53 nas células Hep G2.	(168)
ART + GEM ¹	10 µmol/L de ART + 10 µg/L de GEM (36 dias)		- Aumento do número de células em fase G1; - Aumento do número de células a sofrer apoptose pela via da mitocôndria;		
DHA + CTX ³	50; 100; 200 mg/kg/dia de DHA + 50 mg/kg/dia de CTX	Cancro do pulmão (NSCLC; A549)	- Redução significativa do tumor; - Aumento dos níveis de apoptose celular;	- Diminuição dos níveis de mRNA que codifica o recetor VEGF KDR/flk-1;	(182)
DHA + Cis-Pt ³	50; 100; 200 mg/kg/dia de DHA + 2mg/kg/dia de Cis-Pt (25 dias)		- Inibição do aparecimento de metástases; - Diminuição da perda de peso, comparada à quimioterapia convencional com CTX ou Cis-Pt.		

DHA + CBP¹	<p><i>In vitro</i> 1 µM de DHA + 1 µM ou 500 µM de CBP (24 horas)</p> <p><i>In vivo</i> 25 mg/kg de DHA, 5 dias/semana + 120 mg/kg de CBP (no dia 0)</p>	Cancro do ovário (A2780; OVCAR-3)	<p>- Aumento do efeito terapêutico da CBP;</p> <p>- Efeito sinérgico nas células OVCAR-3 e efeito aditivo nas células A2780;</p> <p>- Diminuição da viabilidade celular em mais de 50%, comparativamente ao uso isolado dos compostos;</p> <p>- Aumento significativo da apoptose celular;</p> <p>- Diminuição do crescimento tumoral, com regressão do tumor.</p>	(183)
AS + DOXO²	<p>2 ou 4 ng/mL de AS + 25 ou 50 ng/mL de DOXO (24 horas)</p>	Leucemia (Jurkat; CEM)	<p>- Efeito sinérgico, mais significativo nas células CEM: aumento do número de células que sofrem apoptose.</p>	(184)
AS + Rituximab²	<p>50 µM de AS + 20 µg/mL de Rituximab (24 horas)</p>	Linfoma não Hodgkin (Ramos)	<p>- Aumento dos níveis de apoptose celular.</p>	(185)
ARM + GEM²	<p>0,5µM de ARM + 2 nM de GEM</p>			(186)
ARM + OXP²	<p>0,25µM de ARM + 1 µM de OXP para HCT116 e SW480</p> <p>0,25µM de ARM + 2,5 µM de OXP para MCF7</p>	Cancro da mama (MCF7)	<p>- Efeito no bloqueio do ciclo celular aumenta: redução do número de células tumorais.</p> <p>- ARM com melhor atividade tumoral do que AS quando utilizada em combinação com OXP e GEM. Efeito aditivo quando usada com OXP e sem efeito significativo quando usada com GEM.</p>	<p>- Diminuição das proteínas reguladoras do ciclo celular, ciclina D1 e CDK4;</p> <p>- ARM mostra-se eficaz na diminuição do número de células tumorais resistentes à ART.</p>
ARM + Talidomida²	<p>0,5 µM de ARM + 1 mM de Talidomida (72 horas)</p>		<p>- Combinação com Talidomida não conduziu a uma interação significante.</p>	

2.6.1.4. Aumento da atividade terapêutica da Artemisinina e dos seus derivados: combinação com holotransferrina. A síntese de dímeros, trímeros e tetrâmeros

A atividade das ARTs provou ser potenciada através da co-administração de holo-transferrina saturada de Fe (transferrina diférrica) que, aumenta os níveis intracelulares de Fe (III) nas células. O carregamento das células tumorais com Fe desencadeia um aumento da citotoxicidade da ART em, cerca de 100 vezes, em algumas linhagens celulares, face à sua administração isolada.(155,170,172)

Na tentativa de sintetizar derivados de ART mais potentes, com maior biodisponibilidade, hidroliticamente mais estáveis e menos tóxicos, com possível aplicação no tratamento do cancro, muitos investigadores apostaram na síntese de dímeros, trímeros e tetrâmeros derivados da ART. Apesar do mecanismo associado à ação anti proliferativa dos dímeros derivados da ART necessitar de mais estudos, estes são capazes de induzir a apoptose, o atraso na fase G0/G1 do ciclo celular e a formação de ROS.(158) Foi experimentalmente provado que os dímeros e os trímeros derivados da ART apresentam uma maior atividade anti tumoral que os compostos monoméricos. (187) Os dímeros que têm vindo a ser sintetizados apresentam uma concentração de inibição de 50% do crescimento celular (IC_{50}) entre os 0,014 μM e os 6 μM . Um exemplo, os dímeros de trioxanos derivados da ART (figura I-23), demonstraram uma atividade anti tumoral superior à DOXO, e os dímeros de ácido artesúnicos. Deste modo, Posner *et. al* frisaram a importância das duas unidades trioxano e da natureza da ligação entre elas para a atividade anti proliferativa.(188)

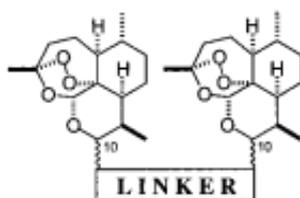


Figura I-23: Estrutura química dos dímeros de trioxanos derivados da ART adaptado de Posner *et al.*(188)

Os homodímeros de ácido artesúnicos (figura I-24) também conduziram a valores de IC_{50} na ordem dos nM em células de leucemia resistentes e sensíveis à quimioterapia. (172)

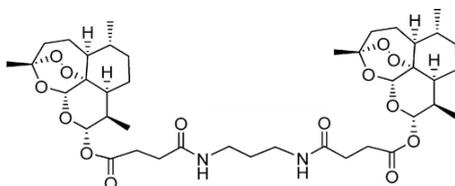


Figura I-24: Estrutura química de um dímero de ácido artesúnicos. Adaptado de Horwedel *et al.*(189)

Surpreendentemente, o tratamento com os dímeros de ART (figura I-25) diminuiu os níveis da proteína survivina, responsável pela inibição da apoptose. Neste estudo *in vitro*, constatou-se que baixas concentrações de dímeros de ART são mais efetivas do que

a ART na indução do atraso no ciclo celular e apoptose nas células tumorais da próstata. (155)



Figura I-25: Estrutura química de dímeros de ART. Adaptado de Morrisey et al.(155)

Resultados obtidos de estudos com alguns dos trímeros demonstraram uma maior efetividade destes face à Adriamicina, à Mitomicina e ao Taxol, em linhagens de células de leucemia.(158) Nam *et al.* referiu que o trímero de ART (figura I-26) tem um efeito anti tumoral mais potente nas células tumorais, do que outros agentes quimioterápicos como o 5-Fluorouracilo, a cis-Pt e o Paclitaxel.(187)

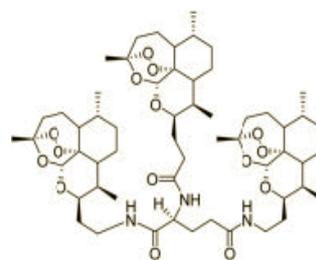


Figura I-26: Estrutura química do trímero de ART. Adaptado de Nam et al.(187)

A natureza da ligação entre os monómeros, a lipofilicidade e as substituições eletrofílicas são características que têm estado associadas à elevada atividade destes derivados da ART. Em alguns estudos é dado algum relevo a importância e influência da natureza e da estereoquímica da ligação entre os monómeros de análogos de ART, na atividade anticancerígena.(172)

Têm sido realizados grandes progressos no design/conceção de novos compostos, com uma maior potência (na ordem dos nM), com maior seletividade e com baixa toxicidade *in vitro*. Exemplos disto são as ARTs substituídas com um grupo triazolilo, com um elevado poder de inibição do crescimento celular. Nestes compostos, independentemente da regioquímica e da estereoquímica, a inibição é influenciada pelo grupo funcional que se encontra ligado ao anel triazolílico.

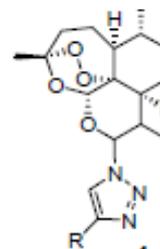


Figura I-27: Estrutura química geral das ARTs substituídas com um grupo triazolilo. Adaptado de Crespo-Ortiz et al.(172)

É de referir também, os compostos com um grupo pentilbenzeno, que exibiram uma elevada atividade inibitória no crescimento celular. (172)

2.6.1.5. Possíveis alvos moleculares nas células tumorais para os análogos da ART

As ARTs interferem com uma variedade de vias de sinalização nas células tumorais. O TLR4 apresentou-se como um possível alvo nas vias de sinalização do recetor tipo Toll e na via de sinalização PI3K-Akt, sugerindo uma correlação entre estas duas vias que pode resultar na regulação da imunidade de modo cooperativo. O antígeno CD4, presente na superfície dos linfócitos T, é outra molécula passível de sofrer o efeito da ART, na via do recetor das células T, o que torna a influência das ARTs superior nas células T CD4⁺. Além disso, outro estudo referiu que o recetor do fator de crescimento derivado das plaquetas é um possível alvo na via de sinalização do PI3K-Akt, uma vez que interage com as ARTs. (173)

A proteína reguladora de tradução (TCTP), presente quer no parasita causador da Malária quer nas células tumorais, também parece ser um possível alvo vantajoso. Foi demonstrado que as células tumorais com elevados níveis de expressão da TCTP são mais sensíveis ao AS, enquanto que uma baixa expressão de TCTP foi associada à resistência ao AS. Esta proteína está relacionada com a proliferação celular e é dependente da ligação ao cálcio, associando-se transientemente aos microtúbulos durante o ciclo celular. (165)

II – Síntese e atividade de peróxidos com potencial atividade farmacológica

No âmbito deste trabalho foi realizada uma componente laboratorial. Embora não prevista nos objetivos e âmbito da monografia do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, a vontade de proceder à síntese de compostos bioativos surgiu como uma consequência da investigação bibliográfica realizada. A oportunidade foi facultada pelo grupo de Síntese e Reatividade Orgânica do CCMAR, onde é realizada investigação na área de Química Medicinal. Neste âmbito, o grupo tem vindo a desenvolver vários projetos de investigação centrados na concepção, síntese e bioatividade de peróxidos semi-sintéticos e sintéticos com atividade farmacológica contra infeções causadas por parasitas protozoários. O trabalho de investigação realizado pela autora enquadra-se num destes projetos.

Neste capítulo descreve-se todo o trabalho experimental efetuado pela autora no âmbito do projeto de investigação supra referido, e respectivo enquadramento.

1. Introdução/Objetivo do projeto de investigação

Foi referido no Capítulo I que os peróxidos derivados de ART, e outros compostos de origem sintética que incluem a função peróxido como farmacóforo, são ou podem vir a ser aplicados no tratamento de infeções parasitárias e, possivelmente, também no tratamento de infeções virais e de alguns tipos de cancro. Assim, o desenvolvimento de peróxidos com melhores propriedades farmacocinéticas e que atuem seletivamente nas células cancerígenas permanece um tópico de investigação muito relevante. É também evidente a necessidade de novas investigações na procura e identificação de estratégias mais efetivas para o tratamento do cancro. Tendo em conta os resultados de atividade antineoplásica de alguns compostos da família das ARTs, e os progressos realizados ao nível do conhecimento biológico dos mecanismos de desenvolvimento da doença, a aposta em novos compostos da classe dos peróxidos pode fornecer estratégias quimioterapêuticas adequadas para o tratamento de neoplasias. (169,172)

Na tentativa de ultrapassar algumas limitações apresentadas pelos derivados semissintéticos da ART usados em regime de monoterapia ou terapias de combinação, nomeadamente o desenvolvimento de resistências *in vitro* e *in vivo* pelo parasita causador de Malária e o facto de ser necessária a extração da ART

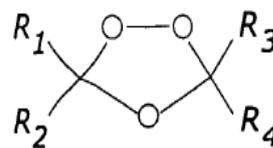


Figura II-1: Estrutura química geral de 1,2,4-trioxolanos. Adaptado de Vennerstrom et al.(190)

de uma fonte natural, com um rendimento de extração baixo, foram sintetizados espiro e dispiro 1,2,4-trioxolanos (figura II-1), 1,2,4-trioxanos e 1,2,4,5-tetraoxanos, com o objetivo de desenvolver novos fármacos para a profilaxia e tratamento da Malária. Estes novos peróxidos são estruturalmente mais simples, mais fáceis de sintetizar e mais baratos, podendo ser utilizados em regime de monoterapia ou em conjugação com anti maláricos convencionais. Ainda não existe informação de desenvolvimento de resistência por parte do parasita relativamente a trioxolanos sintéticos. Comparando trioxanos, trioxolanos e tetraoxanos, os trioxolanos são os preferidos em termos de acessibilidade, uma vez que é possível a preparação de uma diversidade de compostos não simétricos e aquirais. (190)

Em 2001, Vennerstrom et. al prepararam uma biblioteca de trioxolanos com variabilidade estrutural, que foram testados *in vitro* em modelos de eritrócitos infetados com estirpes de *Plasmodium*. Os estudos de relação estrutura/atividade permitiram extrair algumas indicações acerca dos requisitos estruturais mais favoráveis a uma boa atividade farmacológica. Verificou-se que os trioxolanos com maior impedimento estérico em qualquer posição do heterociclo (R1,R2,R3,R4; Figura II-1) apresentam uma maior estabilidade química e metabólica e uma maior atividade *in vivo*. Este impedimento estérico deve ser preferencialmente exercido por um grupo espiro cicloalquilo, em R3 e R4, não substituído ou mono-, di- ou poli-substituído nos carbonos em posição 5 e 12, como por exemplo um ciclohexano.(190)

O substituinte preferencial em posição R1 e R2 é um espiro adamantano, que protege o anel trioxolano, evitando decomposição química e metabólica prematuras. Nas posições R3 e R4, a presença de um anel espirociclohexano substituído ou funcionalizado em posição 4 conduz a bons resultados de atividade(figura II-2).(190)

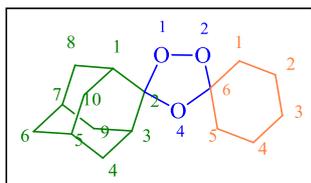


Figura II-2: Estrutura química preferencial dos 1,2,4-trioxolanos, com o substituinte adamantano em posição R1 e R2 e com o substituinte ciclohexano em posição R3 e R4.

Outra opção que se revelou viável é a presença de um anel espiropiperidílico, funcionalizado ou substituído no átomo de azoto. A existência de um grupo amida, ou de um substituinte contendo o referido grupo, ligado ao carbono em posição 4 do ciclohexano, permite uma melhor absorção oral, melhora a atividade antimalárica e a farmacocinética dos compostos. A potência antimalárica revelou ser superior para compostos com o anel espirociclohexano substituído no carbono em posição 2. A estabilidade metabólica é favorecida pela introdução de um grupo alquila (metilo ou etilo) que faz a conexão do substituinte ao carbono na posição 4 do anel ciclohexano. Os trioxolanos não simétricos e aquirais são os que conduzem a melhores resultados.(190)

Estes espiro e dispiro trioxolanos também podem ser uma mais valia no tratamento do cancro, pois apresentam um endoperóxido na sua estrutura. Assim, estes compostos são mais seletivos para as células cancerígenas, por nestas ocorrer preferencialmente, a acumulação de uma quantidade elevada de radicais livres.(190)

Tendo em conta os dados de investigações anteriores disponíveis na literatura, procedeu-se à síntese de novos peróxidos com estruturas otimizadas, com o objetivo de avaliar a sua atividade anti parasítica e utilidade no tratamento da Malária e Leishmania, e o seu potencial citotóxico em linhas de células tumorais. Procedeu-se assim à síntese de uma série de compostos da família dos trioxolanos, com possível aplicação nestas áreas. Actualmente, alguns destes compostos estão a ser avaliados relativamente à sua atividade e toxicidade, em estudos *in vitro* e *in vivo*, usando vários modelos.

As abordagens à síntese dos compostos-alvo preparados e as reações efetuadas ao longo do trabalho laboratorial desenvolvido encontram-se representados nas figuras II-4, II-5, II-6, II-7 e II-8. Os resultados de atividades disponíveis serão também apresentados e discutidos.

1.1. Estratégias de síntese e compostos alvo preparados

Face à informação bibliográfica disponível, e no sentido da otimização e diversificação estrutural, pretendeu-se preparar uma pequena biblioteca de trioxolanos com a estrutura geral representada na figura II-3.

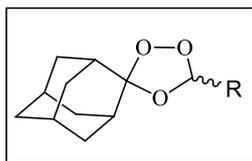


Figura II-3 Estrutura química geral dos trioxolanos sintetizados (R = grupo espirocicloalquilo mono-, di- ou poli- substituído nos carbonos C5 e C12 ou heterociclo).

A primeira etapa consistiu na preparação dos blocos de síntese intermédios, nomeadamente o composto MIS1/LC29, uma metiloxima de adamantanona (figura II-4) que serviu de reagente para as subsequentes reações de ozonólise para a síntese dos 1,2,4-trioxolanos pretendidos, o composto MIS2/LC133 (figura II-4), 1-fenil-tetrazolona, que também foi usado como reagente numa posterior reação de ozonólise, e o composto MIS3/LC64, uma amina primária seletivamente protegida (figura II-4). Este último foi sintetizado na tentativa de posteriormente se proceder ao acoplamento peptídico com o composto MIS11/LC68 e com o composto MIS5/LC50. No entanto, a escassez do tempo disponível para a conclusão do trabalho prático tornou impossível a realização destas últimas reações, que poderão vir a ser realizadas em trabalhos futuros.

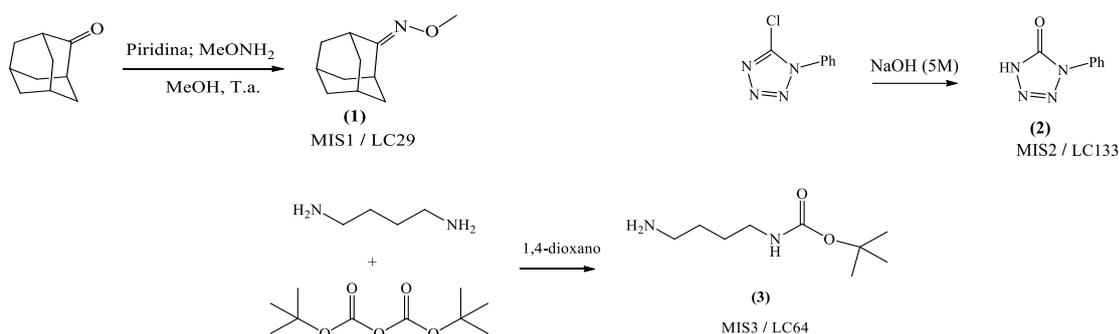


Figura II-4: Esquema de síntese da adamantil-metil-oxima (1), da 1-fenil-tetrazolona (2) e do tert-butil-N-(4-aminobutyl)carbamato (3).

Os compostos MIS4/LC67 (figura II-5), MIS5/LC50 (figura II-6) e MIS6/LC90 (figura II-7) foram obtidos por ozonólise. A adamantil-metil-oxima, MIS1/LC133, foi usada como composto intermédio para as reações que originaram os referidos trioxolanos.

Tal como mencionado anteriormente, os substituintes preferenciais são uma espiro adamantanona nas posições R1 e R2 dos 1,2,4-trioxolanos e um espirociclohexilo nas posições R3 e R4. Assim, e de acordo com a estrutura modelo, (figura II-3) quase todos os reagentes utilizados nas reações de acoplamento via ozonólise adamantil-metil-oxima para a preparação do trioxolano correspondente são baseados na ciclohexanona, excetuando um, que usa a tetrazolona como bloco para acoplamento

Para obter o alvo MIS4/LC67 fez-se reagir o composto MIS1/LC133 com o 4-oxociclohexilcarboxilato de etilo, um anel de ciclohexilo funcionalizado com um grupo éster, no carbono que se encontra em posição 4. O composto MIS4/LC67 é de especial importância por constituir um trioxolano chave na síntese de outros compostos alvo. O grupo éster obtido pode ser transformado, usando diferentes reações, para obter o álcool, e o ácido carboxílico correspondentes (MIS8/LC93 e MIS11/LC68, respetivamente), que foram aplicados na síntese de outros compostos finais pretendidos (figura II-5).

O composto MIS8/LC93 foi sintetizado a partir do éster correspondente (MIS4/LC67), através de uma reação de redução. O álcool obtido serviu de intermediário chave para a síntese dos compostos-alvo MIS9/LC94 e MIS10/LC95. Para isso, fez-se reagir o álcool MIS8/LC93 com uma ftalimida para se obter o trioxolano funcionalizado em posição 4 com uma metilftalimida, MIS9/LC94 (figura II-5). Esta síntese foi feita na tentativa de preparar trioxolanos com propriedades farmacocinéticas otimizadas pois, como já referido um substituinte amida no carbono 4 do ciclohexano confere uma boa absorção oral e melhora as propriedades farmacocinéticas.

Partindo do derivado de ftalimida MIS9/LC94 procedeu-se à síntese da amina correspondente, MIS10/LC95 (figura II-5). O novo produto apresenta um anel ciclohexano substituído no carbono 4 com uma metilamina. Tal como referido, a presença de um grupo metileno entre o grupo funcional substituinte e o carbono em posição 4 do ciclohexilo pode aumentar a estabilidade química e metabólica do trioxolano.

O composto MIS11/LC68 foi obtido por hidrólise do intermediário éster ao ácido carboxílico correspondente (MIS4/LC67) (figura II-5).

Partindo do ácido carboxílico MIS11/LC68, procedeu-se à síntese de uma amida por reação com butilamina (acoplamento peptídico). Desta reação resultou o trioxolano MIS12/LC92 (figura II-5). Esta síntese foi levada a cabo por, anteriormente, o grupo

amida ter sido referenciado como um substituinte preferencial nesta posição do ciclohexilo.

Futuramente, podem ser sintetizados outros compostos desta classe, com algumas modificações ao nível de grupos funcionais, partindo dos compostos preparados, no sentido de ampliar a biblioteca de trioxolanos cuja estrutura geral está representada na figura II-3, para aprofundar a investigação da influência de alterações estruturais na atividade.

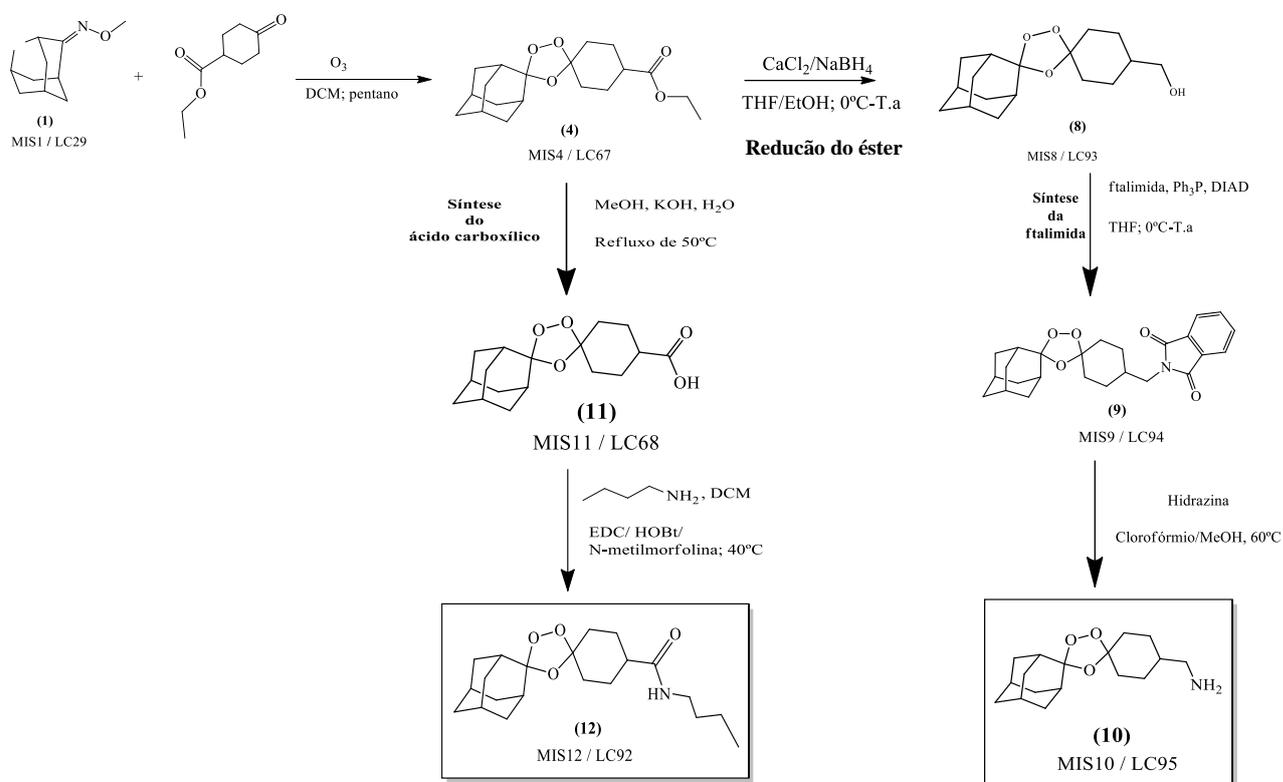


Figura II-5: Esquemas sintéticos do trabalho experimental: Síntese dos trioxolanos por ozonólise (1-4). Via sintética para a preparação da amina primária (4-10); Síntese do ácido carboxílico (4-11); Síntese de um composto alvo (11-12).

O trioxolano MIS5/LC50 (figura II-6) contém, nas posições R3 e R4, um anel espirociclohexano funcionalizado em posição 4 com um grupo carbonilo.

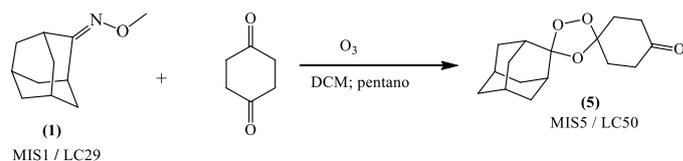


Figura II-6: Esquema da síntese de MIS5/LC50, por ozonólise.

O composto MIS6/LC90 (figura II-7) resultante de uma reação de ozonólise apresenta, nas posições R3 e R4, um anel espirociclohexilo sem qualquer outro

substituinte. A síntese deste composto pode servir como modelo na avaliação do efeito de substituintes em posição 4 do anel espirociclohexilo, na atividade.

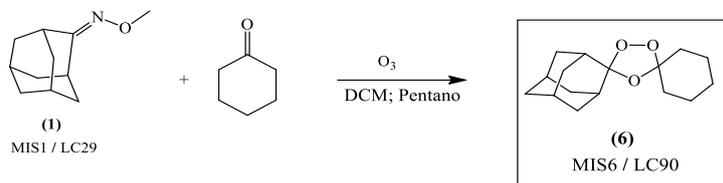


Figura II-7: Esquema da síntese de MIS6/LC90, por ozonólise.

Os derivados do tetrazole apresentam propriedades biológicas muito interessantes. Além de serem conhecidos pela sua estabilidade metabólica, encontram-se na literatura descrições de vários derivados de tetrazole com atividade farmacológica potencial num leque de enfermidades. São conhecidos derivados de tetrazole com atividade, anti bacteriana, anti fúngica, anti convulsiva, analgésica, anti-inflamatória, anti tuberculótica e anti cancerígena.(180,181) O elevado poder electroatrator do anel de tetrazole torna possível o estabelecimento de ligações por pontes de hidrogénio, através dos seus átomos de azoto como dadores, com átomos de hidrogénio pertencentes a grupos funcionais de moléculas que se encontrem próximas, incluindo os pertencentes a resíduos de aminoácidos no sítio ativo de enzimas. Os tetrazóis têm ainda a capacidade de coordenar com metais.(191) Foi descrito que a combinação do 5-feniltetrazol com outros heterociclos permite a síntese de novos compostos com um perfil farmacológico diferente, com uma maior eficácia terapêutica como agentes antineoplásicos, e com uma menor toxicidade para tecidos normais. Estas características foram atribuídas ao facto de as moléculas sintetizadas apresentarem mais do que um grupo farmacologicamente ativo, com mecanismos de ação diferentes, o que pode ser benéfico para o tratamento do cancro. (180,192)

No sentido de avaliar o efeito da ligação do heterociclo tetrazole ao endoperóxido, preparou-se o composto MIS7/LC28 por ozonólise. Obteve-se um trioxolano que, em posição R3 e R4, possui uma espirofeniltetrazolina, MIS7/LC28 (figura II-8). Este trioxolano permite avaliar a alteração na atividade da substituição do carbociclo presente no composto MIS6/LC90 (figura II-7) pelo heterociclo tetrazole, fortemente electroatractor.

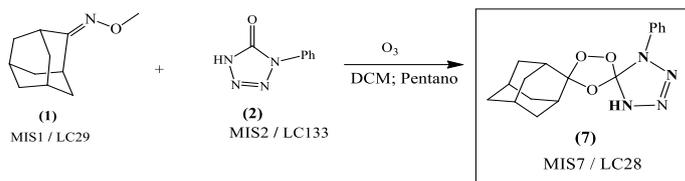


Figura II-8: Esquema da síntese de MIS7/LC28, por ozonólise.

2. Materiais e Métodos

Em geral, os compostos de partida foram utilizados tal como comercialmente fornecidos. Alguns dos solventes usados, tetrahidrofurano (THF), diclorometano (DCM) e metanol, foram submetidos a secagem, usando os procedimentos descritos na literatura.(193) O DCM foi seco com cloreto de cálcio, o metanol com magnésio, usando iodo como indicador, e o THF com sódio metálico, usando benzofenona como indicador.

De uma forma geral, as reações foram realizadas em ambiente anidro, sob uma atmosfera de azoto. As reações de redução usando hidrogénio molecular decorreram sob atmosfera deste gás.

O ozono utilizado nas reações de ozonólise foi produzido usando um gerador Sander Labor-Ozonizator 301.7 (0.5 L/min O₂, 140 V).

A caracterização dos compostos sintetizados efetuou-se recorrendo às seguintes técnicas: ponto de fusão, espectrometria de massa e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). A identificação de compostos já conhecidos e caracterizados foi realizada por comparação dos respetivos pontos de fusão e espectros de ressonância magnética nuclear ou de massa.

Os pontos de fusão, não corrigidos, foram obtidos num aparelho “Melting Point Apparatus SMP3, da Bibby Stuart Scientific”.

Os dados de análises por RMN e espectrometria de massa foram fornecidos pelo serviço de análises do laboratório REQUIMTE existente no Departamento de Química e Bioquímica da Universidade Nova de Lisboa.

As análises por espectrometria de massa (EM) foram efetuadas num espectrómetro Micromass LCT Mass Spectrometer.

Os espectros de RMN dos compostos preparados, em solução, foram obtidos num espectrómetro Bruker 400 AC (400 MHz), usando solventes deuterados. O tetrametilsilano (TMS) foi usado como padrão interno para a determinação dos desvios

químicos. Os espectros foram obtidos recorrendo ao software MestReNova[®] V6.0.2-5475 e ChemDraw[®] V12.0.2.1076.

O acompanhamento e controlo das reações foi efetuado por cromatografia em camada fina (“Thin Layer Chromatography”, TLC), usando placas de sílica gel 60 F254 (AL TLC 20x20; MERCK), e recorrendo a um eluente (fase móvel) apropriado à reação em causa.

As estruturas químicas apresentadas referentes às reações realizadas foram desenhadas utilizando o software ChemDraw[®] V12.0.2.1076.

Foram efetuados testes de atividade *in vitro* com alguns dos compostos sintetizados nas estirpes de *P. falciparum* referidas. Estes testes foram executados no Centro de Malária e outras Doenças Tropicais, Instituto de Higiene e Medicina Tropical de Lisboa, Universidade Nova de Lisboa, sob orientação da Doutora Fátima Nogueira.

3. Procedimentos de síntese e caracterização dos compostos obtidos

3.1. Síntese da adamantil metil oxima (MIS1/LC29) - Figura II-4: A uma solução de 2-adamantanona (14,05g; 93,3 mmol) em metanol seco (15ml), sob agitação, adicionou-se piridina e por fim hidrocloreto de metoxilamina, muito lentamente. A mistura permaneceu sob agitação durante dois dias. A reação foi controlada por TLC, usando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo (9:1). Após e monitorizando o desaparecimento da mancha correspondente à 2-adamantanona. No final, evaporou-se o solvente e fez-se a extração do produto orgânico com DCM. A fase orgânica foi tratada com solução aquosa de HCl (2M; 40 mL), com solução aquosa de NaCl (30 mL) e com água destilada. Secou-se o extrato orgânico com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente até à secura.(190) Obteve-se um sólido branco, correspondente ao composto pretendido (16,47g, 98,5%). P.f: 69-70°C; ¹H RMN (400MHz;CDCl₃): δ 1.78-1.97 (12H, m), 2.53 (1H, s), 3.45 (1H, s), 3.81 (3H, s); HRMS (MALDI-TOF) m/z: [M⁺] Calcd para C₁₁H₁₇NO 179,13; Encontrado a 180,02 [M+H]⁺.

3.2. Síntese de 1-fenil-tetrazolona (MIS2/LC133) - Figura II-4: Adicionou-se 5-cloro-1-feniltetrazole (500 mg; 4,16 mol) a uma solução aquosa de NaOH 5M. A mistura permaneceu sob agitação de um dia para o outro. A reação foi controlada por TLC, usando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo (7:3). Após

desaparecimento da mancha relativa ao composto de partida adicionou-se à mistura reacional HCl concentrado, gota a gota, até obter pH 1, e esperou-se a formação de um precipitado.(194) Obtiveram-se cristais brancos brilhantes (0,67g; 90%). P.f: 97-99°C; ¹H RMN (400MHz; CDCl₃) ppm: δ 7.70 (d, 1H, J=7.7Hz), 7.57 (m, 2H), 7.66 (s, 1H); HRMS (IE) m/z: [M]⁺ Calcd para C₇H₆N₄O 162,05; Encontrado a 162,05.

3.3. Síntese de *tert*-butil- N-(4-aminobutil)carbamato (MIS3/LC64) -

Figura II-4: A uma solução de carbonato de di-*tert*-butilo (5,46 g; 25 mmol) em 1,4-dioxano (70 mL), sob agitação, foi adicionada, com a ajuda de uma cânula, uma solução de 1,4-diaminobutano (12,34 g; 0,14 mol) em 1,4-dioxano (100 mL), durante três horas. A mistura reacional permaneceu sob agitação, à temperatura ambiente, sob atmosfera de azoto. A reação foi controlada por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (6:4). Após cerca de 24 horas, verificou-se o desaparecimento da mancha correspondente ao carbonato de di-*tert*-butilo. Evaporou-se o solvente e adicionou-se água até à precipitação do dímero (di-*tert*-butil-N-(4-aminobutil)carbamato). Filtrou-se, e fez-se a extração do filtrado recolhido com DCM. Secou-se o extrato orgânico com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente.(195) Obteve-se um óleo incolor (4,56 g, 97%). ¹H RMN (400MHz; CDCl₃) ppm: δ 1.42 (s, 9H), 1.48 (d, 4H, J=1.9Hz), 2.71 (s, 2H), 3.10 (s, 2H). HRMS (MALDI-TOF) m/z: [M]⁺ Calcd para C₉H₂₀N₂O₂ 188,15; Encontrado a 189,17 [M+H]⁺.

3.4. Procedimento geral para a síntese de 1,2,4- trioxolanos

O método mais comum de acoplamento por ozonólise envolve a reação de ozono com compostos insaturados, como a ozonólise de alcenos e a ozonólise de alquinoximas, na presença de compostos contendo pelo menos um grupo carbonilo. (166)

No presente trabalho, aplicou-se o método de ozonólise reportado por *K.Griesbaum* na síntese dos compostos MIS4/LC67, MIS5/LC50, MIS6/LC90 e MIS7/LC28. Esta estratégia permite a síntese de ozonídeos tetrasubstituídos, através da reação entre oximas, cetonas e ozono (Figura II-9).(190)

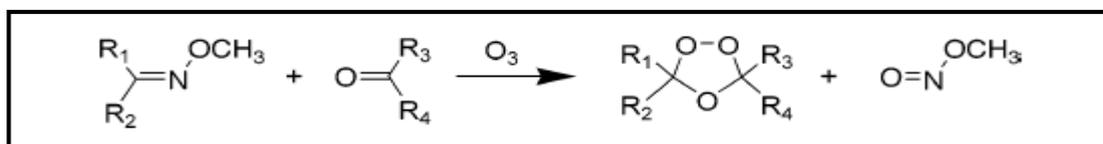


Figura II-9: Esquema do método de ozonólise de Griesbaum, adaptado de Tang, Y et al. (196)

Esta via de síntese, que envolve oximas, tem uma vasta aplicação e permite a síntese seletiva de 1,2,4-trioxolanos simétricos e não simétricos, o que não é possível através da ozonólise direta de alcenos ou enol éteres na presença de compostos carbonílicos.(190) Além disso, a síntese dos compostos iniciais que servem de reagentes para acoplamento é mais fácil, por não ser necessário usar alcenos tetrasubstituídos ou enol éteres, mais difíceis de sintetizar.(166,190) Através desta via de síntese é possível conseguir seletividade na obtenção dos trioxolanos desejados, e os rendimentos são, em geral, elevados. Os solventes preferenciais são hidrocarbonetos como, o pentano ou o ciclohexano, pois o aumento da polaridade dos solventes condiciona o rendimento da reação.(190) Este método é extensamente usado na síntese de 1,2,4-trioxolanos, por permitir obter bibliotecas com diversidade estrutural dos produtos finais.(166)

Os trioxolanos alvo foram preparados a partir da adamantil metil oxima (MIS1/LC29) e de derivados da ciclohexanona (MIS4/LC67, MIS5/LC50, MIS6/LC90) ou com derivados da tetrazolona (MIS7/LC28), através de uma reação de ozonólise, usando ozono. Depois de produzido, o ozono, foi passado por uma solução de DCM a -78°C e sujeito ao fluxo de uma solução de adamantil metil oxima da cetona, em pentano/DCM (6:4) a 0°C. Seguidamente, a solução foi sujeita a um fluxo de azoto durante cinco minutos e concentrada a pressões baixas e a temperatura ambiente, para dar um produto que, posteriormente, foi purificado por cromatografia em coluna.

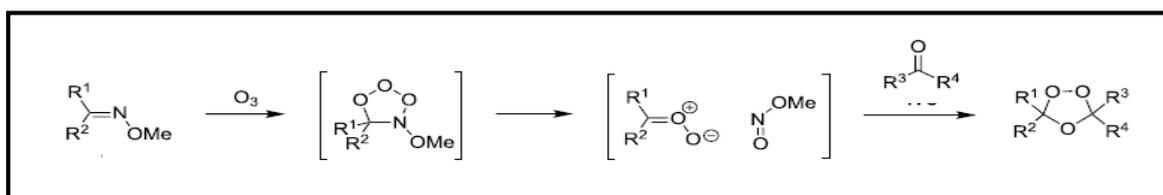


Figura II-10: Esquema do processo de ozonólise. Síntese de 1,2,4-trioxolanos através do método de Griesbaum et.al. Adaptado de Terent'ev et.al.(166)

3.4.1. Síntese do trioxolano MIS4/LC67 - Figura II-5: Uma solução de MIS1/LC29 (15g; 83,7 mmol) e etil 4-oxociclohexanocarbonato (10,6 mL; 66,5 mmol) em DCM e pentano (2:8) foi tratada com ozono (como descrito no procedimento geral). A reação foi controlada por TLC, usando hexano e acetato de etilo (8:2) como mistura de eluição. Após o desaparecimento da mancha correspondente a MIS1/LC29, evaporou-se o solvente e purificou-se o produto recorrendo a uma cromatografia em coluna de sílica gel, usando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo (8,5:1,5). Recolheram-

se duas frações: a primeira correspondente ao oxociclohexanocarbonato, e a segunda correspondente ao produto desejado. Obteve-se um óleo incolor (10,57 g, 38%).¹H RMN (400 MHz; CDCl₃): δ 1.26 (3H, t, J=6.9Hz), 1.70-1.76 (11H, m), 1.92-2.03 (12H, m), 2.33 (1H, m), 4.15 (2H, dd, J=7.2Hz, J=14.3Hz). HRMS (MALDI-TOF) m/z: calcd para C₁₉H₂₈O₅ 336,19; encontrado a 359,24 [M + Na]⁺.

3.4.2. Síntese do trioxolano MIS5/LC50 - Figura II-6: Realizou-se a ozonólise da ciclohexadiona (4,38 g; 39,1 mmol) com MIS1/LC29 (5 g; 27,9 mmol) adaptando o procedimento descrito anteriormente. O controlo da reação foi efetuado por TLC, usando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo (8:2). Ao fim de 50 minutos observou-se o desaparecimento da mancha correspondente a MIS1/LC29. Para a purificação do produto por cromatografia em coluna de sílica gel, usou-se hexano e acetato de etilo (9,5:0,5) como mistura de eluição.¹H RMN (400 MHz; CDCl₃): δ 1.69-2.14 (14H, m), 2.14 (4H, t, J=7.0Hz), 2.51 (4H, t, J=7.0Hz). HRMS (ESI-TOF) m/z: calcd para C₁₆H₂₂O₄ 278,15; encontrado a 278,9 [M]⁺.

3.4.3. Síntese do trioxolano MIS6/LC90 - Figura II-7: Efetuou-se a ozonólise da ciclohexanona (1,2 mL; 11,6 mmol) com MIS1/LC29 (2g; 11,2 mmol) seguindo o procedimento aplicado anteriormente. O controlo da reação foi efetuado por TLC, usando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo (9,5:0,5). Ao fim de 50 minutos observou-se o desaparecimento da mancha correspondente a MIS1/LC29. Para a purificação do produto por cromatografia em coluna de sílica gel, usou-se hexano e acetato de etilo (9,8:0,2) como mistura de eluição.¹H RMN (400 MHz; CDCl₃): δ 1.97-1.25 (24H, m). HRMS (EI) m/z: calcd para C₁₆H₂₄O₃ 264,17; encontrado a 264,27 [M]⁺.

3.4.4. Síntese do trioxolano MIS7/LC28 - Figura II-8: Efetuou-se a ozonólise da 1-fenil-tetrazolona (1,8 g; 11,2 mmol) com MIS1/LC29 (2g;11,2mmol) seguindo o procedimento aplicado anteriormente. O controlo da reação foi efetuado por TLC, usando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo (8:2). Ao fim de 45 minutos observou-se o desaparecimento da mancha correspondente a MIS1/LC29. Para a purificação do produto por cromatografia em coluna de sílica gel usou-se hexano e acetato de etilo (9,5:0,5) como mistura de eluição.¹H RMN (400 MHz; CDCl₃): δ 1.69-2.14 (14H,

m), 2.14 (4H, t, J=7.0Hz), 2.51 (4H, t, J=7.0Hz). HRMS (MALDI-TOF) m/z: calcd para $C_{17}H_{20}N_4O_3$ 328,15; encontrado a 362,23 $[M+Cl]^-$.

3.5. Procedimento geral para a síntese da amina primária: cis-adamantano-2-espiro-8-(aminometil)-1-2-4-trioxaspirodecano (MIS10/LC95).

Esta via sintética envolve três reações (figura II-5) que são iniciadas pela conversão do éster (MIS4/LC67) em álcool (MIS8/LC93) através de uma reação de redução. Posteriormente, o álcool é utilizado para a síntese da ftalimida (MIS9/LC94), que num último passo é transformada em amina primária (MIS10/LC95).

3.5.1. Redução do éster a álcool (MIS8/LC93) - Figura II-5: Num balão, dissolveu-se $CaCl_2$ (3,92 g; 35,7 mmol) em THF seco (60 mL) e colocou-se o balão contendo a mistura sobre um banho de gelo. Adicionou-se o composto MIS4/LC67 (6 g; 17,8 mmol) dissolvido em EtOH seco (60 mL) e deixou-se a mistura final em agitação durante cerca de 30 minutos. Em seguida adicionou-se $NaBH_4$ (2,72 g; 71,3 mmol) e deixou-se reagir à temperatura ambiente. Controlou-se a reação por TLC, usando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo (8:2). Após 48 horas de reação, observou-se o desaparecimento da mancha correspondente a MIS4/LC67. Evaporou-se o solvente, adicionou-se água e extraiu-se com DCM. Em seguida colocou-se a fase orgânica na ampola, adicionou-se uma solução de bicarbonato de sódio (200mL; 3M), para remover o excesso de $CaCl_2$ e de $NaBH_4$, e extraiu-se a fase orgânica. Secou-se e evaporou-se a fase orgânica até à secura para se obter o produto.(190) Obteve-se um sólido branco (3,86g; 74%). P.f.: 99°-100°C. 1H RMN (400 MHz; $CDCl_3$): δ 1.25 (2H, m), 1.51-2.08 (21H, m), 3.46 (2H, t, J=4.8Hz). HRMS (MALDI-TOF) m/z calcd para $C_{17}H_{26}O_4$ 294,18; encontrado a 318,30 $[M+Na]^+$.

3.5.2. Conversão do álcool (MIS8/LC93) no derivado de ftalimida (MIS9/LC94) - Figura II-5: Arrefeceu-se uma solução de MIS8/LC93 (3g; 10,2 mmol) em THF seco (25 mL), até aos 0°C. Adicionou-se de modo gradual trifetilfosfina (3,89 g; 14,8 mmol), ftalimida (1,65 g; 11,2 mmol) e di-isopropil azodicarboxilato (3,01 g; 14,8 mmol). A mistura permaneceu sob agitação, à temperatura ambiente, durante 24 horas. Removeu-se o excesso de solvente, dissolveu-se o precipitado obtido em DCM e etanol e deixou-se cristalizar o produto.(190) Obtiveram-se cristais brancos (1,78g; 41%). P.f.: 130°-133°C. 1H RMN ($CDCl_3$): δ 1.30-1.34 (2H, m), 1.51-2.08 (21H, m), 3.55 (2H, d,

J=7.0Hz), 7.71 (2H, d, J=8.0Hz), 7.84 (2H, d, J=7.9Hz). HRMS (MALDI-TOF) m/z calcd para $C_{25}H_{29}NO_5$ 423,20; encontrado a 446,19 e a 462,19, $[M+Na]^+$ e $[M+K]^+$, respectivamente.

3.5.3. Síntese da amina primária (MIS 10/LC95) a partir da ftalimida (MIS9/LC94) - Figura II-5: Aqueceu-se uma solução de MIS9/LC94 (1,76 g; 4,16 mmol) e hidrazina monohidratada (0,8 g; 25 mmol) em clorofórmio (40 mL) e metanol (20 mL) a 60.°C, durante 48 horas. Arrefeceu-se a mistura até à temperatura ambiente e filtrou-se, para remover o filtrado sólido. Lavou-se o filtrado líquido com uma solução saturada de cloreto de sódio e com água, secou-se com $MgSO_4$, filtrou-se e evaporou-se o solvente sob vácuo. (190) Obteve-se um sólido amarelo (0,7g; 58%). P.f.: 140°-142°C. 1H RMN ($CDCl_3$): δ 1.14-1.33 (3H, m), 1.68-1.96 (22H, m), 2.54 (2H, d, J=6.4Hz). HRMS (MALDI-TOF) m/z: calcd para $C_{17}H_{27}NO_3$ 293,20; encontrado a 293,20 $[M]^+$.

3.6. Síntese do ácido carboxílico (MIS11/LC68) a partir do éster (MIS4/LC67)- Figura II-5: Dissolveu-se o composto MIS4/LC67 (3,5 g; 10,4 mmol) em metanol (50 mL) e adicionou-se uma solução de KOH 3M(2,92g;52,17 mmol) em água (17 mL). A reação permaneceu em refluxo a 50°C, sob agitação. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo (7:3). Após 72 horas de reação, verificou-se o desaparecimento da mancha correspondente a MIS4/LC67. A extração do composto foi efetuada com DCM. Acidificou-se o pH até ao valor de 1 e extraiu-se novamente. Secou-se o extrato orgânico com sulfato de magnésio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente. Purificou-se o produto por, cromatografia em coluna de sílica gel, usando hexano e acetato de etilo (8,5:1,5) como mistura de eluição. Recolheram-se duas frações, sendo a segunda correspondente ao produto desejado.(190) Obteve-se um sólido beije (2,61g; 81%). P.f.: 158°-159°C. 1H RMN (400 MHz; $CDCl_3$): δ 1.25 -1.31 (3H, m), 1.68-2.1 (19H, m), 2.37 (1H, m). HRMS (ESI-TOF) m/z: calcd para $C_{17}H_{24}O_5$ 308,16; encontrado a 306,85 $[M]^-$.

3.7. Procedimento geral para síntese de amidas

A síntese de amidas, frequentemente usada na preparação de compostos farmacêuticos, pode ser efetuada por acilação de aminas com ácidos carboxílicos ativados. O processo envolve uma condensação da amina com o ácido carboxílico mas este é previamente convertido num éster ativo. Este processo é frequentemente designado

por acoplamento peptídico, embora este tipo de ligações não seja exclusivo das proteínas. Durante a preparação de amidas, é essencial a existência de um ambiente anidro no meio reacional para evitar a formação de produtos não esperados, uma vez que a água pode atuar como nucleófilo, comprometendo o sucesso da reação. Para a realização deste tipo de reações usa-se como um dos reagentes 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), que permite a ativação do grupo carboxilo para que a reação seja mais rápida com a amina primária. Com o intuito de reduzir a reatividade deste intermediário, evitar a ocorrência de reações secundárias e aumentar o rendimento da reação, utilizou-se o hidroxibenzotriazole (HOBt), que permite originar um éster menos reativo. O EDC também funciona como agente secante reagindo com a água e formando uma ureia. Deste modo, a água é removida à medida que se forma. Assim, evita-se a formação de produtos secundários e desloca-se a reação no sentido pretendido. A N-metilmorfolina, funciona como base, removendo o hidrogênio do grupo carboxílico, o que facilita a reação do grupo carboxilato com o EDC.

3.7.1. Síntese da amida a partir do ácido carboxílico (MIS12/LC92) -

Figura II-5: Dissolveu-se MIS11/LC68 (1g; 3,24 mmol), EDC (0,93g; 4,86 mmol) e HOBt (0,65g; 4,86 mmol) em DCM (20 mL) e N-metilmorfolina (0,82g; 8,1 mmol). Deixou-se a mistura sob agitação e controlou-se a reação por TLC, usando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo (7:3), até ao desaparecimento da mancha correspondente ao MIS11/LC68 (cerca de três horas). Adicionou-se então a amina (0,36g; 4,86 mmol) à mistura anterior, muito lentamente. A mistura reacional permaneceu sob agitação, sob atmosfera de azoto, durante cerca de 24 horas. Controlou-se a reação por TLC, usando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo (7:3), até ao aparecimento da mancha correspondente ao produto. Evaporou-se o solvente e purificou-se o produto, recorrendo-se a uma cromatografia em coluna de sílica gel, usando hexano e acetato de etilo (7:3) como mistura de eluição.(197) Obteve-se um sólido amarelo (0,23g; 39%). P.f.: 110°-113°C. ¹H RMN (400 MHz; CDCl₃): δ 0.90 (dd, 6H, J=7.0Hz, J=14.9Hz), 1.26 (d, 11H, J=10.0Hz), 1.70 (d, 6H, J=9.4Hz), 1.97 (d, 6H, J=9.4Hz), 2.10 (s, 2H), 3.23 (dd, 2H, J=6.1Hz, J=12.5Hz). HRMS (ESI-TOF) m/z: calcd para C₁₇H₂₀N₄O₃ 363,24; encontrado a 364,23 [M]⁺.

4. Resultados e Discussão

De acordo com a literatura, todos os ozonídeos sintetizados (MIS4/LC67, MIS5/LC50, MIS6/LC90, MIS6/LC90, MIS7/LC28, MIS8/LC93, MIS10, LC95), com exceção do trioxolano MIS6/LC90, apresentam uma boa atividade anti malárica *in vitro*, quando testados em estirpes resistentes (K1) e em estirpes sensíveis (NF54) à cloroquina. Apenas *in vivo*, quando administrados por via subcutânea ou por via oral, em ratos Moro SPF ou NMRI infetados com a estirpe ANKA de *Plasmodium berghei*, a atividade destes foi inferior à dos compostos comparadores ART e AS.(190) Estes resultados e outros, de trabalhos anteriores, suscitaram questões que motivaram a investigação da atividade anti malárica de alguns dos trioxolanos preparados noutros modelos, nomeadamente nas estirpes de *P.falciparum* resistentes (Dd2) e sensíveis (3D7) à cloroquina. Os resultados dos testes realizados, e a sua interpretação, tendo em conta a estrutura, são apresentados em seguida.

Resultados dos testes realizados *in vitro*

Alguns dos compostos sintetizados foram submetidos a ensaios *in vitro* em eritrócitos infetados com estirpes de *P.falciparum* resistentes (Dd2) e sensíveis (3D7) à cloroquina. A estirpe Dd2 é uma estirpe multirresistente a fármacos que foi isolada de um doente do Sudeste da Ásia infetado por uma estirpe resistente a vários fármacos e com um elevado grau de desenvolvimento de resistência. A estirpe 3D7 foi isolada de um doente a viver perto do aeroporto de Amesterdão, sendo a origem da infeção desconhecida. Os valores de IC₅₀, para cada composto, obtidos com base em curvas dose-resposta resultantes dos testes de suscetibilidade com as estirpes referidas, encontram-se apresentados na tabela II-1.

Tabela II-1: Valores de IC₅₀ dos trioxolanos MIS5/LC50, MIS10/LC95, MIS1/LC29 e MIS12/LC92, e dos trioxanos semi-sintéticos DHA e AS. Valores dos ensaios efetuados, média (M) e desvio padrão (DP).

Composto	Dd2					3D7				
	Estirpe resistente à cloroquina					Estirpe sensível à cloroquina				
	Ensaio (nM)			IC ₅₀	DP	Ensaio (nM)			IC ₅₀	DP
DHA	-	-	-	5,05	-	-	-	-	5,90	-
AS	-	-	-	5,96	-	-	-	-	4,98	-
MIS5/LC50	16,19	32,64	21,82	23,55	8,36	39,51	18,67	9,25	22,48	15,49
MIS10/LC95	57,02	55,54	30,90	47,82	14,67	33,21	25,89	10,32	23,14	11,69
MIS12/LC92	0,48	0,54	2,27	1,10	1,01	9,72	-	8,75	9,24	0,69

Os valores de IC₅₀ para os compostos MIS5/LC50, MIS10/LC95 e MIS12/LC92 foram, respetivamente, 23,55±8,36 nM; 47,82±14,67 nM; 1,10±1,01 nM, na estirpe multirresistente Dd2 e de 22,48±15,49 nM; 23,14±11,69 nM; 9,24±0,69 nM, na estirpe multirresistente 3D7. A eficácia dos compostos referidos foi comparada com a dos compostos padrão DHA e AS, que apresentaram valores de IC₅₀ de 5,05 nM e de 5,96 nM, respetivamente, na linhagem celular Dd2 e de 5,90 nM e 4,98 nM, respetivamente, na linhagem celular 3D7. Todos os compostos testados apresentam atividade *in vitro* em concentrações nanomolares baixas. Os valores obtidos para os trioxolanos são da mesma ordem de grandeza dos obtidos para a DHA e AS. Os valores de IC₅₀ para os compostos MIS5/LC50 e MIS10/LC95, sobre as estirpes Dd2 e 3D7, são superiores aos observados para os compostos de referência, DHA e AS, em ambas as estirpes. Porém, o valor de IC₅₀ para o composto MIS12/LC92, na estirpe Dd2, é inferior ao apresentado pela DHA e AS.

Os compostos MIS5/LC50 e MIS10/LC95 apresentaram valores de IC₅₀ semelhantes quando testados na estirpe 3D7. Contudo, na estirpe Dd2 o composto MIS5/LC50 apresentou atividade superior. O composto MIS12/LC92 apresentou, em ambas as estirpes, valores de IC₅₀ inferiores aos dos restantes trioxolanos testados. Este resultado sugere que a presença de uma função amida na estrutura potencia a atividade da classe de composto. Esta observação está de acordo com os dados publicados por *Vennerstrom et al.*, relativamente às vantagens da introdução de um grupo amida no substituinte do carbono 4 do ciclohexilo, em posição R3 e R4 do trioxolano. O facto de este composto ser mais eficaz nas estirpes resistentes à cloroquina sugere a inexistência de resistência cruzada com as quinolinas. No entanto, na estirpe 3D7, a sua eficácia (IC₅₀ = 9,24 nM) é inferior à dos compostos de referência.

Tendo em conta o mecanismo de ação atualmente aceite para estes compostos, as diferenças de atividade podem ser explicadas por vários fatores. Entre estes poderão figurar variações no sistema da glutathione, que está envolvido no mecanismo de defesa antioxidante das células eritrocitárias. Os níveis de glutathione, nos eritrócitos infetados com a estirpe Dd2, são mais elevados do que nos eritrócitos infetados com a estirpe 3D7. No entanto, o enzima que origina a forma reduzida da glutathione (glutathione reductase) apresenta uma atividade superior nos eritrócitos infetados com a estirpe 3D7 do que nos infetados com a estirpe Dd2. Deste modo, os níveis de glutathione podem modular a

resposta das diferentes estirpes aos compostos. Pode também ocorrer que, nas células com níveis mais baixos do enzima glutathione redutase, a glutathione na forma oxidada se combine com o composto em estudo e ocorra o efluxo do fármaco para o exterior do parasita, o que contribui para uma diminuição da atividade do mesmo.(198) É fundamental proceder a estudos biológicos, genéticos e químicos, que permitam esclarecer a relação entre a estrutura química e diferenças de atividade.

O estudo de *Vennerstrom et al.* envolvendo os compostos MIS5/LC50 e MIS10/LC95, foi efetuado em células eritrocitárias infetadas com as estirpes de *P.falciparum* K1, multiresistente à cloroquina e isolada de um doente infetado na Tailândia, e NF54 sensível à cloroquina, obtida de doentes da Holanda que foram infetados com Malária em África e que apresenta uma enorme variabilidade genética. O ozonídeo MIS10/LC95 apresentou valores de IC₅₀ de 7,6 nM e 1,09 nM, na estirpe de resistente à cloroquina (K1) e na estirpe sensível à cloroquina (NF54), respetivamente (Tabela II-2). Já o composto MIS5/LC50 apresentou um valor de IC₅₀ mais baixo na estirpe resistente (IC₅₀= 0,68 nM) e mais elevado na estirpe sensível (IC₅₀ =1,29 nM) (tabela II-2). Tendo em conta os resultados obtidos (tabela II-2) é possível constatar que, nas estirpes resistentes, o composto MIS5/LC50 poderá ser mais eficaz, pois apresenta valores de IC₅₀ inferiores aos obtidos para o composto MIS10/LC95, na estirpe resistente e um valor semelhante próximo daquele obtido para MIS10/LC95, na estirpe sensível à cloroquina. Os resultados obtidos são bastante promissores uma vez que o ozonídeo MIS5/LC50 apresenta uma eficácia superior face ao AS e ao ozonídeo MIS10/LC95, na estirpe sensível à cloroquina, um valor de IC₅₀ semelhante ao exibido pelo AS, usado como composto de referência (tabela II-2).

Tabela II-2: Valores de IC₅₀ dos compostos MIS5/LC50, MIS10/LC95, bem como do composto comparativo, AS. Valores correspondentes ao estudo de *Vennerstrom et al.*

Composto	K1	NF54
	Estirpe resistente à cloroquina	Estirpe sensível à cloroquina
	IC₅₀ (nM)	IC₅₀ (nM)
AS	1,4	1,5
MIS5/LC50	0,68	1,29
MIS10/LC95	7,6	1,09

Os valores de IC₅₀ obtidos para as estirpes Dd2 e 3D7 distanciam-se bastante dos obtidos por *Vennerstrom et al.* para as estirpes K1 e NF54. Contudo, em ambos os estudos, o composto MIS5/LC50 parece ser mais eficaz em estirpes resistentes.

É de realçar que as diferenças dos valores de atividade dos trioxolanos estudados e dos compostos de referência, nos diferentes ensaios, são relativamente modestas e podem ser explicadas por variações nas condições em que os ensaios foram realizados. Variações no local e nos operadores responsáveis pelo estudo, afetam as condições e, conseqüentemente, as estirpes dos parasitas utilizados têm tendência a sofrer alterações, na tentativa de se adaptar às circunstâncias que lhes são impostas, nomeadamente as características do laboratório. Além disso, diferenças nos padrões genéticos das estirpes K1 e Dd2, resistentes à cloroquina e nas estirpes NF54 e 3D7, sensíveis à cloroquina e na capacidade de entrada dos compostos nas células dos parasitas, também contribuem para esta situação.(198)

De acordo com a literatura, seria de prever que o composto MIS10/LC95, por conter um grupo metilo a conectar o substituinte amina com o carbono em posição 4 do ciclohexano, apresentasse uma maior eficácia, situação que não se verificou, em ambos os estudos.

Tendo em conta os dados apresentados é necessário a realização de mais estudos, usando compostos com maior diversidade estrutural, para se recolher mais informação, relativamente às características estruturais, que permita uma otimização das propriedades farmacológicas, desta classe de compostos.

Duas das moléculas referidas foram testadas *in vivo* noutras espécies de Plasmódio. MIS5/LC50 demonstrou atividade *in vivo* e resultados promissores, quando administrado por via subcutânea na dose de 10 mg/Kg de peso e de 100 mg/Kg de peso contra *Plasmodium berguei* ANKA (estirpe suscetível à cloroquina).(190) O composto MIS10/LC95 também revelou atividade *in vivo*, ao reduzir 99,9% da parasitémia em ratinhos infetados por *Plasmodium berghei*, quando tratados por via oral, no terceiro dia após a infeção, com uma dose única.(199)

Os trioxolanos MIS5/LC50, MIS6/LC90, MIS8/LC93, MIS10/LC95 e MIS11/LC68 também foram submetidos a testes *in vivo* em cercaria, demonstrando eficácia na sua eliminação.(190)

Estudos recentes no grupo de SRO do CCMAR mostraram que o ozonídeo MIS10/LC95 apresenta uma elevada atividade contra *Leishmania infantum*, com valores de IC₅₀ de 1,07±0,05 µg/mL, quando testado *in vitro* em promastigotas de *Leishmania infantum*.(200) O mesmo composto revelou uma toxicidade nos macrófagos muito inferior à exibida pela Anfotericina B e um elevado índice de seletividade.(201) Prosseguem os estudos no sentido de avaliar a viabilidade de alguns dos compostos como agentes quimioterapêuticos para Leishmaniose.

Apesar das vantagens e eficácia apresentadas pelos trioxolanos, que os colocam como agentes promissores no tratamento da Malária, existe pouca informação relativamente a estudos toxicocinéticos, nomeadamente em relação aos valores da dose letal para 50% das células infetadas com o parasita e tratadas com os compostos. Esta informação é fulcral para que se possa proceder à otimização das moléculas. A informação toxicológica disponível para as ARTs indica que a ponte peróxido é o farmacóforo e também o toxóforo. A otimização estrutural deverá contribuir para a obtenção de moléculas mais eficazes, menos tóxicas e mais seguras, com aplicabilidade no tratamento da Malária e de outras doenças. Só assim será possível contornar o problema de neuro e embriotoxicidade associado aos compostos que apresentam o grupo endoperóxido e que, até agora, é o responsável pela atividade dos mesmos. (155,164,167)

III – Conclusão

O cancro é a principal causa de morte no Mundo. As alterações celulares que conduzem ao desenvolvimento do cancro podem ser diversas e resultam da interação entre fatores genéticos e agentes externos físicos, químicos e biológicos, sendo este um processo que envolve vários passos. A seleção de uma ou mais intervenções aplicadas no tratamento do cancro, como a cirurgia, a radioterapia e/ou a quimioterapia, deve ser cuidadosa. Apesar de estas serem as terapias atualmente aplicadas no tratamento do cancro, apresentam limitações, e novas investigações estão em curso no sentido de se alcançar uma estratégia eficaz para o combate ao cancro.

A seletividade das moléculas com atividade citotóxica para as células tumorais pode ser potenciada ao direcionar a sua ação para os biomarcadores do cancro ou ao aumentar a expressão dos genes e proteínas cancerígenas, que não são detetados nas células saudáveis do organismo e que podem ser afetados por estes compostos. Deste modo é possível aumentar a toxicidade celular e conseqüentemente, retardar a emergência de resistência e diminuir a toxicidade associada ao fármaco nas células normais, o que facilita a preparação de terapias de combinação mais efetivas e menos tóxicas.

Estudos realizados *in vitro* e *in vivo* envolvendo linhagens de células tumorais demonstram a vantagem da utilização da terapia convencional combinada com derivados de ART. A ART e os seus derivados são produtos fitoquímicos altamente potentes como antiparasíticos e anticancerígenos, cujo farmacóforo é constituído pelo grupo 1,2,4-trioxano, que possuem riscos mínimos para os humanos, podendo ser aplicados como alternativa terapêutica ou tratamento adjuvante na terapia de cancros metastizados e agressivos, sem terapêutica efetiva, particularmente nas células tumorais que desenvolvem resistência. A sua possível aplicação nesta área mostra-se vantajosa por apresentarem um perfil farmacocinético e toxicológico já conhecido. São compostos seletivos para as células tumorais, são ativos quando usados em concentrações na ordem dos nM e mostram poucos efeitos adversos associados. Assim, torna-se essencial esclarecer o mecanismo de bioativação e de ação inerente à ART e aos seus derivados, nas células cancerígenas, bem como os potenciais alvos de ação. Além disso, o conhecimento da interação destes compostos com a quimioterapia convencional, a caracterização dos efeitos no tumor e dos mecanismos citotóxicos a eles inerentes, através

do conhecimento de biomarcadores químicos adequados, permitirá definir o regime terapêutico mais conveniente para cada tipo de cancro. O desenvolvimento de terapias mais eficazes e menos tóxicas para as células normais nesta área só é conseguido através da contribuição dos conhecimentos de várias áreas, como a biologia e a química, sendo essencial uma boa rede de ligação e de partilha de informação entre os investigadores destas diversas áreas.

A síntese de compostos híbridos, contendo uma ponte endoperóxido em conjugação com outro ou outros grupos farmacologicamente ativos, pode permitir a ação simultânea de diferentes farmacóforos, que atuem de modo diferente, em alvos diferentes ou em pontos diferentes do mesmo alvo intracelular, inibindo vários processos envolvidos na progressão do tumor e atuando na prevenção das propriedades invasivas e metastáticas, em tumores recorrentes e agressivos. Dada a atividade dos derivados de ART, tem-se apostado na síntese de trioxolanos e tetraoxanos que, tal como a ART e os seus análogos, possuem na sua estrutura uma ponte endoperóxido que se julga ser responsável pela atividade dos mesmos. A combinação de moléculas contendo um anel 1,2,4-trioxolano, com um fármaco clássico, utilizado no tratamento do cancro, é uma das estratégias possíveis que pode permitir diminuição da toxicidade e aumento da atividade, visto que o Fe (II) presente nas células cancerígenas pode promover a quebra do anel e, conseqüentemente, a libertação seletiva de agentes citotóxicos nestas células. Contudo, é necessário assegurar que estas novas moléculas são bastante mais tóxicas para as células tumorais do que para as células normais.

No âmbito deste trabalho foram preparados vários trioxolanos que foram testados *in vitro* em linhagens de *P. falciparum* sensíveis e resistentes à cloroquina. De entre os compostos preparados, destacam-se os trioxolanos MIS5/LC50 e MIS10/LC95 que apesar de apresentarem valores de IC₅₀ na região nM baixa e atividade ligeiramente inferior mas da mesma ordem de grandeza que a exibida pelos derivados de ART usados como referência, e atualmente recomendados no tratamento da Malária, causada por *P.falciparum*. O composto MIS12/LC92 destacou-se por mostrar uma atividade ligeiramente superior à exibida pelos fármacos de referência. Este composto parece possuir um excelente potencial anti malárico intrínseco. Deste modo, é necessário prosseguir para estudos *in vitro* envolvendo células cancerígenas, no sentido de averiguar o seu potencial no tratamento do cancro.

Os resultados indicam que se desenvolveu um composto bastante promissor, para o tratamento da Malária. Embora interessantes, os resultados obtidos são apenas informação preliminar. Há necessidade de mais investigações para esclarecer as características intrínsecas à atividade anti malárica dos compostos, a possibilidade da sua ação em células cancerígenas, a identificação de marcadores químicos para identificar o seu papel na citotoxicidade e a síntese de outros compostos, com estruturas e substituintes diferentes, para seleção futura do elemento da biblioteca que exhibe as melhores características farmacológicas. Futuramente, para se proceder à otimização das propriedades dos trioxolanos sintetizados é essencial apostar na introdução de variabilidade estrutural nas posições R3 e R4. A introdução de heterociclos nas referidas posições, com átomos eletronegativos que exerçam efeito indutivo fraco e aumentem a eletrofilicidade da ligação peróxido, parece ser uma alternativa viável. A formação de ligações por pontes de hidrogénio pode ser potenciada por interações ião-dipolo, envolvendo ligandos implicados na formação do complexo de Fe(II), o que pode facilitar a coordenação do Fe(II) com a ligação peróxido.

A síntese de compostos com substituintes contendo átomos de azoto pode conduzir a atividades interessantes. Tal como referido na parte I do presente trabalho, os tumores tendem a produzir lactato pela via glicolítica anaeróbia, o que contribui para um microambiente tumoral ácido. No entanto, o pH intracelular mantém-se aproximadamente neutro. Estes compostos, quando neste ambiente ácido, podem protonar e concentrar-se na zona do tumor, onde são ativados. Deste modo, tornam-se mais seletivos e menos tóxicos para as outras células normais do organismo, sendo o stress oxidativo induzido nas células tumorais muito superior.

Os compostos preparados vão ser testados noutros modelos, com o objetivo de avaliar o seu potencial no tratamento de outras doenças, como o cancro, podendo as estruturas preparadas servir de modelo para uma biblioteca de trioxolanos com propriedades anticancerígenas.

IV - Bibliografia

1. National Cancer Institute. What Is Cancer? [Internet]. 2014 [citado a 2014 Mar 10]. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>
2. Visvader JE. Cells of origin in cancer. *Nature* [Internet]. 2011 Jan 20 [citado a 2013 Oct 31];469(7330):314–22. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21248838>
3. Donovan-Kicken E, Tollison AC, Goins ES. The nature of communication work during cancer: advancing the theory of illness trajectories. *Health Commun* [Internet]. 2012 Oct [citado a 2014 Feb 1];27(7):641–52. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22168391>
4. WCRF International. Worldwide cancer statistics [Internet]. Cancer statistics. 2013 [citado a 2014 Fev 10]. Disponível em: http://www.wcrf.org/cancer_statistics/world_cancer_statistics.php
5. Hiatt RA, Breen N. The social determinants of cancer: a challenge for transdisciplinary science. *Am J Prev Med* [Internet]. 2008 Aug [citado a 2014 Jan 28];35(2 Suppl):S141–50. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749379708004157>
6. World Health Organization. WHO | Cancer [Internet]. Fact sheet. World Health Organization; 2014 [citado a 2014 Mar 2]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
7. Harrington KJ. *Biology of cancer. Medicine (Baltimore)* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011 Dec [citado a 2013 Oct 31];39(12):689–92. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357303911002581>
8. Weinberg RA. *The biology of Cancer*. 15th ed. United States of America: T&F informa; 2007.
9. American Cancer Society. What Is Cancer? [Internet]. Learn about cancer. 2014 [citado a 2014 Fev 10]. Disponível em: <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>
10. Pollock R. *UICC Manual de Oncologia Clínica*. 8.^a ed. Doroshow, J.H; Khayat, D; Nakão, A; O’Sullivan B, editor. São Paulo: Willey; 2006.
11. American Cancer Society. What causes cancer [Internet]. Learn about cancer. 2014 [citado a 2014 Abr 26]. Disponível em: <http://www.cancer.org/cancer/cancercauses/index>
12. UK CR. What causes cancer? [Internet]. Cancer in general. Cancer Research UK; 2014 [citado a 2014 Jul 19]. Disponível em: <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-help/about-cancer/causes-symptoms/causes/what-causes-cancer>
13. National institute of environmental health science. *Breast Cancer Risk and Environmental Factors*. 2012.
14. Cancer Research UK. Why don't we all get cancer? [Internet]. Cancers in general. Cancer Research UK; 2014 [citado a 2014 Mai 2]. Disponível em: <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-help/about-cancer/causes-symptoms/causes/why-dont-we-all-get-cancer>
15. Memorial Sloan Kettering Cancer Center. About Colorectal Cancer [Internet]. Colorectal Cancer. 2014 [citado a 2014 Mai 2]. Disponível em: <http://www.mskcc.org/cancer-care/adult/colorectal/about-colorectal>

16. Daily S. Cancer's origins revealed: Genetic imprints and signatures left by DNA-damaging processes that lead to cancer identified [Internet]. Featured Research. 2013 [citado a 2014 Fev 1].Disponível em:<http://www.sciencedaily.com/releases/2013/08/130814132445.htm>
17. Kogevinas M. Epidemiological approaches in the investigation of environmental causes of cancer: the case of dioxins and water disinfection by-products. Environ Health [Internet]. BioMed Central Ltd; 2011 Jan [citado a 2014 Fev 23];10 Suppl 1(Suppl 1):S3. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3073195&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
18. Weiderpass E. Lifestyle and cancer risk. J Prev Med public Heal [Internet]. 2010 Nov [citado a 2014 Fev 23];43(6):459–71. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21139406>
19. Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez AD, Murray CJL, Ezzati M. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. Lancet [Internet]. 2005 Nov 19 [citado a 2014 Fev 23];366(9499):1784–93. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16298215>
20. Macdonald S, Watt G, Macleod U. In search of the cancer candidate: can lay epidemiology help? Sociol Health Illn [Internet]. 2013 May [citado a 2014 Feb 1];35(4):575–91. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23009591>
21. Tian M, Neil JR, Schiemann WP. Transforming growth factor- β and the hallmarks of cancer. Cell Signal [Internet]. Elsevier Inc.; 2011 Jun [citado a 2013 Nov 2];23(6):951–62. Disponível em:<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3076078&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
22. Lacerte A, Korah J, Roy M, Yang X-J, Lemay S, Lebrun J-J. Transforming growth factor-beta inhibits telomerase through SMAD3 and E2F transcription factors. Cell Signal [Internet]. 2008 Jan [citado a 2014 Fev 23];20(1):50–9. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17881189>
23. Mantovani A. Inflaming Metastasis. Nature. 2009;457(Janeiro):36–7.
24. Monteiro J, Fodde R. Cancer stemness and metastasis: therapeutic consequences and perspectives. Eur J Cancer [Internet]. 2010 Mai [citado a 2014 Jan 31];46(7):1198–203. Disponível em:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959804910001577>
25. Villalba, Martin. Rathore, Moez. Nuria, Lopez-Royuela. Ewelina, Krzywinska. Johan, Garaude. Nerea A-V. From tumor cell metabolism to tumor immune escape. 2012 [citado a 2014 Fev 23];8. Disponível em: http://ac.els-cdn.com/S1357272512001495/1-s2.0-S1357272512001495-main.pdf?_tid=6b7818da-9cc0-11e3-8ca8-0000aab0f6b&acdnat=1393183780_9de20637bdd3dff2072644a30f9713ea
26. Håkansson L. The capacity of the immune system to control cancer. Eur J Cancer [Internet]. 2009 Aug [citado a 2014 Fev 23];45(12):2068–70. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19608409>
27. Matsushita H, Vesely MD, Koboldt DC, Rickert CG, Uppaluri R, Magrini VJ, et al. Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting. Nature [Internet]. Nature Publishing Group; 2012 Fev 16 [citado a 2014 Jan 22];482(7385):400–4. Disponível em:<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3874809&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
28. Rezvani HR, Ali N, Nissen LJ, Harfouche G, de Verneuil H, Taïeb A, et al. HIF-1 α in epidermis: oxygen sensing, cutaneous angiogenesis, cancer, and non-cancer

- disorders. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2011 Set [citado a 2014 Fev 23];131(9):1793–805. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21633368>
29. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Macmillan Magazines Ltd*. 2000;249–57.
30. Marie SKN, Shinjo SMO. Metabolism and brain cancer. *Clinics (São Paulo)* [Internet]. 2011 Jan;66 Suppl 1:33–43. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23320861>
31. Ramsay EE, Hogg PJ, Dilda PJ. Mitochondrial metabolism inhibitors for cancer therapy. *Pharm Res* [Internet]. 2011 Nov [citado a 2014 Fev 23];28(11):2731–44. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21918915>
32. W H O. Knowledge into Action Diagnosis and Treatment. WHO. Sepúlveda C, editor. Switzerland: WHO; 2008.
33. Ozols RF. Recurrent Ovarian Cancer: Evidence-Based Treatment. *J Clin Oncol* [Internet]. 2002 Mar 1 [citado a 2014 Fev 23];20(5):1161–3. Disponível em: <http://jco.ascopubs.org/content/20/5/1161.full>
34. Farhat, Aziz Khan, Shad, Salim Akhtar. Muhammad KS. Review article cancer treatment. 2005;12(1):3–5.
35. Cancer Research UK. Surgery to treat cancer [Internet]. Cancer treatment. Cancer Research UK; 2014 [citado a 2014 Mar 30]. Disponível em: <http://www.Cancerresear.chuk.org/cancer-help/about-cancer/treatment/surgery/surgery-to-treat-cancer>
36. Pollock, Raphael E; Morton DL. Principles of Surgical Oncology. *Cancer Medicine* [Internet]. Ontario: BC Decker; 2003 [citado a 2014 Abr 18]. p. 569–83. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13204/>
37. JG Lee, BC Cho, MK Bae, CY Lee, IK Park, DJ Kim KC. Thoracoscopic lobectomy is associated with superior compliance with adjuvant chemotherapy in lung cancer [Internet]. *The Annals of thoracic surgery*. 2011 [citado a 2014 Mai 4]. p. 344–8. Disponível em: http://www.Unboundmedicine.com/medline/citation/21256264/Thoracoscopic_lobectomy_is_associated_with_superior_compliance_with_adjuvant_chemotherapy_in_lung_cancer_
38. Reed M. Principles of cancer treatment by surgery. Elsevier [Internet]. 2009 [citado a 2014 Fev 3];27(4):178–81. Disponível em: http://ac.els-cdn.com/S0263931909000118/1-s2.0-S0263931909000118-main.pdf?_tid=6eee989c-8cce-11e3-9b3f-00000aab0f6b&acdnat=1391430580_36fcbddd20d9716eb341779b72725_eaa
39. Van Gijn W, Marijnen C a M, Nagtegaal ID, Kranenbarg EM-K, Putter H, Wiggers T, et al. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer: 12-year follow-up of the multicentre, randomised controlled TME trial. *Lancet Oncol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011 Jun [citado a 2014 Abr 11];12(6):575–82. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21596621>
40. Bystricky B, Okines AFC, Cunningham D. Optimal therapeutic strategies for resectable oesophageal or oesophagogastric junction cancer. *Drugs* [Internet]. 2011 Mar 26;71(5):541–55. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21443280>
41. Griffin SM, Wahed S. Oesophageal cancer. *Surg* [Internet]. Elsevier; 2011 Nov 1 [citado a 2014 Mai 4];29(11):557–62. Disponível em: [http://www.surgeryjournal.co.uk/article/S0263-9319\(11\)00180-3/abstract](http://www.surgeryjournal.co.uk/article/S0263-9319(11)00180-3/abstract)
42. National Cancer Institute. Surgery to Reduce the Risk of Breast Cancer [Internet]. Fact Sheet. 2013 [citado a 2014 Fev 20]. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/risk-reducing-surgery>

43. The University of Texas MD Anderson Cancer Center. Side Effects of Cancer Treatment MD Anderson Cancer Center [Internet]. Cancer Survivorship. 2014 [citado a 2014 Jul 21]. Disponível em: <http://www.mdanderson.org/patient-and-cancer-information/cancer-information/cancer-topics/survivorship/side-effects-of-cancer-treatment/index.html>
44. American Cancer Society. Understanding Cancer Surgery : A Guide for Patients and Families Learning about cancer surgery How is surgery used for cancer ? 2013. p. 1–20.
45. American Cancer Society. Understanding Radiation Therapy : A Guide for Patients and Families What is radiation therapy ? When is it used ? Do the benefits outweigh the risks and side. 2013. p. 1–38.
46. Falk S. Principles of cancer treatment by radiotherapy. Surg [Internet]. Elsevier Ltd.; 2009 Abr [citado a 2014 Fev 4];27(4):169–72. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0263931909000167>
47. Cancer research UK. Radiotherapy [Internet]. Cancer Research UK; [citado a 2014 Mai 4]. Disponível em: <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-help/about-cancer/treatment/radiotherapy/>
48. National Cancer Institute. Radiation Therapy for Cancer [Internet]. Fact Sheet. 2010 [citado a 2014 Fev 20].Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/radiation>
49. Jackson MR, Falzone N, Vallis K a. Advances in anticancer radiopharmaceuticals. Clin Oncol (R Coll Radiol) [Internet]. Elsevier Ltd; 2013 Out [citado a 2014 Mai 4];25(10):604–9. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23870756>
50. Ministério da Saúde - INFARMED. Formulário Hospitalar Nacional de Medicamentos.9.ªEdição; 2006
51. Huang, Jiayi; Kestin, Larry L; Ye H, Wallace, Michelle; Martinez A, Vicini F. Analysis of second malignancies after modern radiotherapy versus prostatectomy for localized prostate cancer. Radiother Oncol [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2011 Jan [citado a 2014 Mai 4];98(1):81–6.Disponível em:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20951450>
52. Society AC. What is chemotherapy? How chemotherapy works. American Cancer Society. 2013. p. 1–29.
53. National Cancer Institute. Chemotherapy and You: Support for People With Cancer [Internet]. United Kingdom; 2011 [citado a 2014 Mai 4]. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/coping/chemotherapy-and-you>
54. Parnell C, Woll PJ. Principles of cancer chemotherapy. Found Years [Internet]. 2005 Out;1(2):18–22.Disponível em:<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1744188906700159>
55. American Cancer Society. Different types of chemotherapy drugs [Internet]. 2013 [citado a 2014 Fev 20]. Disponível em: <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/chemotherapy/chemotherapyprinciplesanin-depthdiscussionofthetechniquesanditsroleintreatment/chemotherapy-principles-types-of-chemo-drugs>
56. Gampenrieder SP, Rinnerthaler G, Greil R. Neoadjuvant Chemotherapy and Targeted Therapy in Breast Cancer: Past, Present, and Future. J Oncol [Internet]. 2013 Jan;2013:732047.Disponível em:<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3762209&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
57. Waljee JF, Newman L a. Neoadjuvant systemic therapy and the surgical management of breast cancer. Surg Clin North Am [Internet]. 2007 Abr [citado a 2014

- Mai 4];87(2):399–415, ix. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17498534>
- 58.** Jacobi N, Gieseler F. Adjuvant and neoadjuvant therapy in colorectal cancer. *Eur Surg* [Internet]. 2010 Dez [citado a 2014 Mai 4];42(6):283–6. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10353-010-0568-4>
- 59.** Van Cutsem E, Borràs JM, Castells A, Ciardiello F, Ducreux M, Haq A, et al. Improving outcomes in colorectal cancer: where do we go from here? *Eur J Cancer* [Internet]. 2013 Jul [citado a 2014 Mai 4];49(11):2476–85. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23642327>
- 60.** Rodriguez K a, Guitron J, Hanseman DJ, Williams V, Starnes SL. Adjuvant chemotherapy and age-related biases in non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012 Dez [citado a 2014 Mai 4];94(6):1810–4. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23103001>
- 61.** Caley A, Jones R. The principles of cancer treatment by chemotherapy. *Surg* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012 Abr [citado a 2014 Mai 4];30(4):186–90. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0263931912000166>
- 62.** Page, Ray; Takimoto C. Principles of chemotherapy. In: Pazlour, Richard; Wagman, Lawrence; Camphausen K, editor. *Cancer Management: A multidisciplinary approach* [Internet]. 2012. p. 21–37. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22999506>
- 63.** Bartlett, David; Thirunavukarasu, Pragatheeshwar; Neal M. *Surgical Oncology* [Internet]. Jaypee. New Dehli: JP Medical Ltd; 2011 [citado a 2014 Mai 4]. Disponível em: http://books.google.com/books?id=i_nCwu7wSrYC&pgis=1
- 64.** Polavarapu A, Stillabower JA, Stubble SGW, Taylor WM, Baik M. The mechanism of guanine alkylation by nitrogen mustards: A computational study. *J Org Chem*. 2012;77:5914–21.
- 65.** Department of health and human services. *Nitrosourea Chemotherapeutic Agents*. USA; 2009 p. 324–31.
- 66.** Tanvir A. Antitumor drugs and their mode of action [Internet]. 2001 [citado a 2014 Abr 26]. Disponível em: <http://dc396.4shared.com/doc/NngID3ee/preview.html>
- 67.** Missailidis S. *Anticancer Therapeutics*. USA: Wiley & Sons; 2008.
- 68.** Cancer Research UK. *Dacarbazine (DTIC)* [Internet]. UK: Cancer Research UK; 2012 [citado a 2014 Mai 8]. Disponível em: <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-help/about-cancer/treatment/cancer-drugs/dacarbazine>
- 69.** National Cancer Institute. *FDA Approval for Temozolomide* [Internet]. 2013 [citado a 2014 Fev 12]. Disponível em: http://www.cancer.gov/cancertopics/dru_ginfo/fda-temozolomide
- 70.** González F. Aziridinas (etileniminas) [Internet]. *Farmacología Molecular del Cancer*. 2011 [citado a 2014 Mai 1]. Disponível em: <http://pt.scribd.com/doc/56024202/65/Aziridinas-etileniminas>
- 71.** Chan, J; Loizzi, Vera; Manetta, Alberto; Berman M. Oral altretamine used as salvage therapy in recurrent ovarian cancer. *Gynecol Oncol* [Internet]. 2004 Jan [citado a 2014 Mai 8];92(1):368–71. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0090825803006504>
- 72.** Kaye SB. New antimetabolites in cancer chemotherapy and their clinical impact. *Br J Cancer* [Internet]. 1998 Jan;78 Suppl 3:1–7. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2062805&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

73. BC Cancer Agency. Hydroxyurea [Internet]. Cancer Drug Manual. 2013 [citado a 2014 Mai 10]. p. 1–7. Disponível em: <http://www.bccancer.bc.ca/HPI/DrugDatabase/DrugIndexPro/Hydroxyurea.htm>
74. Alibek K, Bekmurzayeva A, Mussabekova A, Sultankulov B. Using antimicrobial adjuvant therapy in cancer treatment: a review. Infect Agent Cancer [Internet]. 2012 Jan;7(1):1–10. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3637577&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
75. Cancer Treatment Centers of America I. Anticancer Antibiotics : Cancer Glossary | CTCA [Internet]. 2014 [citado a 2014 Fev 20]. Disponível em: <http://www.cancercenter.com/terms/anticancer-antibiotics>
76. Pandey G, Madhuri S. Microbial antibiotics for the treatment of cancers. Drug Invent today. 2009;1(1):7–9.
77. Haraguchi T. Antibióticos: classificação geral. Revista Brasileira de Medicina [Internet]. 2000 Oct [citado a 2014 Jul 19]; Disponível em: <http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&idmateria=69>
78. Thakur DS. Topoisomerase II Inhibitors in Cancer Treatment. Int J Pharm Sci Nanotechnol. 2011;3(4):1173–81.
79. Thorn, Caroline; Oshiro, Connie; Marsh, Sharon; Hernandez-Boussard, Tina; McLeod, Howard; Klein, Teri; Altman R. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. Pharmacogenet Genomics. 2012;21(7):440–6.
80. Sigma-Aldrich. Actinomycin D from Streptomyces sp. [Internet]. 2014 [citado a 2014 Jul 26]. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a1410?lang=pt®ion=PT>
81. Bensaude O. Inhibiting eukaryotic transcription: Which compound to choose? How to evaluate its activity? Transcription [Internet]. 2011 Jan [citado a 2014 Abr 29];2(3):103–8. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3173647&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
82. ATDBio Ltd. Nucleic acid-drug interactions [Internet]. 2014 [citado a 2014 Mai 2]. Disponível em: <http://www.atdbio.com/content/16/Nucleic-acid-drug-interactions>
83. Oliveira RB De. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. Quim Nova. 2002;25(6):976–84.
84. University of Connecticut Basu Lab. University of Connecticut | Basu Lab [Internet]. 2011 [citado a 2014 Mar 1]. Disponível em: <http://chemistry.uconn.edu/basulab/research/mechanism.html>
85. Thai K-M, Bui Q-H, Tran T-D, Huynh T-N-P. QSAR modeling on benzo[c]phenanthridine analogues as topoisomerase I inhibitors and anti-cancer agents. Molecules [Internet]. 2012 Jan [citado a 2014 Mai 11];17(5):5690–712. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22580401>
86. Pommier Y, Cushman M. The indenoisoquinoline noncamptothecin topoisomerase I inhibitors: update and perspectives. Mol Cancer Ther [Internet]. 2009 Mai [citado a 2014 Mai 14];8(5):1008–14. Disponível em: <http://www.Pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2888777&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
87. Guerrant W, Patil V, Canzoneri JC, Yao L-P, Hood R, Oyelere AK. Dual-acting histone deacetylase-topoisomerase I inhibitors. Bioorg Med Chem Lett [Internet]. Elsevier Ltd; 2013 Jun 1 [citado a 2014 Mai 12];23(11):3283–7. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23622981>

88. Bailly C. Topoisomerase I poisons and suppressors as anticancer drugs. *Curr Med Chem* [Internet]. 2000 Jan;7(1):39–58. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10637356>
89. Nitiss JL. NIH Public Access. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(5):338–50.
90. Almeida VL De, Leitão A, Barrett C, Alberto C, Luis C. Cancer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que intercalam com o DNA: Uma introdução. *Quim Nova*. 2005;28(1):118–29.
91. Chan, J; Loizzi, Vera; Manetta, Alberto; Berman M. Oral altretamine used as salvage therapy in recurrent ovarian cancer. *Gynecol Oncol* [Internet]. 2004 Jan [citado a 2014 Mai 8];92(1):368–71. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0090825803006504>
92. Komlodi-pasztor E, Sackett DL, Fojo AT. Inhibitors Targeting Mitosis : Tales of How Great Drugs against a Promising Target Were Brought Down by a Flawed Rationale. *Clin Cancer Res*. 2012;51–63.
93. Gascoigne KE, Taylor SS. How do anti-mitotic drugs kill cancer cells? *J Cell Sci* [Internet]. 2009 Ago 1 [citado a 2014 Mai 6];122(Pt 15):2579–85. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19625502>
94. Gaspar JR, Qu J, Straubinger NL, Straubinger RM. Highly selective and sensitive assay for paclitaxel accumulation by tumor cells based on selective solid phase extraction and micro-flow liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Analyst* [Internet]. The Royal Society of Chemistry; 2008 Dez 1 [citado a 2014 Mai 1];133(12):1742–8. Disponível em: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2008/an/b806856a>
95. Dorff TB, Crawford ED. Management and challenges of corticosteroid therapy in men with metastatic castrate-resistant prostate cancer. *Ann Oncol* [Internet]. 2013 Jan [citado a 2014 Mai 20];24(1):31–8. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22831986>
96. Banciu M, Schiffelers RM, Metselaar JM, Storm G. Utility of targeted glucocorticoids in cancer therapy. *J Liposome Res* [Internet]. 2008 Jan [citado a 2014 Mai 20];18(1):47–57. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18348071>
97. Ma WW, Adjei AA. Novel Agents on the Horizon for Cancer Therapy. *Ca-A Cancer J Clin*. 2009;59(2):111–37.
98. Rebucci M, Michiels C. Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. [Internet]. *Biochemical pharmacology*. 2013. p. 1219–26. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23435357>
99. American Cancer Society. Targeted Therapy. American Cancer Society. 2013. p. 1–27.
100. National Cancer Institute. Biological Therapies for Cancer - National Cancer Institute [Internet]. Fact Sheet. [citado a 2014 Jun 6]. p. 2013. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/biological>
101. National Cancer Institute. Angiogenesis Inhibitors - National Cancer Institute [Internet]. Fact Sheet. 2011 [citado a 2014 Fev 20]. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/angiogenesis-inhibitors>
102. Chamberlain MC. Emerging clinical principles on the use of bevacizumab for the treatment of malignant gliomas. *Cancer* [Internet]. 2010 Set 1 [citado a 2014 Mai 5];116(17):3988–99. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20564141>
103. Hilbe W, Manegold C, Pircher A. Targeting angiogenesis in lung cancer - Pitfalls in drug development. *Transl lung cancer Res*. 2012;1(8):122–8.

- 104.** McDermott DF, George DJ. Bevacizumab as a treatment option in advanced renal cell carcinoma: an analysis and interpretation of clinical trial data. *Cancer Treat Rev* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010 Mai [citado a 2014 Mai 22];36(3):216–23. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20116176>
- 105.** U.S. Food and Drug Administration. FDA Approval for Bevacizumab - National Cancer Institute [Internet]. Cancer drug information. 2013 [citado a 2014 Fev 17]. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/fda-bevacizumab>
- 106.** Su Y, Yang W-B, Li S, Ye Z-J, Shi H-Z, Zhou Q. Effect of angiogenesis inhibitor bevacizumab on survival in patients with cancer: a meta-analysis of the published literature. *PLoS One* [Internet]. 2012 Jan [citado a 2014 Mai 22];7(4):e35629. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3335091&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 107.** Bergh J, Bondarenko IM, Lichinitser MR, Liljegren A, Greil R, Voytko NL, et al. First-line treatment of advanced breast cancer with sunitinib in combination with docetaxel versus docetaxel alone: results of a prospective, randomized phase III study. *J Clin Oncol* [Internet]. 2012 Mar 20 [citado a 2014 Jul 28];30(9):921–9. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22331954>
- 108.** U.S. Food and Drug Administration. FDA Approval for Regorafenib - National Cancer Institute [Internet]. Cancer drug information. 2013 [citado a 2014 Fev 17]. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/fda-regorafenib>
- 109.** Alliance. Two Alliance Studies, One Drug: A Closer Look at Cabozantinib. *Alliance Clin Trials Oncol*. 2013;3(2).
- 110.** U.S. Food and Drug Administration. FDA Approval for Cabozantinib-S-Malate - National Cancer Institute [Internet]. Cancer drug information. 2013 [citado a 2014 Fev 17]. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/fda-cabozantinib-s-malate>
- 111.** Zweifel M, Jayson GC, Reed NS, Osborne R, Hassan B, Ledermann J, et al. Phase II trial of combretastatin A4 phosphate, carboplatin, and paclitaxel in patients with platinum-resistant ovarian cancer. *Ann Oncol* [Internet]. 2011 Set [citado a 2014 Jun 5];22(9):2036–41. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21273348>
- 112.** Barrena Medel NI, Wright JD, Herzog TJ. Targeted therapies in epithelial ovarian cancer. *J Oncol* [Internet]. 2010 Jan [citado a 2014 Jun 3];2010(ii):314326. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2810474&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 113.** Cheung CHA, Chen H-H, Kuo C-C, Chang C-Y, Coumar MS, Hsieh H-P, et al. Survivin counteracts the therapeutic effect of microtubule de-stabilizers by stabilizing tubulin polymers. *Mol Cancer* [Internet]. 2009 Jan [citado a 2014 Jun 5];8:43. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2714493&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 114.** Baguley BC. Preclinical efficacy of vascular disrupting agents in non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011 Mar [citado a 2014 Jun 6];12(2):81–6. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21550553>
- 115.** Kim S, Peshkin L, Mitchison TJ. Vascular disrupting agent drug classes differ in effects on the cytoskeleton. *PLoS One* [Internet]. 2012 Jan [citado a 2014 Jun 4];7(7):e40177. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3404093&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- 116.** Vanneman M, Dranoff G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nat Rev* [Internet]. Nature Publishing Group; 2012;12(4):237–51. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3237>
- 117.** National Cancer Institute. Advances in Targeted Therapies [Internet]. Tutorial. [citado a 2014 Mar 4]. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/understandingcancer/targetedtherapies/htmlcourse/page4>
- 118.** Zigler M, Shir A, Levitzki A. Targeted cancer immunotherapy. *Curr Opin Pharmacol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;13(4):504–10. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2013.04.003>
- 119.** Kantoff, Philip; Higano, Celestia; Shore, Neal; Berger, Roy; Small, Eric; Penson, David; Redfern, Charles; Ferrari, Anna; Dreicer, Robert; Sims, Robert; Xu, Yi; Frohlich, Mark; Schellhammer P. Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2012;363(5):411–22.
- 120.** Roswell Park Cancer Institute. Researchers Evaluating Immunotherapy Approaches for Treating Metastatic Kidney, Prostate, Bladder Cancers | Roswell Park Cancer Institute [Internet]. 2013 [citado a 2014 Mar 3]. Disponível em: <https://www.roswellpark.org/media/news/researchers-evaluating-immunotherapy-approaches-treating-metastatic-kidney-prostate>
- 121.** American Cancer Society. Biologic therapy (immunotherapy) for Kaposi sarcoma [Internet]. Learn about cancer. 2013 [citado a 2014 Mar 9]. Disponível em: <http://www.cancer.org/cancer/kaposisarcoma/detailedguide/kaposi-sarcoma-treating-biologic-therapy>
- 122.** Coventry BJ, Ashdown ML. The 20th anniversary of interleukin-2 therapy: bimodal role explaining longstanding random induction of complete clinical responses. *Cancer Manag Res* [Internet]. 2012 Jan;4:215–21. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3421468&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 123.** Penson DF, Redfern CH, Ferrari AC, Dreicer R, Sims RB, Xu Y, et al. Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2012;363:411–22.
- 124.** Jiang S, Liu Y, Wang L, Duan C, Liu M. A meta-analysis and systematic review : adjuvant interferon therapy for patients with viral hepatitis- related hepatocellular carcinoma. *World J Surg Oncol* [Internet]. World Journal of Surgical Oncology; 2013;11(1):1. Disponível em: World Journal of Surgical Oncology
- 125.** Kiladjian J, Mesa RA, Hoffman R, Dc W. The renaissance of interferon therapy for the treatment of myeloid malignancies Review article The renaissance of interferon therapy for the treatment of myeloid malignancies. *Blood*. 2014;117(18):4706–15.
- 126.** Mocellin S, Mb L, Pasquali S, Pilati P, V CS, Mocellin S, et al. Interferon alpha for the adjuvant treatment of cutaneous melanoma (Review) Interferon alpha for the adjuvant treatment of cutaneous melanoma. *Cochrane Libr*. 2013;(6).
- 127.** Berghmans T, Paesmans M, Lafitte JJ, Mascaux C, Meert AP. Role of granulocyte and granulocyte-macrophage colony-stimulating factors in the treatment of small-cell lung cancer : a systematic re v iew of the literature with methodological assessment and meta-analysis. *Lung Cancer*. 2002;37.
- 128.** Feldmann M. Many cytokines are very useful therapeutic targets in disease. *J Clin Invest*. 2008;118(11):3533–6.

- 129.** Zhang B, Liu Z, Hu X. Inhibiting cancer metastasis via targeting NADPH oxidase 4. *Biochem Pharmacol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2013;86(2):253–66. Disponível em:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2013.05.011>
- 130.** Koga F, Kihara K, Neckers LEN. Inhibition of Cancer Invasion and Metastasis by Targeting the Molecular Chaperone Heat-shock Protein 90. *Anticancer Res.* 2009;29:797–808.
- 131.** Wong D, Kandagatla P, Korz W, Chinni SR. Targeting CXCR4 with CTCE-9908 inhibits prostate tumor metastasis. *BMC Urol* [Internet]. *BMC Urology*; 2014;14(1):1–7. Disponível em: *BMC Urology*
- 132.** Wu H, Chang D, Huang C. Targeted Therapy for Cancer. *J Cancer Mol.* 2006;2(2):57–66.
- 133.** Neugut AI, Subar M, Wilde ET, Stratton S, Brouse CH, Hillyer GC, et al. Association between prescription co-payment amount and compliance with adjuvant hormonal therapy in women with early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 2011 Jun 20 [citado a 2014 Jun 8];29(18):2534–42. Disponível em:<http://www.Pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3138633&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 134.** Lichtman SM. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer. *Community Oncol.* 2013;10(1):3–4.
- 135.** Kawamata, Hitoshi; Tachibana, Masatsugu; Fujimori, Takahiro; Imai Y. Differentiation- inducing therapy for solid tumours. *Curr Pharm Des.* Japan: Bentham Science Publishers; 2006;12(3):379–85.
- 136.** National Breast Cancer Foundation Inc. Hormone Therapy [Internet]. About breast cancer. 2012 [citado a 2014 Mar 8]. Disponível em: <http://www.nationalbreastcancer.org/breast-cancer-hormone-therapy>
- 137.** Namiki M, Ueno S, Kitagawa Y. Role of hormonal therapy for prostate cancer : perspective from Japanese experiences. *Transl Androl Urol.* 2012;1(3):160–72.
- 138.** Foundation UC. Urology A-Z - Prostate Cancer: Hormone Therapy [Internet]. 2011 [citado a 2014 Mar 8]. Disponível em:<http://www.urologyhealth.org/urology/index.cfm?article=124>
- 139.** Chang, Hsin-I; Yeh M. Clinical development of liposome-based drugs : formulation , characterization , and therapeutic efficacy. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:49–60.
- 140.** Gocek E, Marcinkowska E. Differentiation therapy of acute myeloid leukemia. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2011 Jan [citado a 2014 Jul 28];3(2):2402–20. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3757424&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 141.** Triesscheijn M, Baas P, Schellens JHM, Stewart F a. Photodynamic therapy in oncology. *Oncologist* [Internet]. 2006 Oct [citado a 2014 Jun 9];11(9):1034–44. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17030646>
- 142.** National Cancer Institute. Hyperthermia in Cancer Treatment [Internet]. Fact sheet. 2011 [citado a 2014 Jun 9].Disponível em:<http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/hyperthermia>
- 143.** Wust P, Hildebrandt B, Sreenivasa G, Rau B, Gellermann J, Riess H, et al. Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet.* 2002;3(Agosto):487–97.
- 144.** American Society of Gene & Cell Therapy. Cancer Gene Therapy and Cell Therapy [Internet]. *Gene Therapy and Cell Therapy for Diseases.* 2011 [citado a 2014 Fev 20]. Disponível em: <http://www.asgct.org/general-public/educational-resources/gene-therapy-and-cell-therapy-for-diseases/cancer-gene-and-cell-therapy>

- 145.** Breast cancer trials.org. View All Trials for Early and Advanced Breast Cancer [Internet]. see all trials. 2013 [citado a 2014 Mar 6]. Disponível em: https://www.breastcancertrials.org/bct_nation/browse_trials.seam?categoryString=METASTATIC&pageRecord=0&cid=9804&utm_source=Komen&utm_medium=Website&utm_campaign=Metastatic_+Quickview
- 146.** Berger, Thomas; Dieckmann, Detlef; Efferth, Thomas; Schultz, Erwin; Funk, Jens-Oliver; Baur, Andreas; Schuler G. Artesunate in the treatment of metastatic uveal melanoma - first experiences. *Oncol Rep* [Internet]. 2005 Dec 1;14:1599–603. Disponível em: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.14.6.1599>
- 147.** FierceBiotech. Malaria Drug Studied for Treatment of Metastatic Breast Cancer - FierceBiotech [Internet]. 2014 [citado a 2014 Mar 6]. Disponível em: <http://www.fiercebiotech.com/press-releases/malaria-drug-studied-treatment-metastatic-breast-cancer>
- 148.** Platz EA, Yegnasubramanian S, Liu JO, Chong CR, Shim JS, Kenfield SA, et al. A novel two-stage, transdisciplinary study identifies digoxin as a possible drug for prostate cancer treatment. *Cancer Discov* [Internet]. American Association for Cancer Research; 2011 Jun 3 [citado a 2014 Mar 6];1(1):68–77. Disponível em: <http://cancerdiscovery.aacrjournals.org/content/early/2011/03/17/2159-8274.CD-10-0020.abstract>
- 149.** Kebebew E. Exploring the Anticancer Potential of Valproic Acid in Advanced Thyroid Cancer. *NCI Cancer Bull* [Internet]. 2012 [citado a 2014 Mar 6];9(5). Disponível em: <http://www.cancer.gov/clinicaltrials/featured/trials/NCI-10-C-0041>
- 150.** Pasquier E, Ciccolini J, Carre M, Giacometti S, Pouchy C, Montero M, et al. Propranolol potentiates the anti-angiogenic effects and anti-tumor efficacy of chemotherapy agents: implication in breast cancer treatment. *Oncotarget*. 2011;2(10):797–809.
- 151.** Araujo NCP, Afonso R, Bringela A, Cancela ML, Cristiano MLS, Leite RB. Peroxides with antiplasmodial activity inhibit proliferation of *Perkinsus olseni*, the causative agent of Perkinsosis in bivalves. *Parasitol Int* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2013;62(6):575–82. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2013.06.010>
- 152.** Mortazavi Dehkordi N, Ghaffarifar F, Mohammad Hassan Z, Esavand Heydari F. In Vitro and In Vivo Studies of Anti leishmanial Effect of Artemether on *Leishmania infantum*. *Jundishapur J Microbiol* [Internet]. 2013 Jul 1 [citado a 2014 Jul 30];6(5):1–6. Disponível em: http://www.jjmicrobiol.com/?page=article&article_id=6379
- 153.** Ghantous A, Gali-Muhtasib H, Vuorela H, Saliba N a, Darwiche N. What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials? *Drug Discov Today* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010 Ago [citado a 2014 Mar 4];15(15-16):668–78. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20541036>
- 154.** Gogtay N, Kannan S, Thatte UM, Olliaro PL, Sinclair D. Artemisinin-based combination therapy for treating uncomplicated *Plasmodium vivax* malaria. *Cochrane database Syst Rev* [Internet]. 2013 Jan [citado a 2014 Mar 7];10. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24163021>
- 155.** Morrissey, Colm; Gallis, Byron; Solazzi, Jeffrey; Kim, Byung; Gulati, Roman; Vakar-Lopez, Funda; Goodlett, David; Vessella, Robert; Sasaki T. Effect of artemisinin derivatives on apoptosis and cell cycle in prostate cancer cells. *Natl Institutes Heal*. 2011;21(4):423–32.
- 156.** Mercer AE, Maggs JL, Sun X-M, Cohen GM, Chadwick J, O'Neill PM, et al. Evidence for the involvement of carbon-centered radicals in the induction of apoptotic

cell death by artemisinin compounds. *J Biol Chem* [Internet]. 2007 Mar 30 [citado a 2014 Feb 23];282(13):9372–82. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17227762>

157. Nakase I, Lai H, Singh NP, Sasaki T. Anticancer properties of artemisinin derivatives and their targeted delivery by transferrin conjugation. *Int J Pharm* [Internet]. 2008 Abr 16 [citado a 2014 Abr 13];354(1-2):28–33. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17942255>

158. Chaturvedi D, Goswami A, Saikia PP, Barua NC, Rao PG. Artemisinin and its derivatives: a novel class of anti-malarial and anti-cancer agents. *Chem Soc Rev* [Internet]. 2010 Fev [citado a 2014 Mar 4];39(2):435–54. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20111769>

159. La Pensée L, Sabbani S, Sharma R, Bhamra I, Shore E, Chadwick AE, et al. Artemisinin-polypyrrole conjugates: synthesis, DNA binding studies and preliminary antiproliferative evaluation. *ChemMedChem* [Internet]. 2013 Mai [citado a 2014 Mar 24];8(5):709–18. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23495190>

160. Rasheed, Suhail; Efferth, Thomas; Asangani, Irfan; Allgayer H. First evidence that the antimalarial drug artesunate inhibits invasion in vivo metastasis in lung cancer by targeting essential extracellular proteases. *Int J Cancer*. 2010;1485:1475–85.

161. Efferth T, Benakis A, Romero MR, Tomicic M, Rauh R, Steinbach D, et al. Enhancement of cytotoxicity of artemisinins toward cancer cells by ferrous iron. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2004 Out 1 [citado a 2014 Fev 23];37(7):998–1009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15336316>

162. Li PCH, Lam E, Roos WP, Zdzienicka MZ, Kaina B, Efferth T. Artesunate derived from traditional Chinese medicine induces DNA damage and repair. *Cancer Res* [Internet]. 2008 Jun 1 [citado a 2014 Fev 25];68(11):4347–51. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18519695>

163. Liu WM, Gravett AM, Dalgleish AG. The antimalarial agent artesunate possesses anticancer properties that can be enhanced by combination strategies. *Int J Cancer* [Internet]. 2011 Mar 15 [citado a 2014 Fev 23];128(6):1471–80. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20886599>

164. Adisa R, Fakeye TO, Dike D. Evaluation of Adverse Drug Reactions to Artemisinin- based Combination Therapy in a Nigeria University Community. *Trop J Pharm Res*. 2008;7(Junho):937–44.

165. O'Neill PM, Barton VE, Ward S a. The molecular mechanism of action of artemisinin-the debate continues. *Molecules* [Internet]. 2010 Mar [citado a 2014 Mar 20];15(3):1705–21. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20336009>

166. Terent'ev AO, Borisov D a, Vil' V a, Dembitsky VM. Synthesis of five- and six-membered cyclic organic peroxides: Key transformations into peroxide ring-retaining products. *Beilstein J Org Chem* [Internet]. 2014 Jan 8 [citado a 2014 Jun 7];10:34–114. Disponível em: <http://www.Pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3896255&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

167. Xu H, He Y, Yang X, Liang L, Zhan Z, Ye Y, et al. Anti-malarial agent artesunate inhibits TNF-alpha-induced production of proinflammatory cytokines via inhibition of NF-kappaB and PI3 kinase/Akt signal pathway in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology (Oxford)* [Internet]. 2007 Jun [citado a 2014 Abr 13];46(6):920–6. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17314215>

168. Hou J, Wang D, Zhang R, Wang H. Experimental therapy of hepatoma with artemisinin and its derivatives: in vitro and in vivo activity, chemosensitization, and

- mechanisms of action. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2008 Set 1 [citado a 2014 Abr 13];14(17):5519–30. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18765544>
- 169.** Li Q, Weina P, Hickman M. The Use of Artemisinin Compounds as Angiogenesis Inhibitors to Treat Cancer. In: Chai J, editor. *Research Directions in Tumor Angiogenesis*. Croatia: InTech; 2013. p. 175–259.
- 170.** Singh NP, Lai HC. Artemisinin induces apoptosis in human cancer cells. *Anticancer Res* [Internet]. 2004;24(4):2277–80. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15330172>
- 171.** Jiao Y, Ge C, Meng Q, Cao J, Tong J, Fan S. Dihydroartemisinin is an inhibitor of ovarian cancer cell growth. *Acta Pharmacol Sin* [Internet]. 2007 Jul [citado a 2014 Abr 13];28(7):1045–56. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17588342>
- 172.** Crespo-Ortiz MP, Wei MQ. Antitumor activity of artemisinin and its derivatives: from a well-known antimalarial agent to a potential anticancer drug. *J Biomed Biotechnol* [Internet]. 2012 Jan [citado a 2014 Abr 13];2012:247597. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?Artid=3228295&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 173.** Huang C, Ba Q, Yue Q, Li J, Li J, Chu R, et al. Artemisinin rewires the protein interaction network in cancer cells: network analysis, pathway identification, and target prediction. *Mol Biosyst* [Internet]. 2013 Dec [citado a 2014 Abr 18];9(12):3091–100. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24085322>
- 174.** Lai HC, Singh NP, Sasaki T. Development of artemisinin compounds for cancer treatment. *Invest New Drugs* [Internet]. 2013 Fev [citado a 2014 Abr 23];31(1):230–46. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22935909>
- 175.** Kim SJ, Kim MS, Lee JW, Lee CH, Yoo H, Shin SH, et al. Dihydroartemisinin enhances radiosensitivity of human glioma cells in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. 2006 Fev [citado a 2014 Abr 13];132(2):129–35. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16273420>
- 176.** Luo J, Zhu W, Tang Y, Cao H, Zhou Y, Ji R, et al. Artemisinin derivative artesunate induces radiosensitivity in cervical cancer cells in vitro and in vivo. *Radiat Oncol* [Internet]. 2014 Mar 25 [citado a 2014 Mar 29];9(1):84. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24666614>
- 177.** Reichert, Sebastian; Reinboldt, Vera; Hehlhans, Stephanie; Efferth, Thomas; Rodel, Claus; Rodel F. A radiosensitizing effect of artesunate in glioblastoma cells is associated with a diminished expression of the inhibitor of apoptosis protein survivin. *Radiother Oncol* [Internet]. 2012 [citado a 2014 Abr 1];394–401. Disponível em: http://ac.els-cdn.com/S0167814012001521/1-s2.0-S0167814012001521-main.pdf?tid=ffaad220-b9c3-11e3b9fa0000aab0f6b&acdnat=1396373901_8e67f07cda65a8f9912f15bcbcb3d066
- 178.** Zhao, Yanyan; Jiang, Weiwei; Li, Bin; Yao, Qi; Dong, Junqing; Cen, Yanyan; Pan, Xichun; Li, Jun; Zheng, Jiang; Pang, Xueli; Zhou H. Artesunate enhances radiosensitivity of human non-small cell lung cancer A549 cells. *Int Immunopharmacol*. 2011;11:2039–46.
- 179.** Wu G-S, Lu J-J, Guo J-J, Huang M-Q, Gan L, Chen X-P, et al. Synergistic anti-cancer activity of the combination of dihydroartemisinin and doxorubicin in breast cancer cells. *Pharmacol Rep* [Internet]. 2013 Jan;65(2):453–9. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23744430>
- 180.** Mohite PB, Bhaskar VH. Potential Pharmacological Activities of Tetrazoles in The New Millennium. *J PharmTech Res*. 2011;3(3):1557–66.

- 181.** Wang S-J, Gao Y, Chen H, Kong R, Jiang H-C, Pan S-H, et al. Dihydroartemisinin inactivates NF-kappaB and potentiates the anti-tumor effect of gemcitabine on pancreatic cancer both in vitro and in vivo. *Cancer Lett* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2010 Jul 1 [citado a 2014 Abr 9];293(1):99–108. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20137856>
- 182.** Zhou H-J, Zhang J-L, Li A, Wang Z, Lou X-E. Dihydroartemisinin improves the efficiency of chemotherapeutics in lung carcinomas in vivo and inhibits murine Lewis lung carcinoma cell line growth in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol* [Internet]. 2010 May [citado a 2014 Abr 9];66(1):21–9. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19756601>
- 183.** Chen T, Li M, Zhang R, Wang H. Dihydroartemisinin induces apoptosis and sensitizes human ovarian cancer cells to carboplatin therapy. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2009 Jul [citado a 2014 Mar 20];13(7):1358–70. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18466355>
- 184.** Efferth T, Giaisi M, Merling A, Krammer PH, Li-Weber M. Artesunate induces ROS-mediated apoptosis in doxorubicin-resistant T leukemia cells. *PLoS One* [Internet]. 2007 Jan [citado a 2014 Ago 18];2(8):e693. Disponível em: <http://www.Pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1933253&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 185.** Sieber S, Gdynia G, Roth W, Bonavida B, Efferth T. Combination treatment of malignant B cells using the anti-CD20 antibody rituximab and the anti-malarial artesunate. *Int J Oncol*. 2009;35:149–58.
- 186.** Gravett AM, Liu WM, Krishna S, Chan W-C, Haynes RK, Wilson NL, et al. In vitro study of the anti-cancer effects of artemisone alone or in combination with other chemotherapeutic agents. *Cancer Chemother Pharmacol* [Internet]. 2011 Mar [citado a 2014 Abr 9];67(3):569–77. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20490800>
- 187.** Nam W, Tak J, Ryu J, Jung M. Effects of artemisinin and its derivatives on growth inhibition and apoptosis of oral cancer cells. *Head neck*. 2007;(Abril):335–40.
- 188.** Posner GH, Ploypradith P, Parker MH, Dowd HO, Woo S. Antimalarial, antiproliferative and antitumor activities of artemisinin-derived, chemically robust, trioxane dimers. *J Med Chem*. 1999;42(21).
- 189.** Horwedwl, Cindy; Tsogoeva, Svetlana; Wei, Shengwei; Efferth T. Cytotoxicity of Artesunic acid Homo- and Heterodimer Molecules toward sensitive and multidrug-resistant CCRF-CEM leukemia cells. *J Med Chem* [Internet]. 2009 [citado a 2014 Jun 7];53:4842–8. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/ipdf/10.1021/jm100404t>
- 190.** Vennerstrom, Jonathan; Chollet, Jacques; Dong, Yuxiang; Matile, Hugues; Padmanilayam, Maniyan; Tang, Yuanqing; Charman W. Spiro and Dispiro 1,2,4-Trioxolane Antimalarials. Switzerland; PCT/US02/19767, 2003. p. 1–172.
- 191.** Ostrovskii, V.A; Trifonov, R.E.; Popova EA. Medicinal chemistry of tetrazoles. *Russ Chem Bull* [Internet]. 2012 Jan;61(4):151–83. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12213451>
- 192.** Bhaskar VH, Mohite PB. synthesis, characterization and evaluation of anticancer activity of some tetrazole derivatives. *J Optoelectron Biomed Mater*. 2010;2(4):249–59.
- 193.** Williams DBG, Lawton M. Drying of organic solvents: quantitative evaluation of the efficiency of several desiccants. *J Org Chem* [Internet]. 2010 Dez 17 [citado a 2014 Mai 23];75(24):8351–4. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20945830>

- 194.** Ismael A, Serpa C, Cristiano MLS. Photochemistry of 1-allyl-4-aryltetrazolones in solution; structural effects on photoproduct selectivity. *Photochem Photobiol Sci* [Internet]. 2013 Fev [citado a 2014 Ago 7];12(2):272–83. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22983098>
- 195.** Tekale SU, Kauthale SS, Pawar RP. Solvent free N-BOC protection of amines using amberlyst a 21 solid base resin as a reusable heterogeneous catalyst. *J Chil Chem Soc.* 2013;1:1619–23.
- 196.** Tang Y, Wittlin S, Charman S a, Chollet J, Chiu FCK, Morizzi J, et al. The comparative antimalarial properties of weak base and neutral synthetic ozonides. *Bioorg Med Chem Lett* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010 Jan 15 [citado a 2014 Jun 7];20(2):563–6. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19962893>
- 197.** Montalbetti C a. GN, Falque V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* [Internet]. 2005 Nov [citado a 2014 Jul 9];61(46):10827–52. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040402005013876>
- 198.** Lehane AM, McDevitt C a, Kirk K, Fidock D a. Degrees of chloroquine resistance in Plasmodium - is the redox system involved? *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* [Internet]. Australian Society for Parasitology; 2012 Dez 1 [citado a 2014 Mai 29];2:47–57. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3388501&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 199.** Tang Y, Wittlin S, Charman S a, Chollet J, Chiu FCK, Morizzi J, et al. The comparative antimalarial properties of weak base and neutral synthetic ozonides. *Bioorg Med Chem Lett* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010 Jan 15 [citado a 2014 Jun 7];20(2):563–6. Disponível em: 193. Cortes, S; Albuquerque, A; Cabral, L.I.L; Campino, L; Cristiano M. In vitro susceptibility of Leishmania infantum to selected anti-protozoan peroxides. *Acta Trop.* 2014;
- 200.** Cortes, S; Albuquerque, A; Cabral, L.I.L; Campino, L; Cristiano M. In vitro susceptibility of Leishmania infantum to selected anti-protozoan peroxides. *Acta Trop.* 2014;
- 201.** Cortes, S; Albuquerque, A; Cabral, L.I.L; Campino, L; Cristiano M. In vitro evaluation of the leishmanicidal effects of selected peroxides. *Worldleish 5 - Fifth World Congress on Leishmaniasis.* Porto de Galinhas (Pernambuco);2013.<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19962893>