



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA

# **SÍNTESE E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTITUMORAL DE 5'-ARILSELENO AZIDOTIMIDINA**

Tese de doutorado

**Diego de Souza**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2012**

**SÍNTESE E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTITUMORAL DE 5'-  
ARILSELENO AZIDOTIMIDINA**

**por**

**Diego de Souza**

**Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação  
em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica. Área de  
Concentração em Bioquímica Toxicológica, da Universidade  
Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para  
obtenção do grau de Doutor em Bioquímica Toxicológica**

**Orientador: Oscar Endrigo Dorneles Rodrigues**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2012**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Tese de Doutorado

**SÍNTESE E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTITUMORAL DE  
5'-ARILSELENO AZIDOTIMIDINA**

elaborada por  
**Diego de Souza**

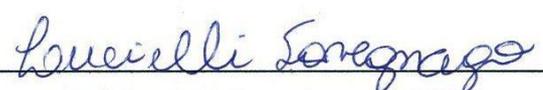
como requisito parcial para a obtenção do grau de  
Doutor em Bioquímica Toxicológica

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Oscar Endrigo Dorneles Rodrigues**  
(Presidente/Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Diego Alves - UFPEL**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Luciano Dornelles – UFSM**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr.ª Lucielli Savegnago - UFPEL**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr.ª. Maria Rosa Chitolina Schetinger- UFSM**

Santa Maria, Março de 2012.

## **Agradecimentos**

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus e aos meus pais e irmão, que sempre foram o grande pilar das minhas conquistas e fizeram parte dessa caminhada desde o início. Por isso, essa conquista é de vocês também.

A Margi fica aqui registrado o meu muito obrigado, pois só você saberia, aos poucos, conquistar seu espaço ao meu lado, e se tornaria além de tudo uma grande e sincera amiga, que mesmo nos momentos mais difíceis sei que estarás ao meu lado. Inclusive no momento mais decisivo desta tese, a finalização.

Ao Prof. Oscar meus sinceros agradecimentos pela orientação, paciência, amizade e todo conhecimento passado durante o doutorado.

Aos antigos e novos colegas do LabSelen-Nanobio, que fazem por merecer realmente meu agradecimento, pois vocês fizeram parte da minha vida e foram como se fosse a minha segunda família. Porque mesmo entre os conflitos e confusões diárias, tivemos vários momentos de alegrias. Além disso, gostaria de registrar um agradecimento especial a essas pessoas: Cris (Japinha), André (Galo), Rafa (meu eterno IC), Juliano (Bebê) e Raquel (Nega).

Aos colegas do Laboratório do Prof. Gilson, Prof.<sup>a</sup> Cristina, Prof. Cláudio e Prof. João Batista principalmente pelos reagentes e outros materiais emprestados, pois além disso vocês se tornaram grandes companheiros nesses últimos anos.

A gurizada do Pós-Jogo FC, pois nunca imaginei que todos nós seríamos grandes amigos e faríamos de cada quinta-feira um evento.

A todos os colegas da UNISC, que nos últimos meses tem sido de suma importância para o meu crescimento profissional e principalmente como professor.

Ao CNPq e a CAPES pelas bolsas e auxílios concedidos durante todo o período de pós-graduação.

E por fim, gostaria de agradecer a todos que passaram na minha vida ao longo de todos esses anos, pois de alguma forma vocês contribuíram, seja direta ou indiretamente, para que essa conquista fosse alcançada.

*"Seja você quem for, seja qual for a sua posição social,  
a mais alta ou a mais baixa, que você tenha na vida  
sempre como meta muita força, muita determinação  
e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus,  
que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá."*

*Ayrton Senna*

## Resumo

Tese de Doutorado

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### SÍNTESE E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTITUMORAL DE 5'-ARILSELENO AZIDOTIMIDINA

AUTOR: Diego de Souza

ORIENTADOR: Oscar Endrigo Dorneles Rodrigues

DATA E LOCAL DA DEFESA: Santa Maria, 30 de março de 2012.

A síntese de compostos que usam como base a estrutura de nucleosídeos é um campo que possui uma intensa aplicação biológica. Dentre estes compostos, o mais conhecido é a azidotimidina ou zidovudina (AZT), um fármaco que teve sua síntese inicial voltada para o combate de processos tumorais. No entanto, descobriu-se que este poderia agir no combate viral e hoje é o fármaco de primeira escolha no tratamento da síndrome da imunodeficiência adquirida. Adicionalmente, compostos organocalcogênio, principalmente compostos de selênio, despertam a atenção da comunidade científica principalmente devido as suas potencialidades biológicas. Dessa forma, a fim de explorar a base estrutural dos nucleosídeos e as influências biológicas que modificações na posição 5' do anel da desoxirribose do AZT promoveriam, planejou-se através de uma eficiente rota sintética, a síntese de uma nova série de nucleosídeos, os 5'-arilselênio azidotimidina, que apresentaram a inserção do átomo de selênio ligados a diferentes grupamentos arílicos. Com o objetivo de realizarmos uma seleção dos melhores compostos da série de selenonucleosídeos, avaliamos o parâmetro toxicológico para o estresse oxidativo (TBARS e tiol peroxidase) destes compostos. Onde, os compostos 5'-*p*-metilselênio azidotimidina (**3b**) e 5'-*p*-cloroselênio azidotimidina (**3h**) apresentaram os resultados mais promissores, apresentando inclusive perfil como agente antioxidante. Dessa forma, após realizarmos a triagem, os compostos **3b** e **3h** tiveram suas atividades testadas frente à cultura celular de linhagem de câncer de bexiga (5637). Os testes buscaram avaliar os parâmetros de citotoxicidade, morfologia celular, análise apoptótica e a expressão gênica. Os resultados obtidos mostraram que os compostos **3b** e **3h** apresentaram perfil apoptótico, além de serem capazes de modular a expressão do gene anti-apoptótico. Por fim, os resultados obtidos, apontam que os compostos **3b** e **3h** além de apresentarem um perfil antioxidante, possuem ação pró-apoptótica mais eficientes do que o próprio AZT. Dessa forma, considerando todos os resultados obtidos, foi possível concluir que essa nova série de nucleosídeos apresenta potencial antitumoral, podendo ser usado quimiopreventivamente, aliado ao perfil antioxidante.

Palavras-chave: nucleosídeo, AZT, selênio, antioxidante, antitumoral

## Abstract

Thesis of Doctor's Degree

Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### SYNTHESIS AND ANTIOXIDANT AND ANTITUMOR ACTIVITIES OF 5'-ARYLSELENO AZIDOTHYIMIDINE

AUTHOR: Diego de Souza

ADVISOR: Oscar Endrigo Dorneles Rodrigues

DATE AND PLACE OF THE DEFENSE: Santa Maria, 30 march 2012.

The synthesis of compounds that use a nucleoside as the base structure, has an intense field application. Among these compounds, the most known nowadays is azydothymidine or zidovudine, a drug which was first synthesized to work against tumor processes. However, it was discovered that it could take action to viral combat and now it is the drug of choice in the treatment of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). On the other hand, organochalcogens compounds have been calling the attention of the scientific community, mainly because of their potential in biological molecules containing these atoms. Considering this last factor and aiming to explore the structural basis of nucleosides and biological influences that changes in the 5' position of the deoxyribose ring of AZT would promote, it was planned through an efficient and accessible synthetic route to produce a new series of nucleosides, the 5'-arylseleno azidothymidine, which had the insertion of the selenium atom connected to different aril groups. Moreover, the series of selenium derivatives were evaluated for their toxicological potential for oxidative stress (TBARS and thiol peroxidase), where the compounds 5'-*p*-methylseleno azidothymidine **3b** and 5'-*p*-chloroseleno azidothymidine (**3h**) had the results of this series, with potential as antioxidant agent. After this, the compounds **3b** and **3h** were tested against culture cell lines of bladder cancer (5637). The tests aimed to assess the cytotoxicity, cell morphology, apoptosis analysis and gene expression. The results showed that the compounds **3b** and **3h** present apoptotic profile, additionally they seem to modulate the expression of anti-apoptotic gene. The results obtained indicate that the compounds **3b** and **3h** in addition of presenting an antioxidant potential, have a pro-apoptotic profile, even more effective than AZT itself. Considering all the results presented, it was concluded that this new nucleoside serie has great antitumor potential and can be used as a chemopreventive, combined to the antioxidant potential.

Keywords: nucleoside, AZT, selenium, antioxidant, antitumor.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 DESENVOLVIMENTO</b> .....	4
<b>2.1 Nucleosídeos</b> .....	4
2.1.1 Nucleosídeo Inibidor da Transcriptase reversa (NITR) – AZT.....	7
2.1.1.1 Farmacologia molecular dos IsTRN – AZT.....	8
2.1.1.2 Metabolismo.....	9
2.1.2 Atividade Antitumoral dos Nucleosídeos.....	10
2.1.2.1 Mecanismo de ação e metabolismo dos análogos nucleosídeos....	11
2.1.3 Análogos Nucleosídeos usados como agentes biológicos.....	13
2.1.3.1 Derivados da Deoxiadenosina.....	13
2.1.3.2 Derivados da Deoxicitidina.....	14
2.1.3.3 Nucleosídeos Fluoropirimidina.....	16
2.1.4 Síntese de análogos nucleosídeos com atividade antitumoral.....	17
<b>2.2 Calcogênios</b> .....	23
2.2.1 Ocorrência natural de selênio nas proteínas.....	24
2.2.2 Selenocisteína e Selenometionina: Estados de Oxidação e Catálise Redox.....	26
2.2.3 Suplementação de selênio como agente quimiopreventivo.....	28
2.2.4 Selenoproteínas e a prevenção contra o câncer.....	29
2.2.5 Síntese de compostos organoselênio com potencial antitumoral.....	30
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	34
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	34
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	34
<b>4 PATENTE E ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	35
<b>4.1 Patente</b> .....	36
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	100
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	109
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	111

<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>112</b>
<b>9 ANEXOS.....</b>	<b>117</b>
<b>9.1 Artigo 1.....</b>	<b>118</b>
<b>9.2 Artigo 2.....</b>	<b>148</b>

## ABREVIATURAS E SIGLAS

AZT	Azidotimidina
CCD	Cromatografia em camada delgada
d	Dubleto
DAST	Dietilamino trifluoreto de enxofre
dd	Duplo dubleto
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERO	Espécie reativa de oxigênio
g	Gramas
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona
h	Horas
Hz	Hertz
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IsTRN	Inibidores de Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeo
<i>J</i>	Constante de acoplamento
m	Multipleto
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
MDA	Malondialdeído
Me	Grupo metila
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MsCl	Cloreto de Mesila
mTOR	Alvo da rampamicina em mamíferos
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
s	Singleto

SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
t	Tripleto
t.a.	Temperatura ambiente
THF	Tetraidrofurano
TR	Transcriptase reversa
$\delta$	Deslocamento químico
°C	Graus Celcius

## 1. INTRODUÇÃO

Os nucleosídeos são heterociclos essenciais para a construção dos blocos moleculares da vida, como DNA e RNA. Estruturalmente os nucleosídeos são glicosilaminas consistindo de uma base azotada (muitas vezes referida como simplesmente base) ligadas a um açúcar (ribose ou desoxirribose) através de uma ligação- $\beta$ -N<sub>1</sub> glicosídica. No organismo, estes podem ser fosforilados no interior da célula por quinases específicas no álcool primário do açúcar (-CH<sub>2</sub>-OH), produzindo nucleotídeos, e dessa forma serem incorporados ao DNA e RNA. Alguns exemplos de nucleosídeos incluem a citidina, uridina, adenosina, timidina, guanosina e inosina (Chu, 2002).

Devido a sua importância biológica, o uso de análogos nucleosídicos tem ganhado papel de destaque no tratamento de diversas enfermidades, principalmente devido a importância dos nucleosídeos endógenos no organismo (Vorbruggen, 2001). Além disso, são uma classe estabelecida clinicamente útil de agentes medicinais que possuem uma ampla gama de atividades antivirais e anticancerígenas.

A busca e o desenvolvimento de espécies mais eficazes, seletivas e não tóxicas como agentes antivirais e antitumorais tem sido objeto de intensa pesquisa. Conseqüentemente, extensas modificações tem sido realizadas nos nucleosídeos tanto na base quanto na molécula do açúcar (Bonate et. al., 2006).

Um dos nucleosídeos mais conhecidos o AZT (3'-azido-2',3'-dideoximidina), também conhecido por azidotimidina, zidovudina ou retrovir, foi sintetizado pela primeira vez em 1964 por Horwitz, inicialmente sendo apresentado como uma droga anticancerígena. No entanto, seus estudos iniciais foram deixados de lado, por possuir baixo poder antitumoral. O projeto envolvendo o AZT foi retomado no início da década de 70, quando sua atividade antiviral foi descrita pela primeira vez, sendo em 1985 o primeiro composto a apresentar atividade anti-HIV (Mitsuya et. al., 1985). Em 1986, o AZT foi aprovado pelo órgão norte-americano de controle sobre produtos

farmacêutico FDA (“Food and Drug Administration”), sendo comercializado pelos laboratórios Burroughs-Wellcome em 1987. Após a descoberta como inibidor competitivo da Transcriptase Reversa (TR), uma das enzimas críticas do ciclo da replicação viral, passou a ser o fármaco de primeira escolha para combate ao vírus HIV (Wu et. al., 2007).

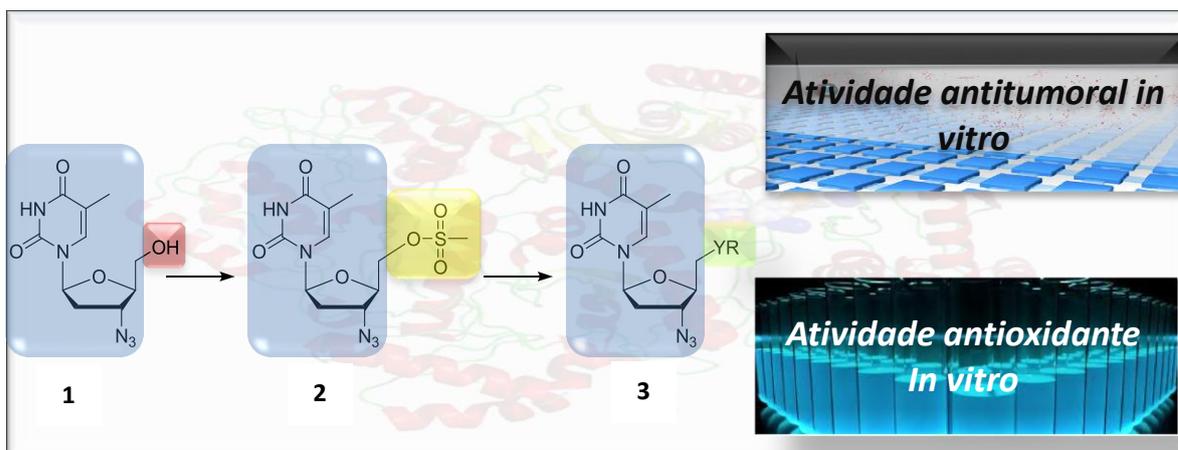
Apesar do baixo poder antitumoral do AZT, a importância dos nucleosídeos na terapia antitumoral vem aumentando nos últimos anos, devido principalmente a introdução de novas drogas nucleosídicas no mercado farmacêutica (Mackey et. al., 1998). No entanto, a eficácia clínica de drogas antitumorais nucleosídicas depende de uma complexa interação dos transportadores de mediação da entrada dos medicamentos nucleosídicos nas células, mecanismos de efluxo que removem as drogas dos compartimentos intracelular e metabolismo celular dos metabólitos ativos (Damaraju et. al., 2003)

No entanto, a eficácia do tratamento quimioterápico pode resultar na deterioração física dos pacientes com câncer, principalmente por serem altamente prejudiciais, inclusive para células saudáveis, além de desencadear diversos efeitos adversos. Dentre os fármacos mais conhecidos podemos citar: Doxorubicina, 5-Fluoruracil, Ciclofosfamida, Fludarabina, Clorambucil, Vincristina, Bussulfano, entre outros. Apesar de eficientes todos esses fármacos apresentam apenas poder prooxidante, sendo prejudiciais tanto para células “doentes” como em células saudáveis (Denisov et. al., 2005). Dessa forma, as pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos, hoje relacionam dois fatores: a supressão da carcinogênese e o baixo poder prejudicial sobre células saudáveis (Jaeschke et. al, 2002).

Como o desenvolvimento de muitas formas de câncer podem surgir do dano genotóxico causado pela acumulação de modificações oxidativas nas bases do DNA e a quebra da vertente única ou dupla hélice do DNA (James et. al, 2003), os compostos organocalcogênicos tem surgido como uma alternativa para o tratamento do câncer, agindo principalmente através de enzimas de detoxificação das espécies reativas de oxigênio (EROs) (Steinbrenner, 2009). A

capacidade desses compostos para inibir o crescimento celular e para induzir a apoptose de células tumorais é sugerida como um mecanismo potencial para quimioprevenção do câncer (Naithani, 2008). Inclusive, especula-se que a apoptose induzida por compostos organocalcogênios pode remover células transformadas durante a carcinogênese e suprimir a expansão clonal desse tipo celular.

Dessa forma, planejou-se a síntese de uma nova série de compostos organocalcogênios usando nucleosídeos. Esses compostos calcogeno-nucleosídeos, tiveram como base a estrutura nucleosídica de um análogo da timidina, o AZT, inserindo átomos de selênio em sua estrutura na posição 5'. Além de se tratar de uma nova série de compostos os derivados sintetizados, os chamados de 5'-arilselênio azidotimidina, tiveram suas atividades avaliadas frente a parâmetros antioxidante e antitumoral.

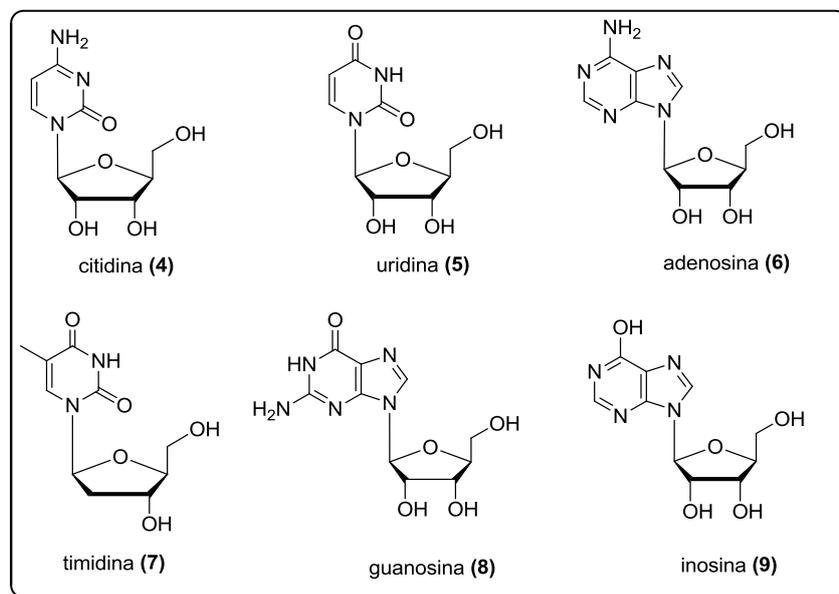


**Esquema 1:** Rota geral sintética e avaliação biológica dos compostos 5'-calcogeno azidotimidina.

## 2. DESENVOLVIMENTO

### 2.1 Nucleosídeos

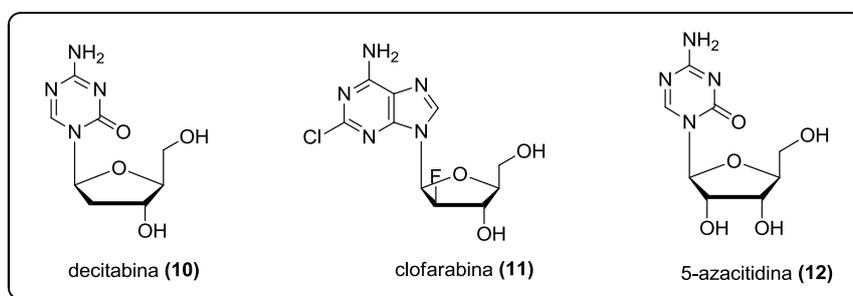
Os nucleosídeos são heterociclos essenciais para a construção dos blocos moleculares da vida, como DNA e RNA. Estruturalmente os nucleosídeos são glicosilaminas consistindo de uma base azotada (muitas vezes referida como simplesmente base) ligadas a um açúcar (ribose ou desoxirribose) através de uma ligação- $\beta$ -N<sub>1</sub> glicosídica (Figura 1). No organismo, estes podem ser fosforilados no interior da célula por quinases específicas no álcool primário do açúcar (-CH<sub>2</sub>-OH), produzindo nucleotídeos, e dessa forma serem incorporados ao DNA e RNA. Alguns exemplos de nucleosídeos incluem a citidina **(4)**, uridina **(5)**, adenosina **(6)**, timidina **(7)**, guanossina **(8)** e inosina **(9)** (Chu, 2002).



**Figura 1:** Nucleosídeos de ocorrência natural

A produção dos nucleosídeos ocorre via *síntese de novo*, em particular no fígado, mas são mais abundantemente fornecidos através da ingestão e digestão dos ácidos nucléicos da dieta, em que nucleotidases hidrolizam-se em nucleotídeos, em nucleosídeos e fosfato. Os nucleosídeos, por sua vez, são

posteriormente hidrolizam-se no lúmen do sistema digestivo por nucleosídeses em nucleobases e ribose ou desoxirribose. Nos últimos anos, o uso de análogos nucleosídicos tem ganhado papel de destaque no tratamento de diversas enfermidades, principalmente devido à importância dos nucleosídeos endógenos no organismo. Além disso, são uma classe estabelecida clinicamente útil de agentes medicinais que possuem uma ampla gama de atividades antivirais e anticancerígenas (Vorbruggen, 2001). Exemplo disso, são a decitabina (**10**), clofarabina (**11**), e 5-azacitidina (**12**), figura 2, que foram recentemente aprovadas para o tratamento de síndromes mielodisplásicas e leucêmicas (Gore, 2006; Bonate et. al., 2006; Issa et. al., 2005)



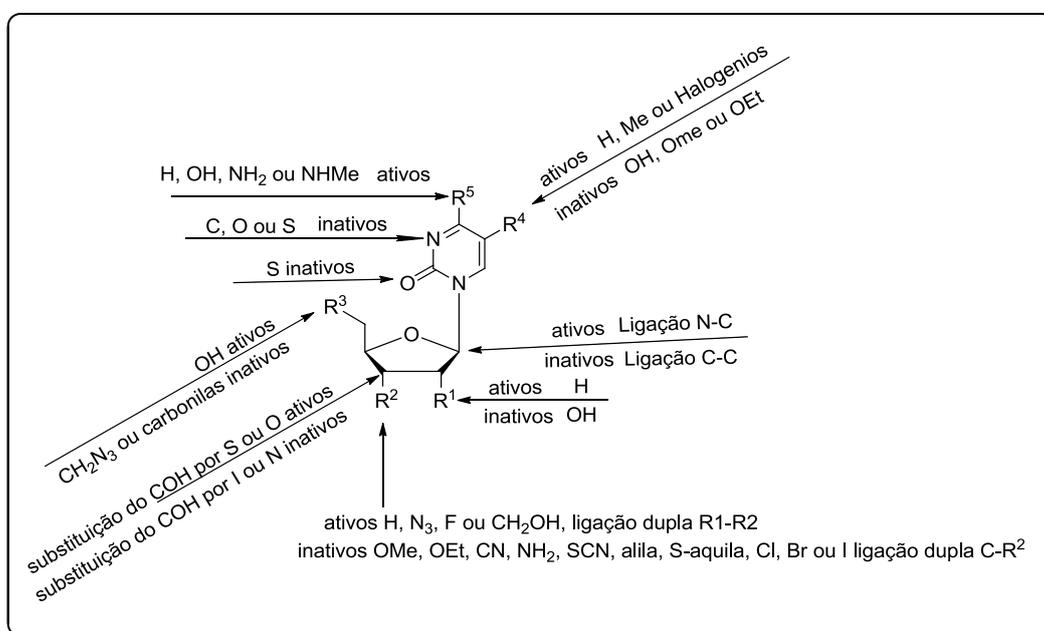
**Figura 2:** Nucleosídeos com atividade antitumoral

Os análogos nucleosídicos, tais como o 4'-tio-β-D-arabinofuranosila (4'-tio-Ara-C), tem apresentado eficiente atividade contra tumores em relação aos seus homólogos "oxa", devido a um aumento na estabilidade, que resulta em melhoria das propriedades farmacocinéticas. Da mesma forma 4'-tio-oligonucleosídeos formam complexos com afinidade similar à de seu homólogo "oxa" com o benefícios adicionais, principalmente o que se refere as nucleases. Embora a maioria destes análogos exerçam seus efeitos através da terminação de alongamento do DNA, mecanismos alternativos incluem também a inibição da metilação da ribonucleotídeo redutase do DNA (Chapdelaine et. al., 2009).

Entre os agentes antivirais, os usados no tratamento de uma série de doenças causadas por vírus herpes simplex (HSV), citomegalovírus humano (HCMV), varicela zoster vírus (VZV), vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) e vírus anti-hepatite B humana (HBV) e C (HCV) são análogos

nucleosídicos que merecem destaque. Desde 1980, uma variedade de nucleosídeos biologicamente ativos e promissores foram descobertos, alguns dos quais estão sendo usados clinicamente ou estão em fase de desenvolvimento pré-clínico ou clínico. Atualmente, diversos nucleosídeos são usado clinicamente para o tratamento de HIV-1, vírus herpes, infecções HBV, HCV e RSV (Gumina et. al., 2003)

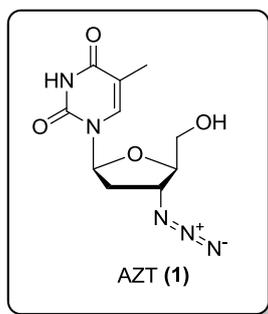
Após a descoberta dos dideoxynucleosídeos, como potentes agentes terapêuticos para o tratamento da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), um amplo desenvolvimento desta classe de compostos ativos foram sintetizados com o objetivo de se obter fármacos mais eficazes (Gumina et. al., 2003). Empregando modelos teóricos e computacionais de relação estrutura-atividade (SAR="Structure-Activity Relationship") foram identificados posições e grupos farmacofóricos e toxicofóricos (Esquema 2). Graças aos estudos estrutura-atividade anteriormente mencionados, em 1991 foram descobertos novos compostos análogos de nucleosídeos anti-HIV merecendo destaque os compostos ddl, ddA, d4T e o ddC (Souza, 2003)



**Esquema 2:** Estudo estrutura-atividade para a síntese de novos nucleosídeos

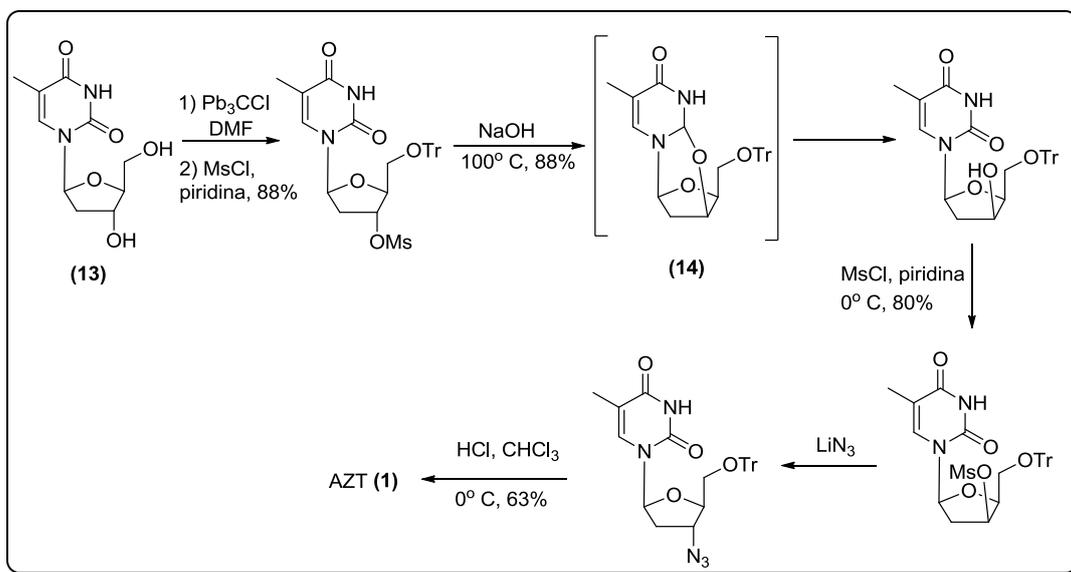
### 2.1.1 Nucleosídeo Inibidor da Transcriptase reversa (NITR) - AZT

O primeiro inibidor da transcriptase reversa e mais conhecido nucleosídeo no mercado atualmente, foi sintetizado pela primeira vez em 1964 por Horwitz, o AZT (3'-azido-2',3'-dideoximidina), também conhecido por azidotimidina, zidovudina ou retrovir, inicialmente foi apresentado como uma droga anticancerígena. No entanto, seus estudos iniciais foram deixados de lado, por possuir baixo poder antitumoral. O projeto envolvendo o AZT (Figura 3) foi retomado no início da década de 70, quando sua atividade antiviral foi descrita pela primeira vez, sendo em 1985 o primeiro composto a apresentar atividade anti-HIV (Mitsuya et. al., 1985). Em 1986, o AZT foi aprovado pelo órgão norte-americano de controle sobre produtos farmacêuticos FDA ("Food and Drug Administration"), sendo comercializado pelos laboratórios Burroughs-Wellcome em 1987. Após a descoberta como inibidor competitivo da Transcriptase Reversa (TR), uma das enzimas críticas do ciclo da replicação viral (Wu et. al., 2007), passou a ser o fármaco de primeira escolha para combate ao vírus HIV.



**Figura 3:** Estrutura do nucleosídeo sintético- AZT

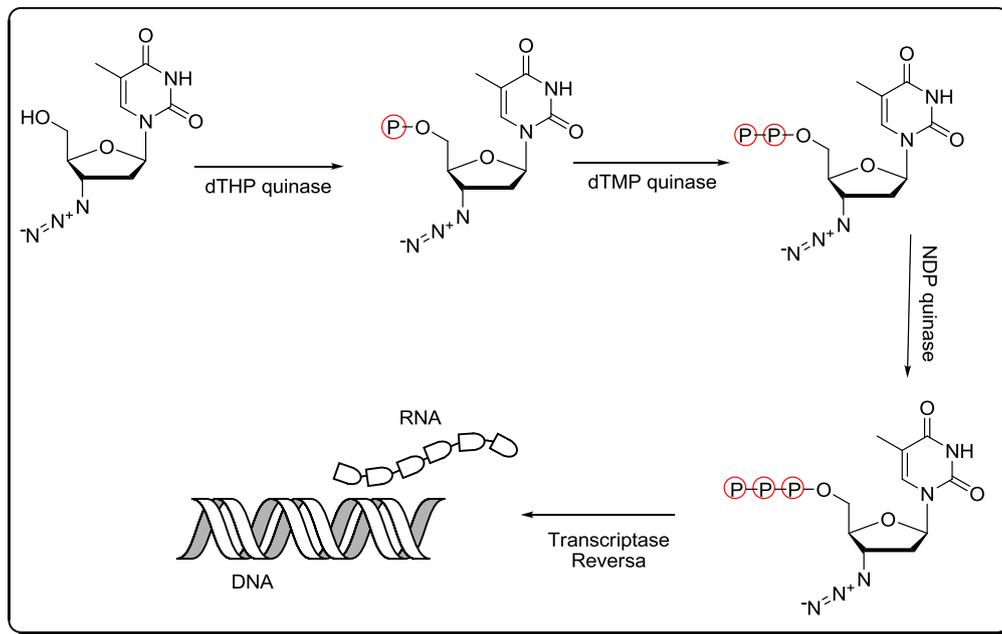
A rota sintética utilizada foi a de Horwitz, sendo o primeiro método de preparação industrial do AZT (Esquema 3). Esta síntese tem como material de partida a timidina (**13**), tendo sido realizada em seis etapas com um rendimento global de 30% e possuindo como etapa-chave a formação do intermediário cíclico **14**.



**Esquema 3:** Primeira rota sintética proposta para a obtenção do AZT.

#### 2.1.1.1 Farmacologia molecular dos Inibidores de Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeo (IsTRN) - AZT

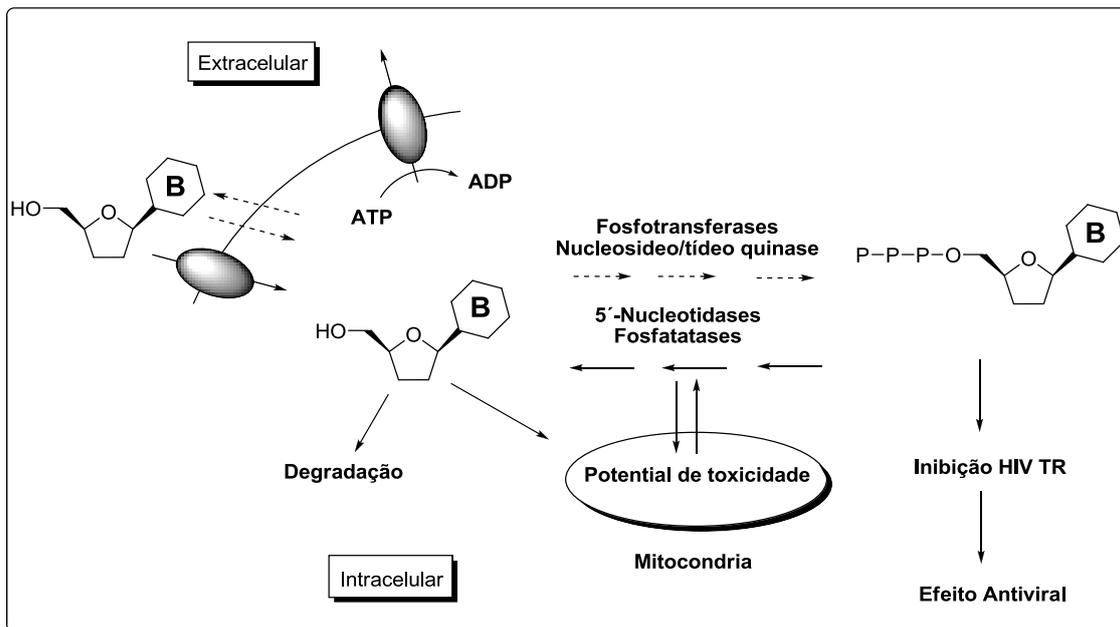
O AZT, assim como todos os IsTRN são análogos endógenos dos 2'-desoxi-nucleosídeos e -nucleotídeos. Sua forma inicial é inativa e requer sucessivas fosforilações pelas quinases celulares e fosfotransferases para formar desoxinucleosídeos trifosfatos (dNTP) análogos capazes de inibição viral. Em sua respectiva forma trifosfato (TP), IsTRN competem com seus correspondentes dNTPs endógenos pela incorporação no HIV RT (Esquema 4). Uma vez incorporados, eles servem como cadeia-terminal da transcriptase reversa viral, assim, atuando no início do ciclo de replicação viral, inibindo um passo crítico da síntese do DNA proviral antes da integração ao genoma da célula (Clercq, 2004).



**Esquema 4:** Mecanismo de ação do AZT.

#### 2.1.1.2 Metabolismo

A dependência absoluta dos processos enzimáticos da célula hospedeira para sua ativação é um elemento único na farmacologia dos derivados do ISTRN, como o AZT. O metabolismo desses derivados tem sido revisto em detalhes e, portanto, um esquema geral para a ativação reversível da NRTIs está representado, na Figura 4, meramente como ilustração (Cihlar et. al, 2009).



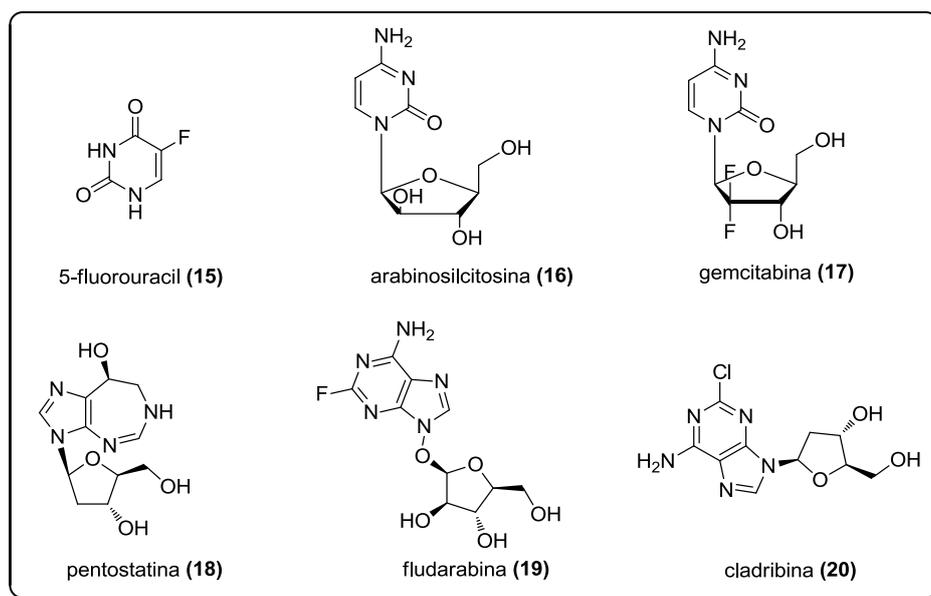
**Figura 4:** Esquema geral da ativação dos NRTIs.

### 2.1.2 Atividade Antitumoral dos Nucleosídeos

A importância dos nucleosídeos na terapia antitumoral tem aumentado nos últimos anos, devido principalmente a introdução de novas drogas nucleosídicas no mercado farmacêutico (Mackey et. al., 1998). A eficácia clínica de drogas antitumorais nucleosídicas depende de uma complexa interação dos transportadores de mediação da entrada dos medicamentos nucleosídicos nas células, mecanismos de efluxo que removem as drogas dos compartimentos intracelular e metabolismo celular dos metabólitos ativos (Damaraju et. al., 2003)

Análogos nucleosídicos compreendem uma importante classe de agentes quimioterápicos para o tratamento do câncer. A eficácia desses agentes como drogas antitumorais foi estabelecida em 1960, através dos antimetabólitos nucleobase 5-fluorouracil (**15**) e das tiopurinas. Posteriormente, nucleosídeos, que são frequentemente alterados na porção de carboidrato, se tornaram o foco para o desenvolvimento de análogos de ácidos nucléicos. A maioria dos esforços foram direcionados para os constituintes e sua

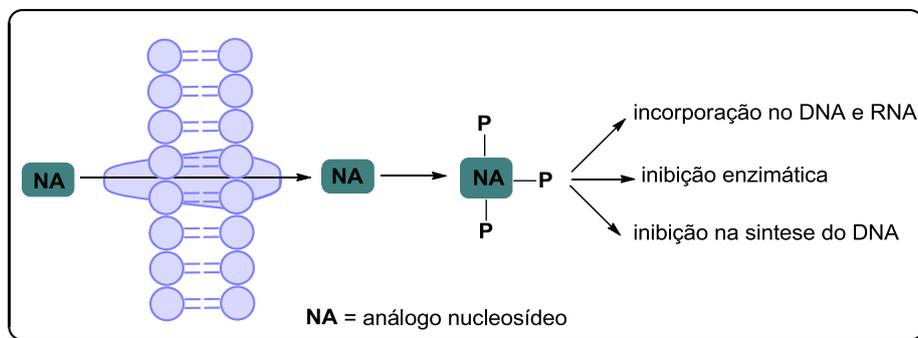
configuração sobre o carbono 2', pois este é um sítio enzimático muito importante do DNA. A descoberta de que análogos nucleosídeos da pirimidina como arabinosilcitosina (ara-C, **16**), possuem atividade sobre a leucemia mielóide aguda influenciou a investigação análogos que poderiam ter um espectro mais amplo de atividade. Isto foi alcançado, com o desenvolvimento da gemcitabina (**17**), outro analago da desoxicitidina, que é eficaz contra uma variedade de tumores e também pode ter valor terapêutico em doenças hematológicas malignas. Em paralelo, com o surgimento de gemcitabina vieram as investigações que estabeleceram que a família de análogos nucleosídicos da purina, como a pentostatina (**18**), fludarabina (**19**) e cladribina (**20**), possuem atividade principal em células B malignas (Figura 5). Os mecanismos de ação e as atividades clínicas de todos estes agentes têm sido revisto em profundidade (Sampath et. al., 2003).



**Figura 5:** Análogos nucleosídicos usados como agentes antitumorais.

Análogos de nucleosídeos citotóxicos são antimetabólitos que interferem com a síntese de ácidos nucléicos. Esses agentes podem exercer atividade citotóxica por serem incorporados e alterar o DNA e RNA, por interferir em várias enzimas envolvidas na síntese de ácidos nucléicos, ou modificar o metabolismo dos nucleosídeos fisiológicos (Galmarini, 2002).

Os análogos nucleosídicos partilham características comuns, incluindo o transporte mediado por transportadores de membrana, ativação por metabólitos intracelulares que mantêm resíduos de nucleotídeo na célula e a formação de derivados ativos de fosfato. Estes análogos são geralmente moléculas hidrofílicas, e requerem proteínas transportadoras especializadas de nucleosídeos para entrar na célula. Algumas hipóteses sugerem que a abundância e a distribuição nos tecidos das proteínas de transportadoras de nucleosídeos contribui para a especificidade e sensibilidade celulares dos análogos nucleosídeos (Figura 6). No entanto, cada um destes compostos possui uma única interação droga-alvo o que ajuda a explicar as suas diferenças na atividade em diversas doenças. Por exemplo, os efeitos citotóxicos dos análogos da purina fludarabina e cladribina sobre a não-divisão de células pode ser explicado pela interação com alvos que envolvem o reparo do DNA, em vez da replicação e dos efeitos diretos ou indiretos na mitocôndria (Galmarini, 2002).



**Figura 6:** Características comuns do metabolismo e interação farmaco-sítio ativo dos análogos nucleosídicos.

### 2.1.3 Análogos Nucleosídeos usados como agentes biológicos

#### 2.1.3.1 Derivados da Deoxiadenosina

Os dois derivados da desoxiadenosina, **19** e **20**, são atualmente usados sozinhos ou em combinação para o tratamento de determinadas doenças

malignas no sangue, a fludarabina para leucemia linfocítica crônica e cladribina para células Tricoleucemicas (Galmarini, 2002). Atividades a parte, estas drogas tem ação contra doenças linfoides malignas incluindo linfomas não-Hodgkin, macroglobulinemia Waldeström, e linfomas cutâneos de células T, possuindo pouca atividade contra o mieloma múltiplo e tumores mais sólidos (Herdewijn, 2008).

A fludarabina, ao contrário de **20**, é administrada como a forma solúvel 5'-monofosfato (monofosfato de fludarabina) e desfosforilada por fosfatases do soro e ligadas à membrana 5'-ectonucleotidase (CD73), antes do transporte para a célula. Ambos os fármacos nucleosídicos são rapidamente absorvidas pelas células-alvo através dos transportadores nucleosídeos de membrana e ativados para suas formas de trifosfato. O passo inicial neste processo de ativação é catalisado pela desoxicitidina quinase embora desoxiguanosina quinase na mitocôndria, também tem sido identificado como um enzima de fosforilação para a cladribina. Reciprocamente, 5'-nucleotidases citosólicas desfosforilam as formas monofosfato da fludarabina e cladribina. Uma vez que a fludarabina ou cladribina seja incorporada ao DNA, mediada pelo alongamento da cadeia catalisada pela DNA polimerase, induzirá a apoptose celular na fase S do ciclo celular. Ambos os compostos também, indiretamente, impedem a replicação do DNA, por inibir a ribonucleotídeo redutase, consequentemente reduzindo o *pool* de desoxinucleotídeo trifosfatos (dNTPs) necessários para a síntese de DNA, e aumentando a sua própria citotoxicidade (Galmarini, 2002).

A **19** e **20** também são citotóxicos para as demais células. A explicação mais provável para a citotoxicidade celular envolve a inibição de reparo do DNA celular. A incorporação dos metabólitos trifosfatos ativos ao sistema de reparo do DNA, leva ao acúmulo progressivo da quebra da fita simples de DNA, eventualmente, responsável pela apoptose tanto por vias dependentes p53 e independentes p53 (Chu, 2002).

Outra consequência celular do tratamento com fludarabina e cladribina é a ativação direta da caspase 9/caspase 3, o mecanismo de morte celular, pela

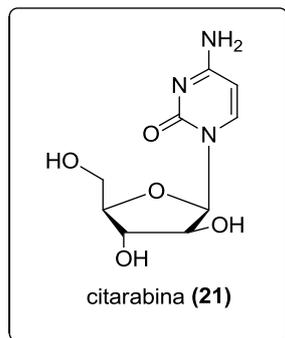
interação de seus metabólitos trifosfatos ativos com o fator pró-apoptótico Apaf1 (Gumina, 2003). Os perfis de toxicidade de ambos os fármacos são semelhantes e incluem mielossupressão moderada e imunossupressão profunda e prolongada. Um dos resultados dessa imunossupressão é um aumento de infecções oportunistas e, potencialmente, maior risco de cânceres secundários. Neurotoxicidade grave pode ocorrer em doses mais elevadas.

#### 2.1.3.2 Derivados da Deoxicidina

A Citarabina (**21**), como pode ser verificado na Figura 7, é um análogo da desoxicidina comumente usado no tratamento de doenças hematológicas malignas, mas sem atividade em tumores sólidos. Esta droga é um dos agentes mais ativos no tratamento da leucemia mielóide aguda (Galmarini, 2002).

Os principais efeitos adversos das doses convencionais de citarabina são leucopenia (principalmente granulocitopenia), trombocitopenia, náuseas e vômitos, diarreia, mucosite e perda de cabelo. Altas doses de citarabina, tem sido comumente associadas a esses efeitos adversos e com neurotoxicidade e pericardite. A atividade citotóxica da citarabina é limitada por características como desaminação metabólica, baixa afinidade pela deoxicidina quinase e rápida eliminação dos derivados trifosfatos.

Para resolver esses problemas, outros análogos da desoxicidina foram sintetizados. Ao contrário da citarabina, a gemcitabina tem atividade em tumores sólidos. Como único agente, a gemcitabina tem uma atividade consistente em pacientes com cânceres de pâncreas, de mama, pulmão e ovário. Gemcitabina é mais lipofílica do que citarabina e é um melhor substrato para os transportadores nucleosídeos de membrana; dos substratos conhecidos tem maior afinidade pela deoxicidina quinase.



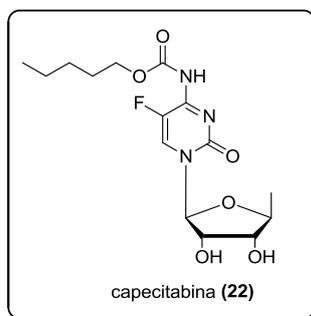
**Figura 7:** Estrutura da citarabina um análogo da desoxicitidina.

Essas características resultam em um acúmulo mais eficiente e uma maior retenção da gencitabina trifosfato em células tumorais, além de melhorar sua citotoxicidade. Após a incorporação da gencitabina nos ácidos nucleicos, um nucleótido adicional é adicionado naturalmente, impedindo a ativação do DNA de reparo. Gencitabina também inibe a síntese do DNA indiretamente através da inibição da ribonucleotídeo redutase, bloqueando assim, o mecanismo da síntese de novo do DNA. A atividade da gencitabina é auto potencializada nas concentrações intracelulares ao diminuir os níveis normais de desoxinucleotídeo trifosfatos (particularmente dCTP). Redução celular de dCTP aumenta a incorporação de nucleotídeos gencitabina no DNA e favorece o aumento na formação de difosfatos gencitabina e trifosfatos ativos, uma vez que a atividade da quinase deoxicitidina é regulada por concentrações elevadas de dCTP celular (Galmarini, 2002).

Baixas concentrações de dCTP celular também diminuem a depuração metabólica dos nucleotídeos de gencitabina pelo monofosfato desoxicitidina desaminase (dCMP desaminase). Em altas concentrações celulares, o trifosfato de gencitabina inibe diretamente dCMP desaminase e CTP sintetase. Finalmente, a gencitabina é incorporada não apenas no DNA, mas também em RNA.

### 2.1.3.3 Nucleosídeos Fluoropirimidina

Os nucleosídeos orais da fluoropirimidina, como a capecitabina (**22**) atingem concentrações mais elevadas de fluorouracil (**15**) em tumores do que em tecidos normais, por isso são mais eficazes e menos tóxicos. Após a administração oral, **22** (Figura 8) passa intacta através da mucosa intestinal e é rapidamente e extensivamente metabolizado em 5'-desoxi-5-fluorocitidina e 5'-desoxi-5-fluorouridina. O Fluorouracil é gerado secundariamente pela timidina fosforilase, esta enzima é altamente expressa em células tumorais, quando comparada em células normais (Vorbruggen, 2001).



**Figura 8:** Estrutura da capecitabina um análogo da fluoropirimidina

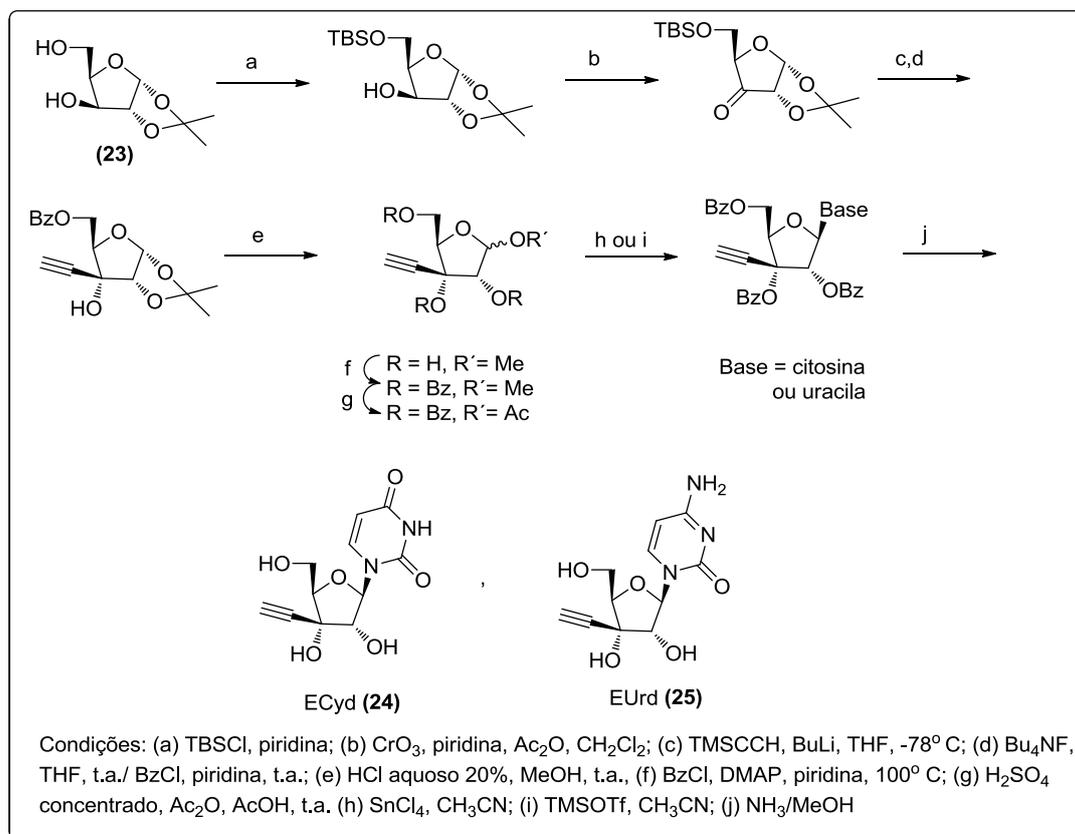
O fluorouracil é primariamente catalisada pela dihidropirimidina desidrogenase para o metabólito inativo 5-fluorodihidrouracil. A inibição da dihidropirimidina desidrogenase pode afetar tanto a toxicidade no tecido normal quanto a eficácia antitumoral de fluorouracil. Vários estudos têm demonstrado que a expressão da dihidropirimidina desidrogenase em linhagens de células tumorais e xenotransplantes humanos está relacionado à resistência aos nucleosídeos fluorouracil e fluoropirimidina. Em pacientes que obtiveram respostas completas à terapia fluorouracil, a atividade da dihidropirimidina desidrogenase no tumor tende a ser menor do que em pacientes que não respondem ou aqueles que têm apenas uma resposta parcial (Galmarini, 2002).

O recente desenvolvimento de vários inibidores de dihidropirimidina desidrogenase possibilita o aumento da atividade citotóxica das

fluoropirimidinas nas células tumorais, que contêm altas concentrações desta enzima, enquanto melhora a farmacocinética nas terapias com fluorouracil. Os estudos pré-clínicos e clínicos com alguns destes compostos têm demonstrado que o catabolismo inibitório da pirimidina em tecidos normais e neoplásicos permite que a dose de fluorouracil possa ser diminuída significativamente mantendo a eficácia clínica (Baker, 1996)

#### 2.1.4 Síntese de análogos nucleosídeos com atividade antitumoral

Agentes quimioterápicos, baseados em análogos de nucleosídeos, continuam a dar uma importante contribuição para o tratamento do câncer. Nos últimos anos, diversos análogos com potencial antitumoral foram relatados na literatura. Exemplo disso foi a síntese proposta a partir do 1,2-*O*-isopropilideno-*D*-xilofuranose (**23**), para a obtenção do 1-(3-*C*-etiril- $\beta$ -*D*-ribo-pentofuranosil) citosina (ECyd, **24**). Como a maioria dos compostos foram obtidos como cristais, o composto **24** foi preparado sem qualquer purificação cromatográfica, com 31% de rendimento, a partir do composto **23** (Esquema 6). A reação chave para obtenção desses produtos passa por uma glicosilação de Vorbrüggen. Usando um procedimento semelhante sem purificação cromatográfica, o análogo uracil, o EUrd [1-(3-*C*-etiril- $\beta$ -*D*-ribo-pentofuranosila) uracila (**25**), que também tem um potente efeito antitumoral, foi sintetizado a partir de **23** com 39% rendimento global (Nomura et. al., 2002)..

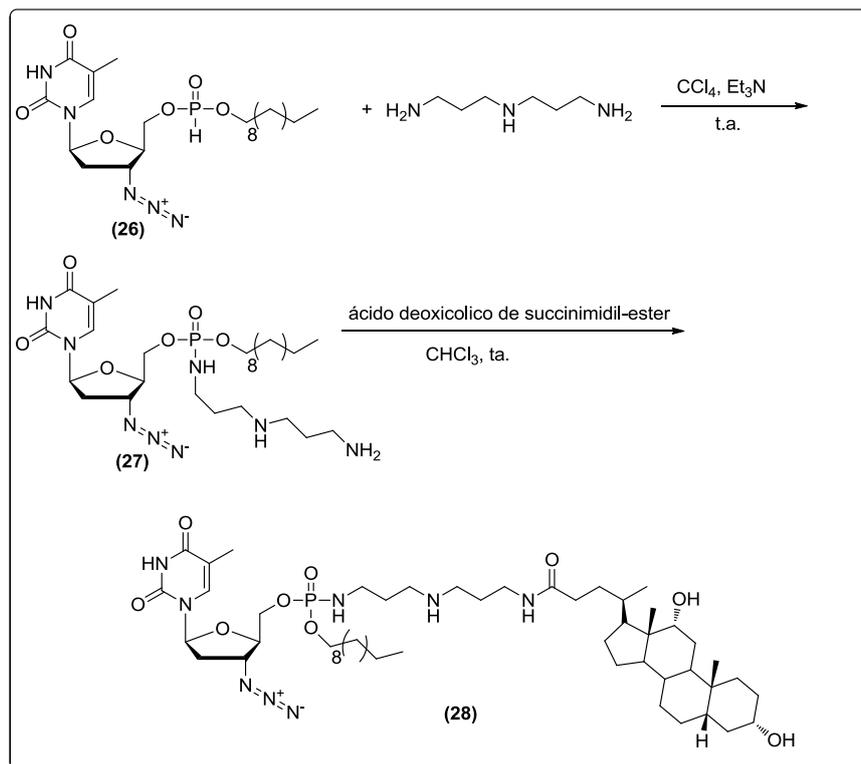


**Esquema 6:** Rota sintética proposta para obtenção dos compostos ECyd e EUrd

No mesmo ano, o composto **24** teve sua atividade avaliada frente a modelos de ratos, linhagens células tumorais FM3A e células humanas de fibrosarcoma HT1080 (Naito et. al., 2002). Os testes verificaram que o composto **24** era realmente um potente inibidor da síntese do RNA. O **24** induziu características de apoptose nestas células, além de mudanças morfológicas, fragmentação do DNA e ativação da protease *caspase-3-like*.

Em 2007, Wu et. al., sintetizaram uma série de ácidos biliares poliamina conjugados com AZT (**28**), como potenciais pró-fármacos antitumorais na forma de fosforamidatos, com bons rendimentos, sendo que suas atividades antitumorais foram testadas *in vitro* contra duas linhagens celulares de câncer: células de câncer de colo de útero HeLa e de câncer renal 7860. A atividade antitumoral melhorou provavelmente devido a melhora na biodisponibilidade do AZT, ligados aos ácidos biliares poliamina conjugadas. As moléculas-alvo

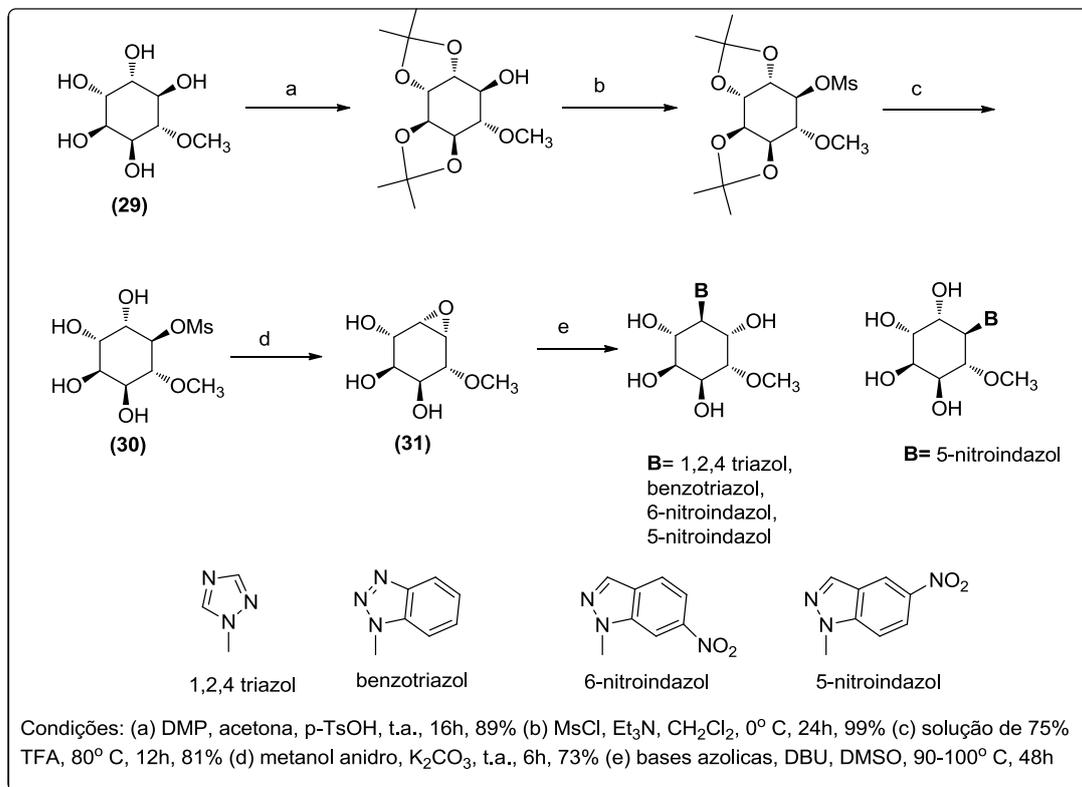
foram sintetizadas de acordo com o procedimento geral abaixo, como mostrado no Esquema 7. Os H-fosfatos de AZT (**26**) reagiram com poliaminas pela reação de Atherton-Todd para fornecer fosforamidatos de poliamina (**27**). Com os ácidos biliares ativados, os fosforamidatos foram convertidos facilmente nas moléculas-alvos, com rendimentos aproximadamente de 70%.



**Esquema 7:** Rota sintética para obtenção de conjugados do ácido biliar

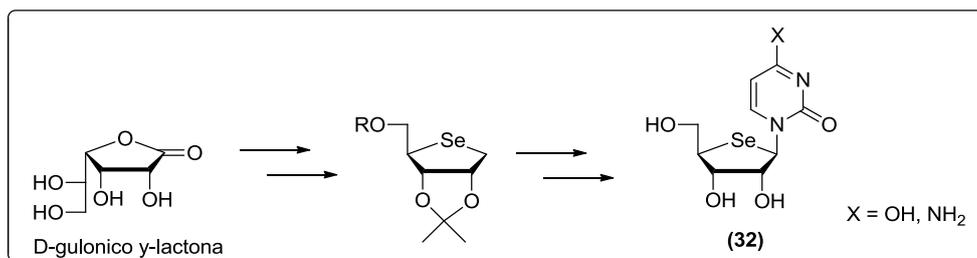
Análogos de nucleosídeos azólicos da D-pinitol (= 3-O-metil-D-*chiro*-inositol, **29**), foram relatados em uma síntese conveniente por Zhan et. al. (2007). O intermediário chave 3-O-metil-4,5-epoxi-D-*chiro*-inositol (**31**) foi obtido com excelentes rendimentos via epoxidação de mono-metanosulfonato de D-pinitol (**30**). O processo de abertura do epóxido por bases nitrogenadas mostrou-se bastante eficiente, levando a formação dos produtos desejados. Todos os nucleosídeos carbocíclicos azólicos sintetizados foram testados *in vitro* contra cancer de pulmão e de bexiga. Apenas os análogos de nucleosídeos triazólicos e benzotriazólicos inibiram o crescimento de linhagem celular de câncer de pulmão em humanos, nas concentrações de 11,3 e 22,6

$\mu\text{M}$ , respectivamente, os análogos mostraram atividade inibitória muito menor contra a linhagem celular de câncer de bexiga em humanos (T24).

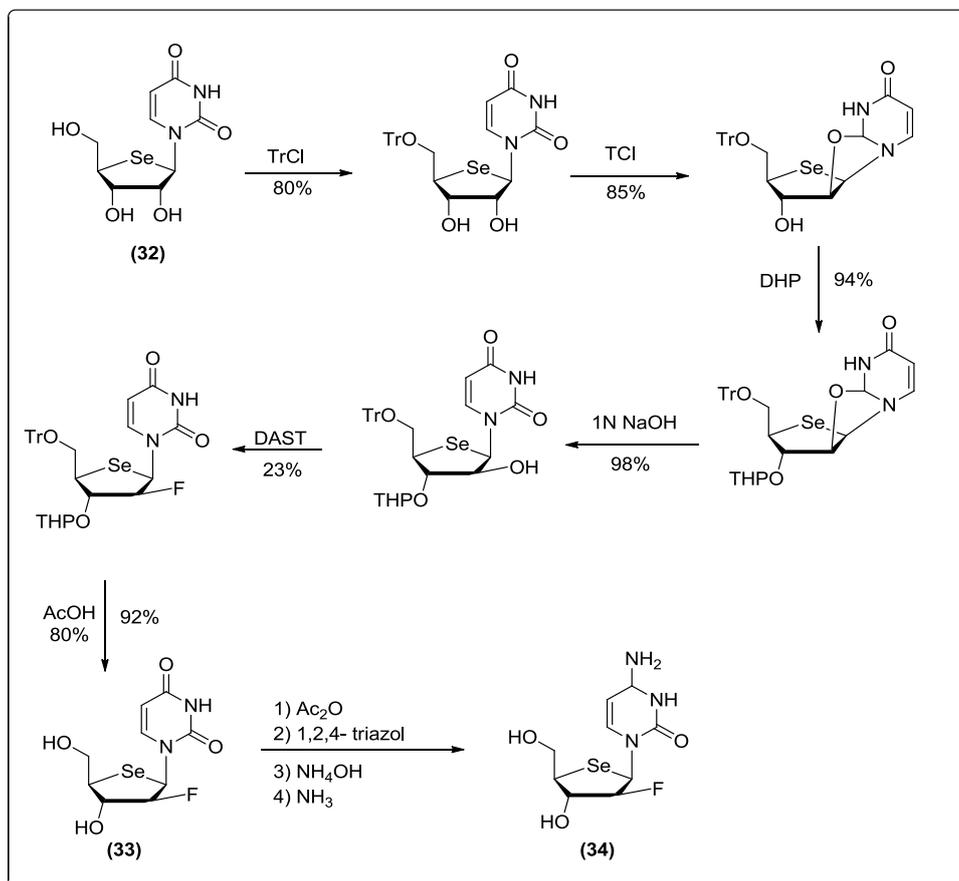


**Esquema 8:** Síntese de nucleosídeos análogos azólicos da D-pinitol

A primeira síntese de 4'-selenonucleosídeos (**32**) foi realizada através de uma condensação do tipo Pummerer, como passo fundamental (Esquema 9). Um dos principais efeitos observados foram os efeitos estereoeletrônicos, principalmente quando comparados aos 4'-oxonucleosídeos. Possivelmente esses efeitos ocorrem devido ao tamanho do átomo de selênio e das interações estéricas (Jeong et. al., 2008).



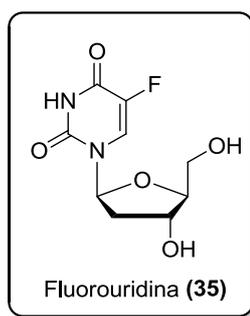
No ano seguinte, empregando o composto **32** anteriormente preparado, realizou-se a primeira síntese de 2'-desoxi-2'-fluoro-4'-selenoarabinofuranosil pirimidinas (**33**, **34**) como potentes agentes anticâncer, utilizando como passo fundamental a DAST fluoração (Jeong et. al. 2009). Sendo esta síntese a primeira que utilizou o átomo selênio na fluoração de DAST de 4'-selenonucleosídeos, o efeito conformacional induzido deve-se ao fato da presença do selênio, que agiu como fator decisivo na fluoração de DAST (Esquema 10). Entre os compostos testados, o 2'-F-4'-seleno-ara-C (**34**) apresentou potente atividade anticancerígena em todas as linhagens de células de câncer testadas e foi mais potente que o ara-C.



**Esquema 10:** Rota sintética do 2'-fluor-4'-selenoarabino-furanosil-nucleosídeo

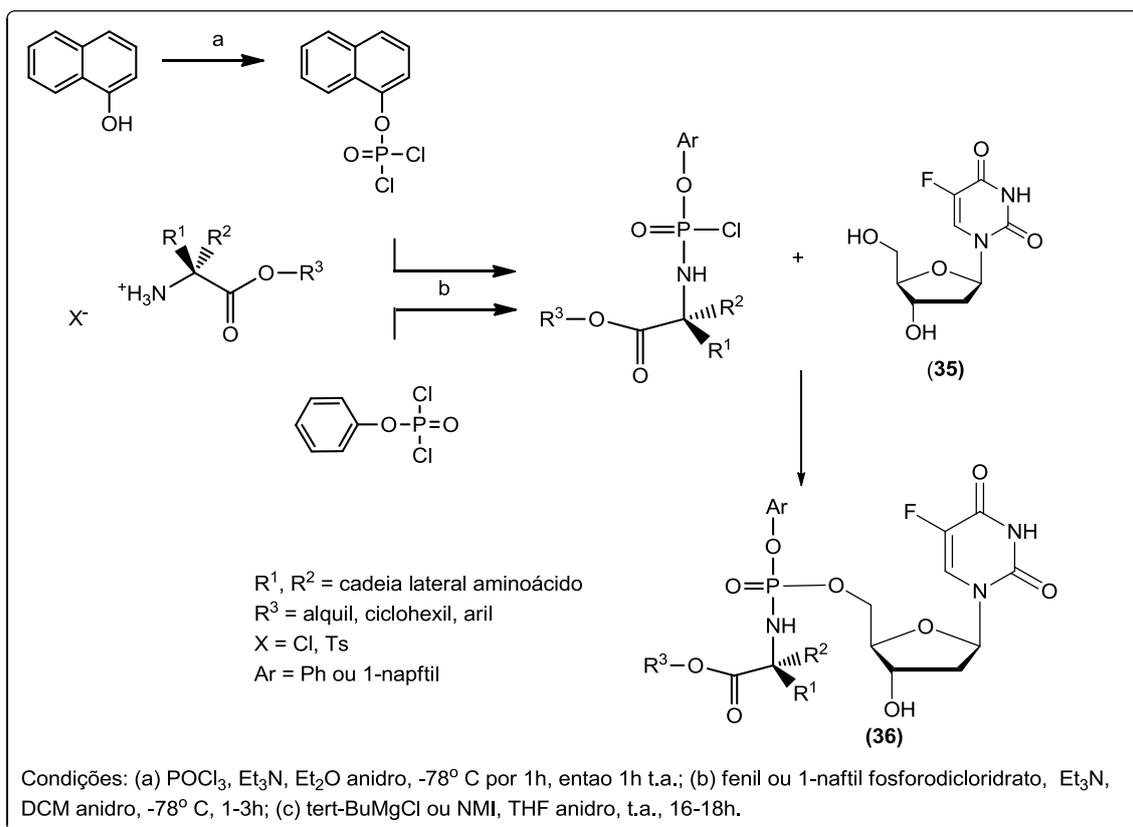
Outra importante família de nucleosídeos com atividade no tratamento de tumores sólidos são os derivados de pirimidinas fluoradas (Figura 9), que

até hoje continuam como os grandes representantes dos atuais agentes quimioterápicos. A primeira droga foi introduzida em 1957, por Heidelberger, permanecendo como uma das principais bases no tratamento de tumores de ovário, mama e gastrointestinal. Diversos agentes derivados foram sintetizados baseados na ideia inicial proposta por Heidelberger, exemplo disso são 2'-desoxinucleótidos, ou Fluorouridina (FUDR, **35**).



**Figura 9:** Derivado da pirimidina fluorada

Recentemente, foi relatada a síntese de um pró-fármaco de fosfato, os chamados ProTides, que mostrou ser um derivado promissor do **35**. Parte disso, deve-se ao fato de que estes parcialmente ignoraram a dependência, como das drogas atuais, de transporte ativo e ativação mediada das nucleosídeos quinase, além de apresentarem resistência à desativação metabólica por enzimas fosforolíticas (McGuigan et. al., 2011). Os ProTides da FUDR pirimidina fluorados (**36**), possuem variação em determinadas posições como no grupamento arila, na função éster, no aminoácido e outras regiões (Esquema 11). No entanto, apenas determinados ProTide são realmente capazes de realizar a entrega do monofosfato de nucleosídeo em células intactas. Os ProTides também mantiveram a atividade em culturas de células tumorais (Murine leukemia L1210/0, human T-lymphocyte CEM/0, e human cervix carcinoma HeLa/0 ) infectadas por micoplasma, ao contrário do **35**.



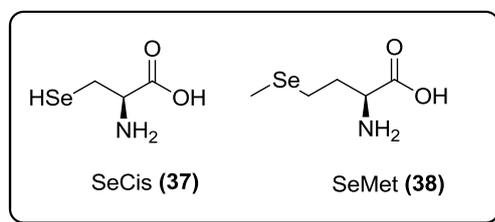
**Esquema 11: Síntese de ProTides da FUDR**

## 2.2 Calcogênios

Os calcogênios oxigênio, enxofre e selênio cumprem uma ampla gama de funções biológicas essenciais. Todos os três elementos são constituintes funcionais de biomoléculas que participam de reações redox *in vivo*. O elemento selênio está localizado abaixo do enxofre na tabela periódica, e, assim, embora apresentem algumas semelhanças, existem diferenças marcantes entre esses dois elementos em relação a propriedades químicas e bioquímicas. A abundância de selênio na crosta terrestre é de cerca de quatro ordens de magnitude menor do que a de enxofre. Em termos biológicos, enquanto o enxofre é encontrado no corpo humano em quantidades semelhantes aos de potássio (140 g no adulto), o selênio é um oligoelemento presente em quantidades da ordem de miligramas, principalmente como

selenocisteína, selenometionina e, a um teor muito mais baixo, de seus precursores metabólicos (por exemplo, GS-Se-SG, GSSeH, selenofosfato).

A importância biológica fundamental dos calcogênios nos sistemas redox torna-se ainda mais importante quando se trata da atividade redox em proteínas. A maioria das proteínas dependem de cofatores orgânicos ou inorgânicos (íons metálicos, por exemplo, NAD<sup>+</sup>, FAD) para a atividade redox. Em contraste, os aminoácidos contendo calcogênios como cisteína e metionina (Met e Cis, ambos contêm enxofre em sua estrutura), a selenocisteína **(37)**, e selenometionina **(38)** (SeCis e SeMet, contêm selênio estruturalmente), constituem proteínas com uma química redox poderosa, com base nas cadeias laterais dos aminoácidos, como pode ser verificado na Figura 10. Além disso, enquanto a maioria dos cofatores redox metálicos ativo ocorrem apenas em dois ou três estados de oxidação *in vivo*, o enxofre na cisteína foi encontrada em diversos estados ( de +6 a -2, incluindo estados de oxidação fracionário) (Jacob et. al., 2003).

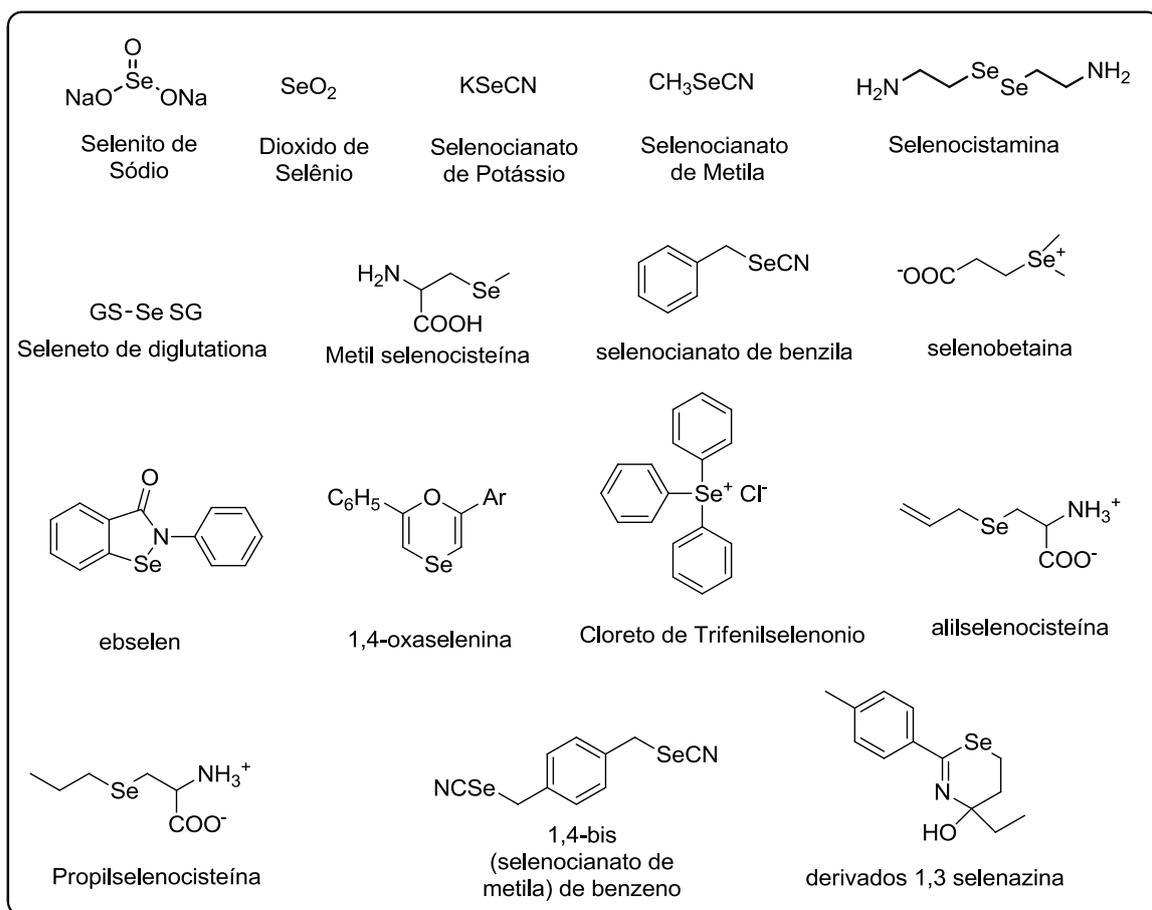


**Figura 10:** Aminoácidos que contêm selênio estruturalmente.

### 2.2.1 Ocorrência natural de selênio nas proteínas

O selênio é um componente chave de um grande número de selenoproteínas funcionais. As mais conhecidas destas são as enzimas antioxidantes glutathiona peroxidases (GPx), que removem o peróxido de hidrogênio e os hidroperóxidos prejudiciais lipídicos gerados *in vivo* por espécies derivadas de oxigênio. O selênio também desempenha um papel no controle do metabolismo hormonal da tireóide e na proteção contra o mercúrio

orgânico e inorgânico e alguns outros metais pesados e toxinas. As doenças provenientes da deficiência de selênio, como cardiomiopatia e artrite deformante, têm sido descritas em áreas com índices extremamente baixos de selênio no solo (Lorgeril et. al., 2006). Nos últimos anos, vários estudos têm mostrado que as deficiências de selênio também aumentam a suscetibilidade, sobre a incidência de câncer, incluindo câncer de mama, pulmão, estômago, bexiga, ovários, pâncreas, tireóide, esôfago, cabeça e pescoço, cerebelo e melanoma, no entanto, alguns estudos ainda não encontraram nenhuma associação entre o selênio e câncer (Sinha et. al., 2004). Nesse contexto, nos últimos anos diversos compostos organoselênio foram testados biologicamente, sendo eles muitas vezes de origem natural ou sintética (Figura 11).



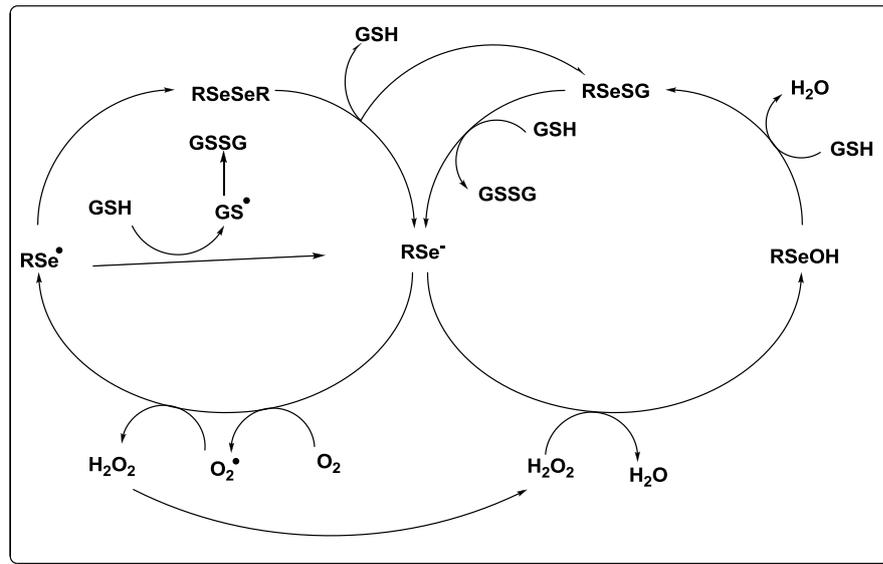
**Figura 11:** Estruturas de compostos de selênio orgânicos e inorgânicos

As proteínas contendo selênio nos mamíferos podem ser divididos em três grupos: 1) selenoproteínas específicas contendo selenocisteína, 2) proteínas inespecificamente que contêm incorporados selênio, e 3) proteínas de ligação específicas selênio. Selenoproteínas com funções conhecidas identificadas até o momento incluem glutathionas peroxidases, desidases, tioredoxinas redutases e selenofosfato sintetase-2. No entanto, o estado atual do conhecimento sobre as selenoproteínas foi recentemente revisto, principalmente sobre seus mecanismos. A incorporação de selenocisteína nestas proteínas exige uma máquina de transdução elaborada. Em contraste, a selenometionina aleatoriamente é incorporada em proteínas no lugar da metionina (Jacob et. al., 2003).

#### 2.2.2 Selenocisteína e Selenometionina: Estados de Oxidação e Catálise Redox

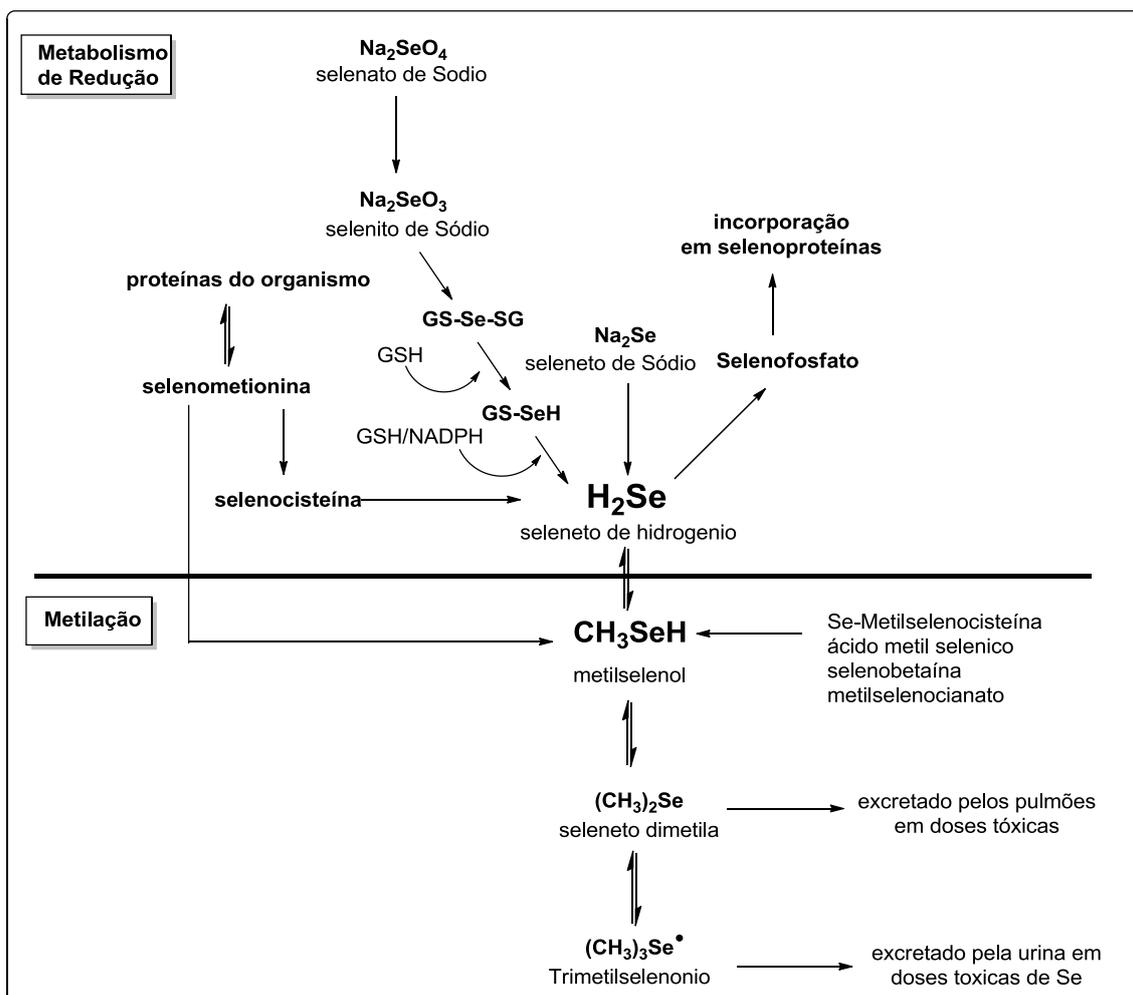
A principal diferença entre resíduos selenocisteína e cisteína é o valor de pKa significativamente menor do grupo selenol na selenocisteína ( $pK_a = 5,2$ ) em relação ao do grupo tiol da cisteína ( $pK_a = 8,3$ ). Como consequência, selenóis em proteínas contendo selenocisteína estão normalmente presentes como selenolatos em pH fisiológico, enquanto os tióis nas proteínas contendo cisteína estão normalmente presentes como tióis indissociável (Cadenas et. al, 2002).

Os estados de dissociação foram encontrados quando a cisteína substitui a selenocisteína no sítio ativo GPx mutante do fosfolípido hidroperóxido GPx. O ciclo redox da GPx exemplifica o mecanismo redox destas peroxidases: Selenocisteína é oxidada pelo átomo de transferência de oxigênio e reduz o ácido selênico através de uma troca reacional envolvendo dois equivalentes de GSH (Esquema 12).



**Esquema 12:** Ciclo Redox de Selenetos (RSe-) adaptado de Spallhoz et al (2004), originalmente publicado por Chaudiere et al (1992)

A ocorrência de selenol, sulfeto de selênio e ácido selênico em selenoproteínas não significa, no entanto, que outros estados de oxidação do selênio estão ausentes *in vivo*. O potencial redox selenocisteína/selenocistina de -488 mV indica que a formação de disseleneto é possível sob condições fisiológicas de redox. No entanto, poucas proteínas tem dois resíduos de selenocisteína próximos o bastante para facilitar a formação de disseleneto (talvez com a exceção da selenoproteína P, que contém até 10 resíduos de selenocisteína). Uma gama adicional de estados de oxidação do selênio, como pode ser verificado no esquema 13, ocorre durante o metabolismo de selênio: selenito ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ) é reduzido gradualmente por GSH para formar  $\text{H}_2\text{Se}$  e, finalmente, selenofosfato. Este processo envolve espécies de selênio em vários estados de oxidação que variam +4 a -2. As vias de excreção da excesso  $\text{H}_2\text{Se}$  também envolve uma espécie de selenônio trivalente na forma de trimetilselenônio, que é excretado na urina (Jacob et. al., 2003).



**Esquema 13:** Representação da via metabólica do Se (adaptado por Meuillet et al., 2004 e Lu et al., 1995)

### 2.2.3 Suplementação de selênio como agente quimiopreventivo

O selênio é um nutriente essencial com potencial anticarcinogênico, particularmente quando suplementado. As principais formas de suplementos encontradas são selenometionina e selenocisteína. Em pequenas doses, o selênio funciona como um componente essencial da selenocisteína em várias selenoproteínas específicas e promove proliferação celular, importante para a resposta imune. Em altas doses, mas ainda não tóxicas, o selênio pode reduzir o risco de câncer, impedindo o ciclo celular tumoral, estimulando a apoptose e inibindo a migração e invasão celular tumoral (Zeng et. al., 2008).

Níveis significativamente baixos de selênio tem sido relacionados a pacientes com câncer, quando comparados ao grupo controle. A baixa concentração de selênio sérico também pode ser correlacionada com maior risco de câncer. Além disso, foi encontrada uma redução da atividade da GPx em carcinoma hepatocelular, quando comparado ao tecido normal adjacente. Esta diminuição pode causar a intensificação da peroxidação lipídica e aumento de produtos finais da peroxidação como o malondialdeído (MDA). Concomitantemente, níveis aumentados de MDA em tecidos carcinogênicos também foram encontrados. Alguns pesquisadores recomendam o Se como uma profilaxia nutricional contra o câncer nas doses de 50 a 100 µg Se/dia. O Se tem sido também recomendado como coadjuvante para a quimioterapia no tratamento de câncer em altas doses de 200 µg Se/dia (Almondes et. al., 2010).

#### 2.2.4 Selenoproteínas e a prevenção contra o câncer

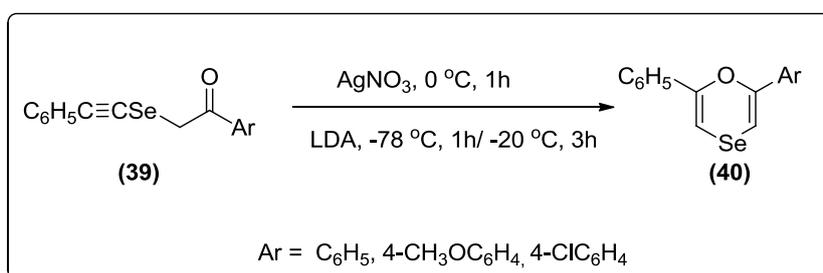
Como o dano genotóxico causado pela acumulação de modificações oxidativas nas bases do DNA e a quebra da vertente única ou dupla hélice do DNA são características marcantes no desenvolvimento de muitas formas de câncer, o selênio tem sido sugerido para exercer suas funções anticarcinogênicas por meio de selenoenzimas de detoxificação das EROs (Steinbrenner, 2009).

A supressão da carcinogênese por compostos de selênio nas fases de pós-iniciação do tratamento cancerígeno em modelos animais, sugere a existência de mecanismos adicionais de quimioprevenção do câncer. A capacidade dos compostos de Se para inibir o crescimento celular e para induzir a apoptose de células tumorais é sugerido como um mecanismo potencial para quimioprevenção do câncer. Inclusive, especula-se que a apoptose induzida por selênio pode remover células transformadas durante a carcinogênese e suprimir a expansão clonal desse tipo celular. Muitas experiências demonstram que o efeito quimiopreventivo de Se é devido, em

parte, ao seu efeito inibitório sobre o crescimento celular, DNA, RNA e síntese de proteínas em células transformadas. Embora os mecanismos moleculares da atividade quimiopreventiva dos compostos de selênio permaneçam desconhecidos, mudanças relacionadas ao estresse em proteínas celulares tem sido implicadas na explicação dos efeitos protetores do selênio. As proteínas quinases desempenham um papel central na regulação do crescimento celular, promoção tumoral e diferenciação, além disso, vários trabalhos descrevem o efeito inibitório do selênio sobre a atividade de certas e proteínas quinases (Letavayov'á et. al., 2006).

### 2.2.5 Síntese de compostos organoselênio com potencial biológico

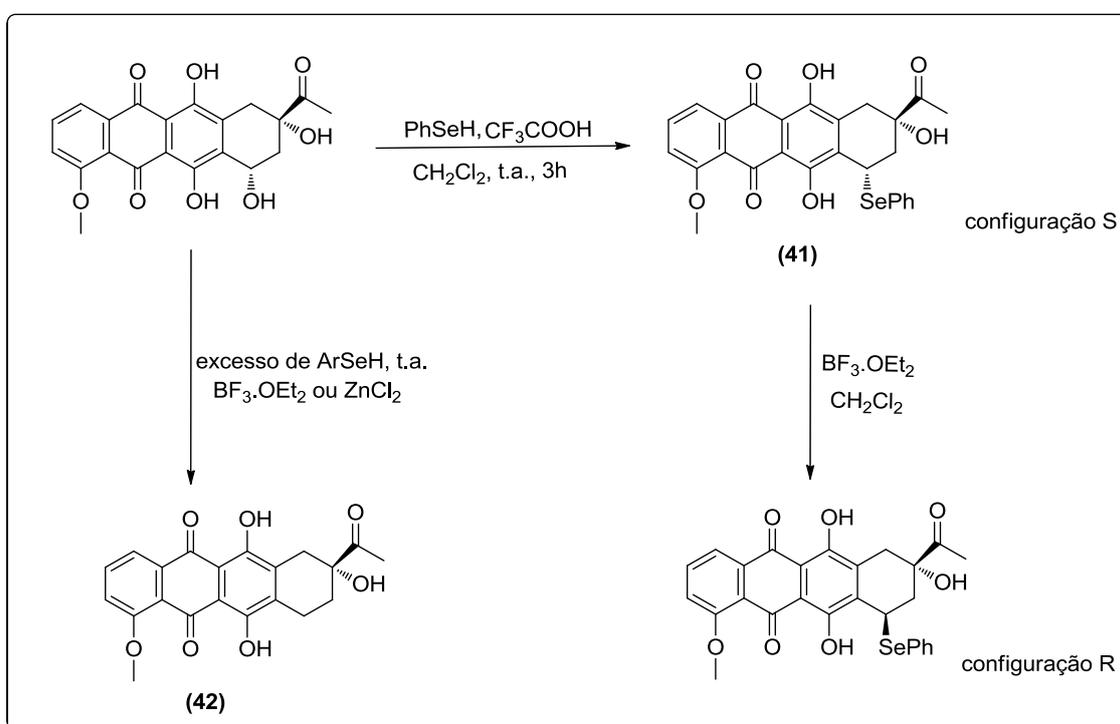
As oxaseleninas são uma classe de compostos organoselênios, que não têm sido amplamente investigados *in vivo*. Os oxaseleninas (15 a 60  $\mu\text{M}$ ) mostraram ser capazes de induzir a apoptose em células SKOV-3 de câncer de ovário, de uma maneira dose-dependente. Para tanto, em 2001, Koketsu et. al., sintetizaram 1,4-Oxaseleninas (**40**) a partir de 3-selena-4-pentin-1-onas (**39**) usando  $\text{AgNO}_3$  e LDA. Neste trabalho os autores observaram que uma das oxaseleninas obtidas, 2-(4-clorofenil)-6-fenil-1,4-oxaselenina, mostrou um efeito inibitório contra a proliferação de células de câncer humano e indução de efeitos na fase inicial da apoptose.



**Esquema 14:** Preparação das oxaseleninas

A daunorubicina e a doxorubicina são antraciclina usadas como agentes antitumorais. Contudo, seu uso clínico é restrito devido aos indesejáveis efeitos adversos, especialmente a cardiotoxicidade. A síntese de

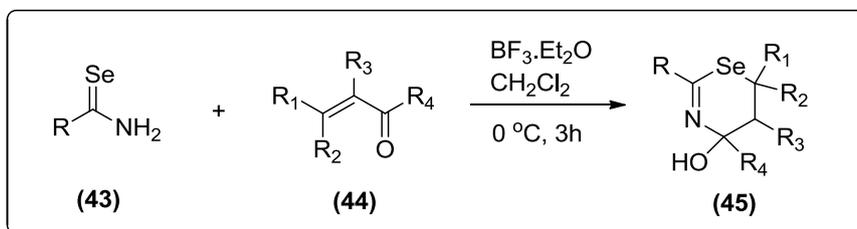
dos derivados do 7-fenilseleno-7-deoxidaunomicinona (**41**), foi proposta conforme o Esquema 15 (Zhang et. al., 2002). Além da síntese os autores avaliaram a atividade antitumoral destes derivados frente a células de câncer de estômago humano SGC-7901 e de leucemia humana HL60. Nos ensaios citotóxicos realizados, os derivados selenodaunomicinonas apresentaram atividade inibitória muito melhor do que os derivados tiodaunomicinona. Outro produto obtido durante a síntese foi a deoxidaunomicinona (**42**), derivado este que é obtido a partir do excesso de selenofenol, no meio reacional.



**Esquema 15:** Rota sintética dos 7-fenilseleno-7-deoxidaunomicinona

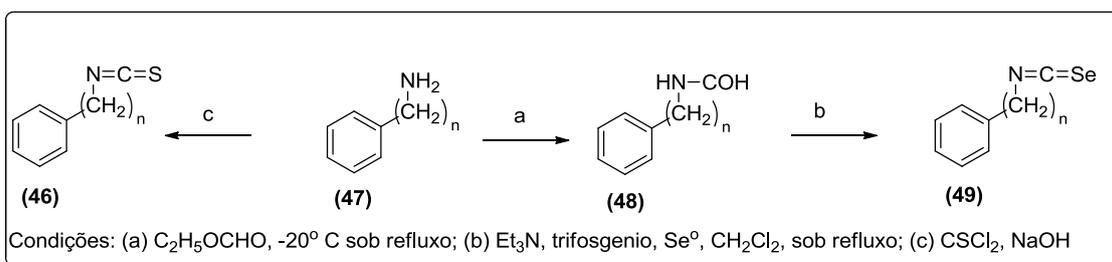
Os derivados 1,3-selenazinas surgiram nos anos 90, como uma nova classe de compostos organoselênio com atividade biológica. Estes compostos induziram apoptose em células de fibrossarcoma HT-1080 e em células de câncer TMK-1 gástrica humana, nas concentrações de 5 a 20  $\mu\text{M}$ , inibindo especificamente a quinase do fator 2 de Elongação (EF-2K). Em 1998, Koketsu et. al., observaram que ao reagir primariamente selenoamidas com uma cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada na presença de  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  obtinha-se 5,6-dihidro-4H-1,3-selenazinas (**45**), com altos rendimentos (Esquema 16). A estrutura **45** foi

confirmada demonstrando a regioseletividade na adição nucleofílica do átomo de selênio da selenoamida **(43)** na posição  $\beta$  do sistema carbonílico insaturado **44**.



**Esquema 16:** Síntese de 1,3 selenazinas.

O Esquema 17 abaixo propõe uma rota sintética a fim de obter fenilalquil isoselenocianatos **(49)**, comparando a atividade antitumoral dos compostos sintetizados com isotiocianatos **(46)**, que já possuem a atividade antitumoral comprovada. A estratégia sintética envolve a formilação de fenilalquilaminas **(47)**, seguido pelo tratamento com trifosfênio, na presença de selênio elementar ao intermediário **48** a fim de fornecer o desejado fenilalquil isoselenocianato em bons rendimentos (Sharma et. al., 2008).

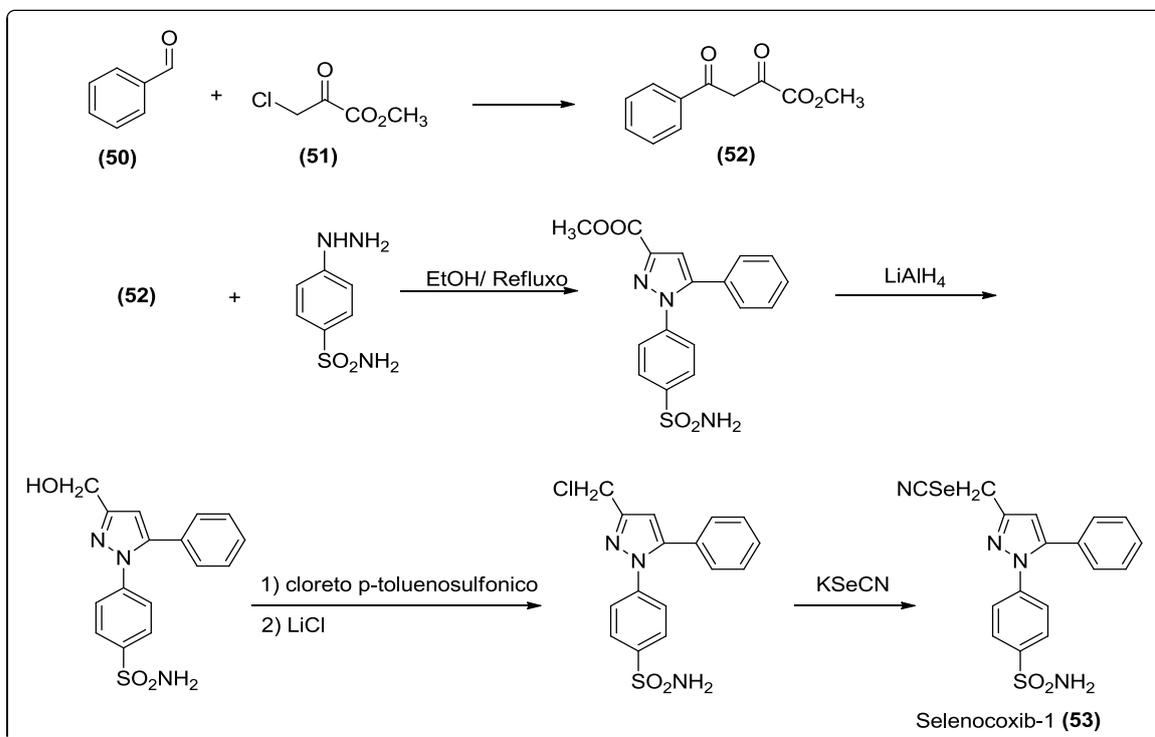


**Esquema 17:** Rota sintética para obtenção de fenilalquil isoselenocianatos e isotiocianatos

Com relação à atividade antitumoral dos compostos, os isoselenocianatos **(49)** foram mais eficientes na inibição do crescimento de linhagens celulares de melanomas, glioblastoma, fibrosarcoma, câncer de mama, colo e próstata quando comparado aos correspondentes análogos isotiocianatos **(46)**. Além disso, em geral, a eficácia melhora com o aumento do

comprimento da cadeia alquílica nos casos de compostos isotiocianatos e isoselenocianatos.

A proposta verificada no esquema 18, refere-se a uma nova estratégia, a fim de combinar as propriedades de duas classes bem conhecidas de compostos (selênio e inibidor da COX-2). A rota sintética parte de uma reação entre o benzaldeído (**50**) e o metil 1-cloro-2-oxopropionato (**51**) para obter o metil 2,4-dioxo-4-fenilbutanoato (**52**). Depois disso, a reação passa por mais 4 passos reacionais até obter o Selenocoxib-1 (**53**). A síntese levou em conta a importância da sulfonamida e do anel pirazol sobre a atividade pro-apoptótica da Celecoxib, além disso, a nova classe de compostos organoselênio sintetizado foi um derivado modificado do Celecoxib na posição 3 do anel pirazol. A nova série de compostos, Selenocoxib-1, foi testada frente a linhagens de células de câncer de próstata e apresentando uma maior inibição do crescimento invasivo em uma dose menor do que o composto original (Desai et. al., 2010).



**Esquema 18:** Síntese de Selenocoxib-1

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

O objetivo deste estudo foi realizar a síntese de uma nova série de nucleosídeos análogos do AZT, contendo átomos de selênio na posição 5' da pentose. Adicionalmente, propôs-se a avaliação da atividade antioxidante da série de compostos derivados de selênio, a fim, de selecionar os produtos mais promissores para a avaliação do potencial antitumoral.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Sintetizar uma nova série de nucleosídeos, incorporando a sua estrutura moléculas de selênio, tendo como material de partida o AZT, um nucleosídeo derivado da timidina.
- Investigar a atividade toxicológica da série 5'-seleno azidotimidina através de indicadores de estresse oxidativo, como a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a atividade peroxidase dependente de tiol.
- Realizar um estudo visando avaliar o potencial antitumoral dos compostos selecionados através da determinação da citotoxicidade, morfologia celular, apoptose, expressão gênica, frente a linhagens celulares de câncer de bexiga (5637).

#### **4. PATENTE**

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de patente, os quais se encontram aqui organizados. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios. A patente está disposta na forma em de sua última versão.

#### 4.1 Patente

### **“SÍNTESE DE CALCOGENETOS DERIVADOS DO AZT PARA APLICAÇÃO BIOLÓGICA E QUÍMICA.”**

Oscar Endrigo Dorneles Rodrigues, Diego de Souza, Fabiana Seixas, Tiago  
Collares, João Batista Teixeira Rocha

# DOCUMENTO CONFIDENCIAL

## CIRCULAÇÃO RESTRITA

ESTE DOCUMENTO É DESTINADO AO USO EXCLUSIVO DO INDIVÍDUO OU ENTIDADE À QUAL O MESMO É ENDEREÇADO E CONTÉM INFORMAÇÕES PRIVILEGIADAS, CONFIDENCIAIS E QUE NÃO DEVEM SER REVELADAS.

Se você ler este documento e não for o destinatário pretendido, estará por meio deste notificado de que qualquer disseminação, distribuição ou reprodução deste documento é estritamente proibida. Se você recebeu este documento por engano, por favor notifique-me imediatamente através dos telefones +55(21)3212-8200 ou +55(11)3087-8200.

Obrigado por sua cooperação.

THIS DOCUMENT IS INTENDED ONLY FOR THE USE OF THE INDIVIDUAL OR ENTITY TO WHICH IT IS ADDRESSED AND CONTAINS INFORMATION THAT IS PRIVILEGED, CONFIDENTIAL AND EXEMPT FROM DISCLOSURE.

If the reader of this document is not the intended recipient, you are hereby notified that any dissemination, distribution or copying of this communication is strictly prohibited. If you have received this document in error, please notify me immediately by telephone on +55(21)3212-8200 or +55(11)3087-8200.

Thank you for your co-operation.

## **Relatório Descritivo de Patente de Invenção**

### **CALCOGENO-NUCLEOSÍDEOS, USO DE CALCOGENO-NUCLEOSÍDEOS COM AÇÃO ANTIOXIDANTE/ANTITUMORAL, COMPOSIÇÃO E PROCESSO DE SÍNTESE DE CALCOGENO-NUCLEOSÍDEOS.**

#### **Campo da Invenção**

A presente invenção faz referência aos derivados calcogeno-nucleosídeos do AZT (5'- arilcalcogeno azidotimidina), uma série de compostos organocalcogênicos com perfil antioxidante e antitumoral. A presente invenção faz referência, ainda, ao processo de síntese dos destes compostos. A presente invenção se situa no campo da medicina, química e biologia.

#### **Antecedentes da Invenção**

Os nucleosídeos são heterociclos essenciais para a construção dos blocos moleculares da vida, como DNA e RNA. Estruturalmente os nucleosídeos são glicosilaminas consistindo de uma base azotada (muitas vezes referida como simplesmente base) ligadas a um açúcar (ribose ou desoxirribose) através de uma ligação- $\beta$ -N<sub>1</sub> glicosídica. No organismo, estes podem ser fosforilados no interior da célula por quinases específicas no álcool primário do açúcar (-CH<sub>2</sub>-OH), produzindo nucleotídeos, e dessa forma serem incorporados ao DNA e RNA. Alguns exemplos de nucleosídeos incluem a citidina, uridina, adenosina, timidina, guanosina e inosina.

Devido a sua importancia biológica, o uso de análogos nucleosídicos tem ganhado papel de destaque no tratamento de diversas enfermidades,

principalmente devido a importância dos nucleosídeos endógenos no organismo. Além disso, são uma classe estabelecida clinicamente útil de agentes medicinais que possuem uma ampla gama de atividades antivirais e anticancerígenas.

A busca e o desenvolvimento de espécies mais eficazes, seletivas e não tóxicas como agentes antivirais e antitumorais tem sido objeto de intensa pesquisa. Conseqüentemente, extensas modificações tem sido realizadas nos nucleosídeos tanto na base quanto na molécula do açúcar. Exemplo disso, são a decitabina, clofarabina, e 5-azacitidina que foram recentemente aprovadas para o tratamento de síndromes mielodisplásicas e leucêmicas.

Um dos nucleosídeos mais conhecidos o AZT (3'-azido-2',3'-dideoximidina), também conhecido por azidotimidina, zidovudina ou retrovir, foi sintetizado pela primeira vez em 1964 por Horwitz, , inicialmente foi apresentado como uma droga anticancerígena. No entanto, seus estudos iniciais foram deixados de lado, por possuir baixo poder antitumoral. O projeto envolvendo o AZT foi retomado no início da década de 70, quando sua atividade antiviral foi descrita pela primeira vez, sendo em 1985 o primeiro composto a apresentar atividade anti-HIV. Em 1986, o AZT foi aprovado pelo órgão norte-americano de controle sobre produtos farmacêutico FDA ("Food and Drug Administration"), sendo comercializado pelos laboratórios Burroughs-Wellcome em 1987. Após a descoberta como inibidor competitivo da Transcriptase Reversa (TR), uma das enzimas críticas do ciclo da replicação viral, passou a ser o fármaco de primeira escolha para combate ao vírus HIV.

Apesar do baixo poder antitumoral do AZT, a importância dos nucleosídeos na terapia antitumoral tem aumentado nos últimos anos, devido principalmente a introdução de novas drogas nucleosídicas no mercado farmacêutica. A eficácia clínica de drogas antitumorais nucleosídicas depende de uma complexa interação dos transportadores de mediação da entrada dos medicamentos nucleosídicos nas células, mecanismos de efluxo que removem

as drogas dos compartimentos intracelular e metabolismo celular dos metabólitos ativos

No entanto, a eficácia do tratamento quimioterápico pode resultar na deterioração física dos pacientes com câncer, principalmente por serem altamente prejudiciais, inclusive para células saudáveis, além de desencadearem diversos efeitos adversos. Dentre os fármacos mais conhecidos podemos citar: Doxorubicina, 5-Fluoruracil, Ciclofosfamida, Fludarabina, Clorambucil, Vincristina, Bussulfano, entre outros. Apesar de eficientes todos esses fármacos apresentam apenas poder prooxidante, sendo prejudiciais tanto para células “doentes” como em células saudáveis. Dessa forma, as pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos, hoje relacionam dois fatores: a supressão da carcinogênese e o baixo poder prejudicial sobre células saudáveis.

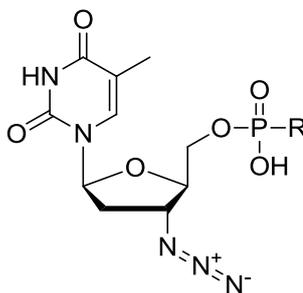
Como o desenvolvimento de muitas formas de câncer podem surgir do dano genotóxico causado pela acumulação de modificações oxidativas nas bases do DNA e a quebra da vertente única ou dupla hélice do DNA, os compostos organocalcogênicos tem surgido como uma alternativa para o tratamento do câncer, agindo principalmente através de enzimas de detoxificação das espécies reativas de oxigênio (EROs). A capacidade desses compostos para inibir o crescimento celular e para induzir a apoptose de células tumorais é sugerida como um mecanismo potencial para quimioprevenção do câncer. Inclusive, especula-se que a apoptose induzida por compostos organocalcogênicos pode remover células transformadas durante a carcinogênese e suprimir a expansão clonal desse tipo celular.

Dessa forma, o presente invento trata de uma nova série nucleosídica de compostos organocalcogênicos, contendo átomos de selênio, enxofre e telúrio em sua estrutura na posição 5', com poder antioxidante e antitumoral. Esses compostos calcogeno-nucleosídeos tiveram como base a estrutura nucleosídica de um análogo da timidina, o AZT. Além de se tratar de uma nova série de compostos os derivados sintetizados, chamados de 5'-arilcalcogeno azidotimidina, apresentam perfil antioxidante e antitumoral, os compostos

mostram-se altamente eficientes em relação aos fármacos existentes hoje no mercado.

A busca na literatura científica e patentária apontou alguns documentos relevantes para a presente invenção, os quais serão descritos a seguir.

O documento US 7,999,099 descreve uma molécula biológica com potencial antiviral, derivada de AZT (3'-azido-3'-deoxitimidina), fosfonada, com a seguinte fórmula:



onde R é um grupamento alquilas, incluindo átomos halogenados. Este composto pode ser usado como agente antiviral, pois possui baixa toxicidade e inibe a replicação do vírus de imunodeficiência tipo 1. A presente invenção difere deste documento por não se tratar de um derivado fosfonado de AZT mas, sim, de derivados 5'- arilcalcogeno azidotimidina e por possuir ação antitumoral e não antiviral, fato não citado e nem sugerido no referido documento.

O documento US 6,482,805 descreve compostos com atividade contraceptiva e antiviral, obtidos a partir de compostos contraceptivos contendo bases de pirimidina ou de nucleotídeos que contenham atividade espermicida. Um exemplo é um derivado de AZT com substituições 5-halo, 6-alcoxi. Esses compostos, principalmente derivados de AZT fosfatados apresentam maior atividade antiviral. A presente invenção difere deste documento por não se tratar de derivados 5'- arilcalcogeno azidotimidina e por possuir ação antitumoral e não antiviral ou espermicida.

O documento "Potencial Genotóxico De Novos Compostos De Selênio Derivados Da Droga Zidovudina (Azt)" de Mariano, D.O.C. et al, descreve

testes de genotoxicidade em derivados de AZT contendo selênio em sua fórmula química. A presente invenção difere deste documento por tratar da capacidade dos compostos agirem em culturas de células tumorais, assim como sua capacidade antioxidante, fato não citado no referido documento.

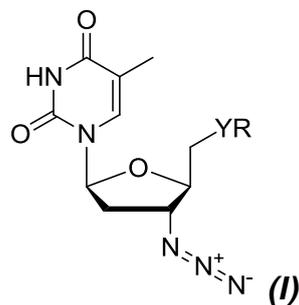
O documento US 5,380,825 descreve um método de determinação quantitativa do nível de fármacos no organismo, preferencialmente aquelas com rápido tempo de meia vida. Este método é aplicado para a determinação de níveis de AZT em pacientes submetidos a tratamentos com o mesmo. O método compreende usar um análogo de AZT e anticorpos capazes de se reconhecê-lo, e então determinar a quantidade de anticorpos com uma técnica apropriada. A presente invenção difere deste documento por não se tratar de um método de determinação quantitativa e por descrever derivados 5'-arilcalcogeno azidotimidina e com ação antitumoral, fato não citado e nem sugerido no referido documento.

Do que se depende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

### **Sumário da Invenção**

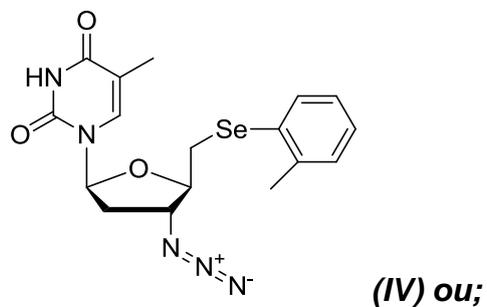
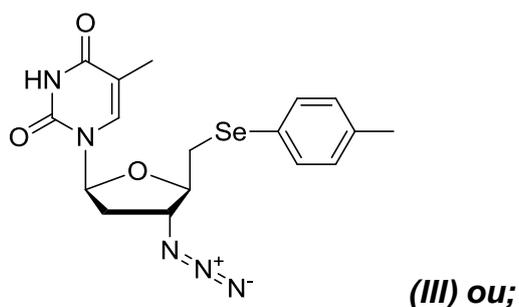
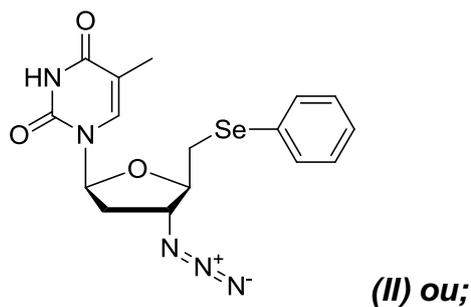
A presente invenção revela uma nova série de calcogeno-nucleosídeos, derivados do AZT (5'- arilcalcogeno azidotimidina), contendo átomos pertencentes à família dos calcogênios em sua estrutura.

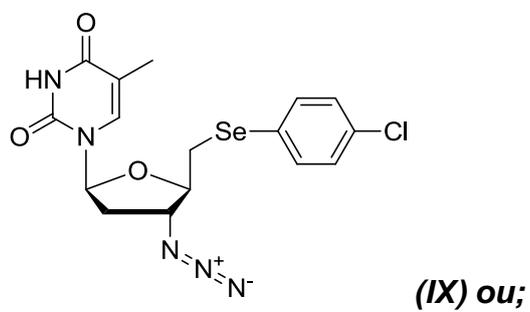
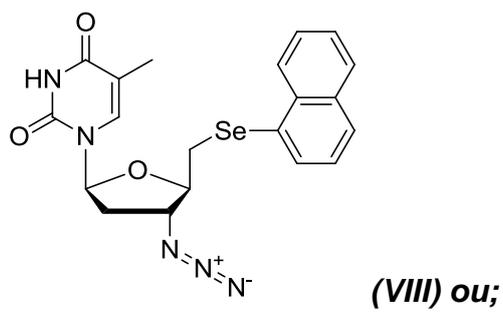
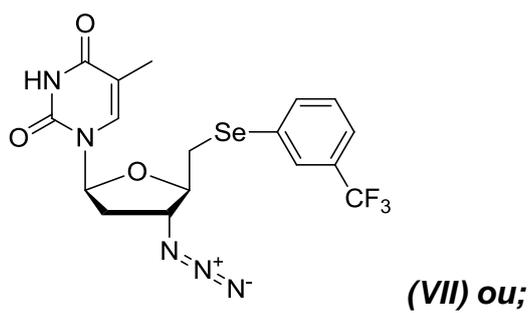
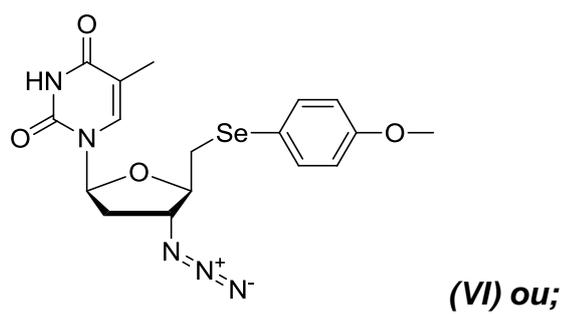
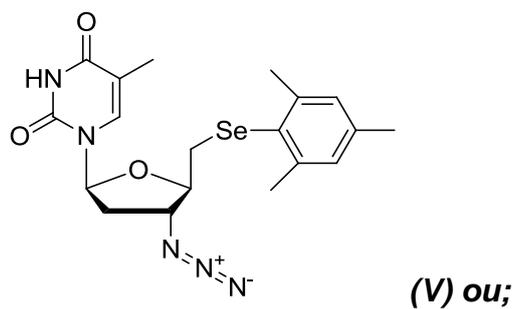
Em um aspecto, a presente invenção revela derivados 5'- arilcalcogeno azidotimidina compreendendo a fórmula geral I, abaixo:

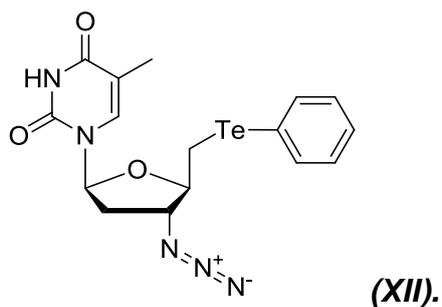
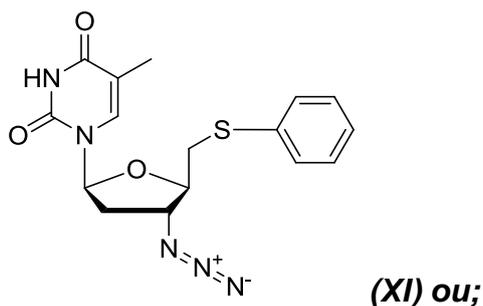
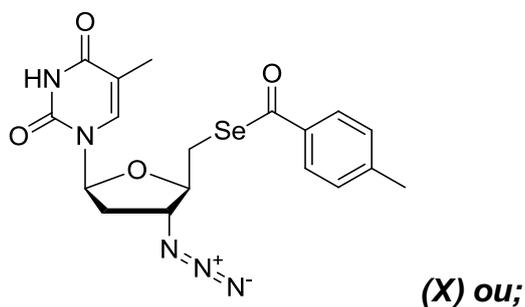


onde *R* representa pelo menos um grupamentos arilas e *Y* representa pelo menos um átomo de selênio, enxofre e/ou telúrio.

Em concretizações preferenciais, os derivados 5'-arilcalcogeno azidotimidina da presente invenção podem ser escolhidos do grupo que compreende:







***A presente invenção revela, ainda, uma droga com potencial farmacêutico compreendendo os derivados 5'-arilcalcogeno azidotimidina de acordo com a fórmula geral I;***

***A presente invenção revela, ainda, o uso de derivados 5'-arilcalcogeno azidotimidina compreendidos na fórmula geral I e, preferencialmente, conforme qualquer uma das fórmulas II a XII, para ser explorado como uma droga com ação antioxidante e/ou antitumoral.***

***A presente invenção revela, ainda, um processo de síntese dos 5'-arilcalcogeno azidotimidina compreendendo as etapas de:***

- a) realizar uma interconversão do grupo funcional hidroxila, a partir do AZT, transformando esta em um bom grupo***

***abandonador; e***

***b) substituir o grupo abandonador por calcogenolatos arílicos, empregando diferentes dicalcogenetos arílicos.***

***Em uma concretização preferencial, o referido processo de síntese, adicionalmente, compreende pelo menos uma das etapas a seguir:***

- a) Solubilizar AZT em THF seco, sob atmosfera de Argônio;
- b) Resfriar o sistema e adicionar  $\text{Et}_3\text{N}$ , seguido de agitação da mistura;
- c) Adicionar cloreto de mesila, seguido de agitação da mistura;
- d) Extrair a reação com uma solução de  $\text{NaHCO}_3$ ;
- e) Extrair a fase orgânica com diclorometano;
- f) Combinar as fases orgânicas e secá-las com  $\text{MgSO}_4$ ;
- g) Evaporar o solvente por pressão;
- h) Cristalizar o produto em acetato de etila, e secar em bomba de alto vácuo;
- i) Adicionar o dicalcogeneto em um tubo de Schlenk, sob atmosfera inerte de argônio, em DMSO seco;
- j) Adicionar KOH, seguido de agitação da mistura, durante 5 minutos;
- k) Após esse período adicionar ao sistema reacional uma solução do mesilato do AZT, solubilizado em DMSO seco;
- l) Aumentar a temperatura da reação até  $80^\circ\text{C}$ ;
- m) Acompanhar por placas cromatográficas, a fim de verificar o consumo do mesilato e a formação do produto;
- n) Destilar o DMSO sob pressão reduzida e solubilizar o produto em diclorometano e etanol;
- o) Purificar o produto em coluna cromatográfica em gel de sílica, utilizando como eluente diclorometano, diclorometano/etanol (9:1).

Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

### **Breve Descrição Das Figuras**

**Figura 1:** Síntese dos derivados 5'-arilcalcogeno azidotimidina, configurando a síntese, objeto da presente invenção.

**Figura 2:** Inibição da peroxidação lipídica cerebral (formação de TBARS) pelos derivados 5'-arilselênio azidotimidina. Os dados são expressos como média SEM de três experimentos diferentes. \* Indica uma diferença significativa de DMSO + Fe ( $p < 0,05$ ).

**Figura 3:** Atividade do tipo GPx dos compostos 5'-arilselênio azidotimidina. Todos os compostos foram testados a 500  $\mu\text{M}$  ( $n = 3$  experimentos independentes feito em triplicata). \* Indica diferença significativa do grupo controle ( $p < 0,05$ ).

**Figura 4a:** O painel A mostra o efeito de diferentes concentrações de AZT, 3a, 3b e 3h em 24, 48 e 72 horas na citotoxicidade sobre células 5637. Os dados são expressos como a média  $\pm$  SEM e as diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ . Maiúsculas indicam diferenças entre o tempo de tratamento e minúsculas indicam diferenças entre as concentrações.

**Figura 4b:** Painel B mostra os dados comparativos da morfologia (16 x ampliação) de células não tratadas e tratadas com 50 e 100  $\mu\text{M}$  de AZT, 3a, 3b e 3h depois de 48 h de exposição. O Controle (meio de SFB) (b1); Controle DMSO (b2); AZT 100  $\mu\text{M}$  (b3); AZT 50  $\mu\text{M}$  (b4); 3a 100  $\mu\text{M}$  (b5); 3a 50  $\mu\text{M}$  (b6); 3b 100  $\mu\text{M}$  (b7); 3b 50  $\mu\text{M}$  (b8); 3h 100  $\mu\text{M}$  (b9); 3h 50  $\mu\text{M}$  (b10).

**Figuras 5a à 5e:** Efeito do AZT e derivados sobre apoptose relacionada a expressão gênica. Painel A – BAX, B – Bcl-2, C – Caspase 9, D – Survivin, E – relação Bax:Bcl-2. Os dados apresentados são resultados das médias  $\pm$  SEM da representação dos experimentos realizadas em triplicada ( $N = 3$ ). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as médias.

**Figuras 6a e 6b:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm)  $J(\text{Hz})$  / 400 MHz e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm)  $J(\text{Hz})$  / 100 MHz do composto 3a.

**Figuras 7a e 7b:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm)  $J(\text{Hz})$  / 400 MHz e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm)  $J(\text{Hz})$  / 100 MHz do composto 3b.

**Figuras 8a e 8b:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm)  $J(\text{Hz})$  / 400 MHz e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm)  $J(\text{Hz})$  / 100 MHz do composto 3c.

**Figuras 9a e 9b:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm)  $J(\text{Hz})$  / 400 MHz e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm)  $J(\text{Hz})$  / 100 MHz do composto 3d.

**Figuras 10a e 10b:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm)  $J(\text{Hz})$  / 400 MHz e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm)  $J(\text{Hz})$  / 100 MHz do composto 3e.

**Figuras 11a e 11b:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm)  $J(\text{Hz})$  / 400 MHz e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm)  $J(\text{Hz})$  / 100 MHz do composto 3f.

**Figuras 12a e 12b:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm)  $J(\text{Hz})$  / 400 MHz e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm)  $J(\text{Hz})$  / 100 MHz do composto 3g.

**Figuras 13a e 13b:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm)  $J(\text{Hz})$  / 400 MHz e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm)  $J(\text{Hz})$  / 100 MHz do composto 3h.

**Figuras 14a e 14b:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm)  $J(\text{Hz})$  / 400 MHz e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm)  $J(\text{Hz})$  / 100 MHz do composto 3i.

**Figuras 15a e 15b:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm)  $J(\text{Hz})$  / 400 MHz e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm)  $J(\text{Hz})$  / 100 MHz do composto 3j.

**Figuras 16a e 16b:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm)  $J(\text{Hz})$  / 400 MHz e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm)  $J(\text{Hz})$  / 100 MHz do composto 3k.

### **Descrição Detalhada da Invenção**

A Zidovudina (AZT) é um fármaco comumente indicado para o tratamento de HIV (tipo 1 e 2). Seu mecanismo de ação tem como alvo a transcriptase reversa (TR) e é comumente utilizado no tratamento ao HIV/AIDS, agindo como uma cadeia terminal na reação da TR, permitindo a fosforilação

intracelularmente do AZT 5'-trifosfato, e posteriormente remoção de dois grupamentos fosfatos, incorporando o AZT 5'-monofosfato na posição 3'-final da cadeia de formação do DNA viral.

O AZT da presente invenção é preferencialmente utilizado como base para obtenção dos derivados 5'-arilcalcogeno azidotimidina descritos de acordo com a fórmula I.

### Calcogênio

Calcogênio é qualquer elemento químico do grupo da Tabela Periódica 16 (6A). Juntos compõem a série química de mesmo nome. Grupo 16 (6A) - Grupo dos Calcogênios. O nome vem do grego "Khalkos", que significa cobre, e "genos", uma família de origem nobre, assim "calcogênio" significa "originário do cobre" ou "que vem do cobre". Todos os elementos deste grupo são não-metais e o polônio é o único deles que é radioativo. Eles são caracterizados pela configuração eletrônica  $ns^2 np^4$  da sua camada de valência (tendo assim, 6 elétrons nessa camada); formam compostos com metais e com hidrogênio quando o número de oxidação é -2. Os números de oxidação +2, +4 e +6 ocorrem quando os elementos do grupo formam compostos com outros elementos do seu próprio grupo, ou com os elementos do grupo 17 (7A), os halogênios. O grupo dos calcogênios é formado por: Oxigênio (O), Enxofre (S), Selênio (Se), Telúrio (Te), Polônio (Po), Ununhexium (Uuh).

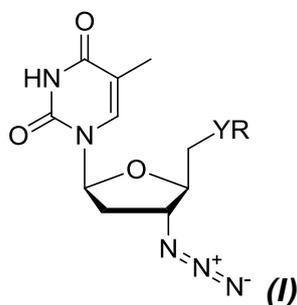
Os calcogênios da presente invenção são utilizados como parte da fórmula I, permitindo a obtenção de novos e inventivos 5'-arilcalcogeno azidotimidina.

### Câncer

O câncer é uma doença caracterizada por uma população de células que cresce e se divide sem respeitar os limites normais, invade e destrói tecidos adjacentes e pode se espalhar para lugares distantes no corpo, através

de um processo chamado metástase. Estas propriedades malignas do câncer o diferenciam dos tumores benignos, que são auto-limitados em seu crescimento e não invadem tecidos adjacentes (embora alguns tumores benignos sejam capazes de se tornarem malignos). O câncer pode afetar pessoas de todas as idades, mas o risco para a maioria dos tipos de câncer aumenta com o acréscimo da idade.

***A presente invenção revela 5'-arilcalcogeno azidotimidina compreendendo uma fórmula geral I***

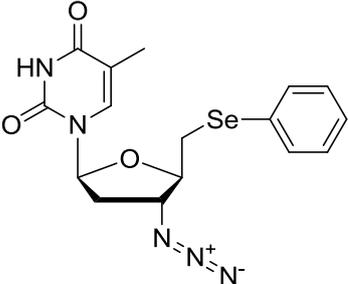
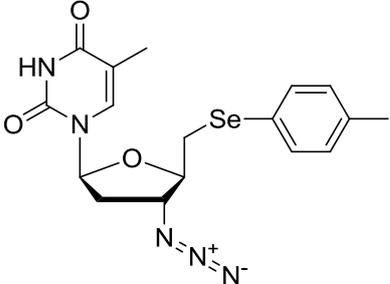
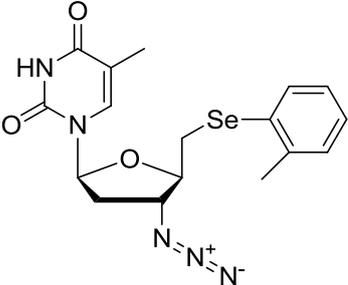
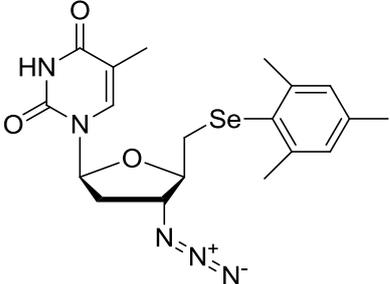


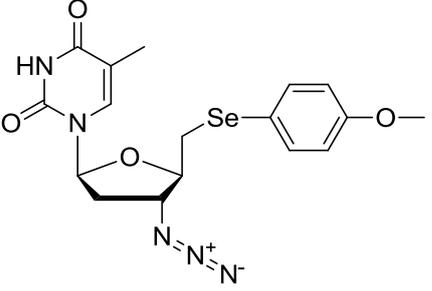
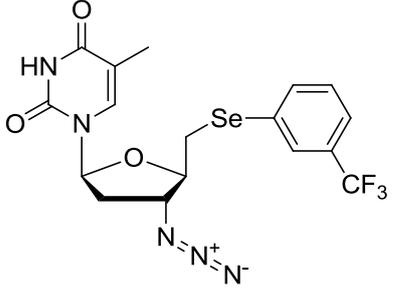
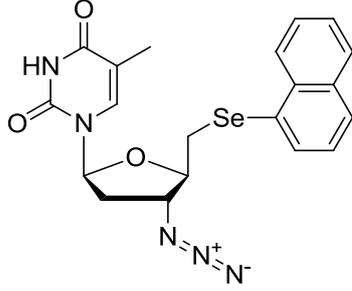
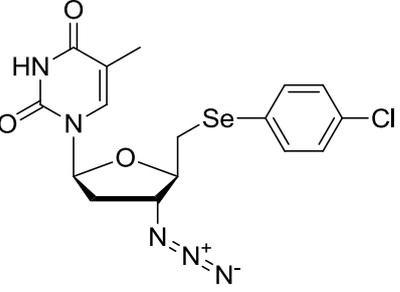
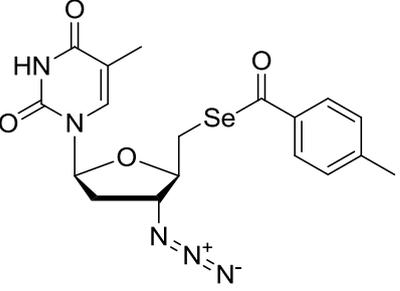
***onde R representa pelo menos um grupamento arila e Y representa pelo menos um átomo de selênio, enxofre e/ou telúrio.***

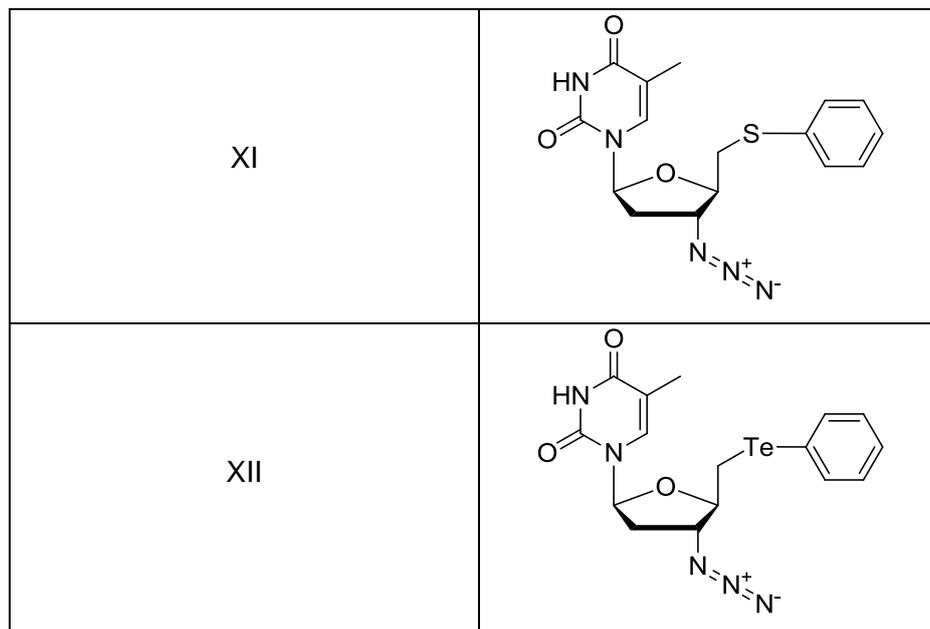
***Os derivados 5'-arilcalcogeno azidotimidina da presente invenção, são obtidos a partir do análogo nucleosídico conhecido como AZT, também conhecido como azidotimidina, zidovudina ou retrovir.***

As variações preferenciais, R e Y, aparecem listadas na tabela 1, abaixo, a qual apresenta os derivados 5'-arilcalcogeno azidotimidina preferenciais, de acordo com a presente invenção, junto com seus respectivos números de referência que serão utilizados ao longo do presente relatório descritivo.

Tabela 1: Lista dos 5'- arilcalcogeno azidotimidina obtidos

No. referência dos 5'- arilcalcogeno azidotimidina	Estrutura/composição
II	
III	
IV	
V	

VI	
VII	
VIII	
IX	
X	



Os derivados 5'-arilcalcogeno azidotimidina, objeto da presente invenção, são obtidos a partir de um processo de síntese compreendendo, as etapas de: realização de uma interconversão do grupo funcional, a partir do AZT, transformando o grupamento hidroxila em um bom grupo abandonador; e substituição deste último por diferentes calcogenolatos arílicos, sendo estes últimos obtidos a partir dos seus respectivos dicalcogenetos.

Em uma concretização preferencial, mas não obrigatória, o referido processo de síntese dos 5'-arilcalcogeno azidotimidina, objeto da presente invenção, compreende pelo menos uma das etapas listadas a seguir:

- a) Solubilizar AZT em THF seco, sob atmosfera de Argônio;
- b) Resfriar o sistema e adicionar  $\text{Et}_3\text{N}$ , seguido de agitação da mistura;
- c) Adicionar cloreto de mesila, seguido de agitação da mistura;
- d) Extrair a reação com uma solução de  $\text{NaHCO}_3$ ;
- e) Extrair a fase orgânica com diclorometano;
- f) Combinar as fases orgânicas e secá-las com  $\text{MgSO}_4$ ;
- g) Evaporar o solvente por pressão;
- h) Cristalizar o produto em acetato de etila, e secar em bomba de alto vácuo;

- i) Adicionar o dicalcogeneto em um tubo de Schlenk, sob atmosfera inerte de argônio, em DMSO seco;
- j) Adicionar KOH, seguido de agitação da mistura, durante 5 minutos;
- k) Após esse período adicionar ao sistema reacional uma solução do mesilato do AZT, solubilizado em DMSO seco;
- l) Aumentar a temperatura da reação até 80° C;
- m) Acompanhar por placas cromatográficas, a fim de verificar o consumo do mesilato e a formação do produto;
- n) Destilar o DMSO sob pressão reduzida e solubilizar o produto em diclorometano e etanol;
- o) Purificar o produto em coluna cromatográfica em gel de sílica, utilizando como eluente diclorometano, diclorometano/etanol (9:1).

Cumprе ressaltar que as etapas de síntese dos 5'-arilcalcogeno azidotimidina, objeto da presente invenção, listados acima, são etapas de um processo preferencial e não limitam a obtenção dos compostos 5'-arilcalcogeno azidotimidina, objeto da presente invenção.

***Baseado nos conhecimentos do estado da técnica, quanto à ação antioxidante dos compostos organocalcogênicos, associado à presença de atividade anticancerígena já constatada pelo estado da técnica, para o nucleosídeo AZT, faz-se um segundo objeto da presente invenção, uma droga com potencial farmacêutico, compreendendo os 5'-arilcalcogeno azidotimidina de acordo com a fórmula geral I, onde R representa pelo menos um grupamento arila e Y representa pelo menos um átomo pertencente à família dos calcogênios.***

***Em uma concretização preferencial, os 5'-arilcalcogeno azidotimidina compreendidos na composição farmacêutica podem ser qualquer um listado na tabela 1 (calcogeno-nucleosídeos II a XII).***

***Adicionalmente, um terceiro objeto da presente invenção, o uso dos 5'-arilcalcogeno azidotimidina, de tal modo que os referidos 5'-***

***arilcalcogeno azidotimidina estejam compreendidos na fórmula geral I, ou, preferencialmente, em qualquer uma das fórmulas II a XII, conforme lista da tabela 1, para ser buscada a fabricação de um medicamento com ação antioxidante e/ou antitumoral.***

#### **Exemplo 1. Processo de Síntese**

Em um primeiro exemplo, referente ao processo de síntese dos compostos 5'-arilcalcogeno azidotimidina, a metodologia utilizada para a obtenção dos calcogenoderivados do AZT desejados, emprega-se como material de partida o AZT. Em um próximo passo, realiza-se uma interconversão do grupo funcional hidroxila, transformando esta em um bom grupo abandonador para, em seguida, ser substituído por diferentes calcogenolatos arílicos. A figura 1 ilustra o referido processo.

Após uma série de testes reacionais, para otimização da condição ideal para a obtenção dos 5'-arilcalcogeno azidotimidina, determinou-se que, utilizando solvente polar prótico como o DMSO e, Hidróxido de Potássio (KOH) como agente redutor, sob aquecimento de a 80° C, seria a melhor condição reacional.

Dentro destes parâmetros, os respectivos compostos foram obtidos com rendimentos que variaram de 65 à 92%.

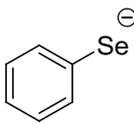
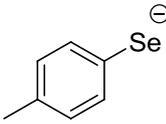
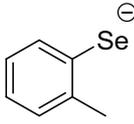
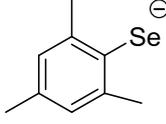
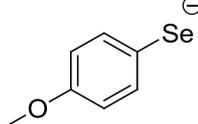
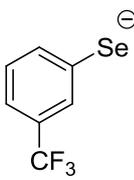
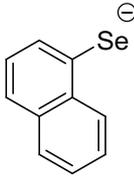
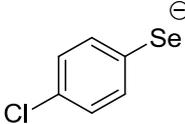
Em um exemplo específico do processo de síntese dos 5'-arilcalcogeno azidotimidina, objeto da presente invenção, adota-se os parâmetros específicos listados abaixo:

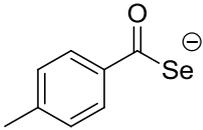
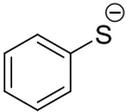
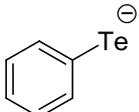
- a) Solubilizar 2 mmol de AZT em 17 ml de THF seco, sob atmosfera de Argônio, em um balão de duas bocas;
- b) Resfriar o sistema à 0 °C e, adicionando Et<sub>3</sub>N (trietilamina), deixar a mistura agitando por 10 minutos;
- c) Ainda com o sistema à 0 °C, adicionar cloreto de mesila, seguido de agitação da mistura por aproximadamente 2 horas, a temperatura ambiente;

- d) Extrair a reação com uma solução saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (aproximadamente 20 ml);
- e) Extrair a fase orgânica com diclorometano (aproximadamente 3x 20 ml);
- f) Combinar as fases orgânicas e secá-las com  $\text{MgSO}_4$ ;
- g) Evaporar o solvente por pressão; (Obs: Os rendimentos obtidos foram na faixa de 92 a 100%)
- h) Cristalizar o produto em acetato de etila, e secar em bomba de alto vácuo;
- i) Adicionar 0,6 mmol do dicalcogeneto em um tubo de Schlenk, sob atmosfera inerte de argônio, em 1mL de DMSO seco;
- j) Posteriormente, adicionar 2 equivalentes de KOH, seguido de agitação da mistura, durante 5 minutos.
- k) Após esse período adicionar ao sistema reacional uma solução de 1mmol do mesilato do AZT, solubilizado em 1mL de DMSO seco;
- l) Aumentar a temperatura da reação até  $80^\circ \text{C}$ ;
- m) Acompanhar por placas cromatográficas, a fim de verificar o consumo do mesilato e a formação do produto;
- n) Destilar o DMSO sob pressão reduzida e solubilizar o produto em diclorometano e etanol;
- o) Purificar o produto em coluna cromatográfica em gel de sílica, utilizando como eluente diclorometano, diclorometano/etanol (9:1).

A partir do referido processo, foram sintetizados os 5'-arilcalcogeno azidotimidina preferenciais, os quais são dotados dos respectivos calcogenolatos, listados na tabela 2, junto de suas respectivas nomenclaturas (adotadas ao longo do presente relatório descritivo) e do rendimento de obtenção de cada um deles.

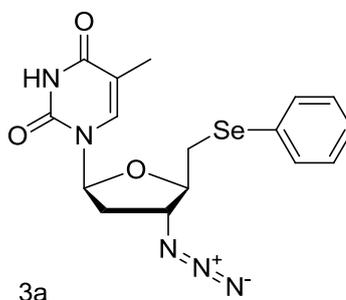
**Tabela 2: Rendimento dos 5'-arilcalcogeno azidotimidina e seus respectivos calcogenolatos**

Calcogenolato	5'-calcogeno azidotimidina	Composto	Rendimento
	II	3a	87%
	III	3b	82%
	IV	3c	80%
	V	3d	62%
	VI	3e	73%
	VII	3f	68%
	VIII	3g	74%
	IX	3h	89%

	X	3i	65%
	XI	3j	92%
	XII	3k	76%

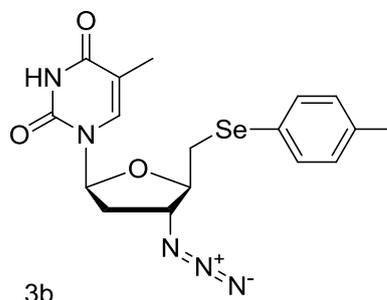
Todos os compostos foram identificados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Os dados espectrais foram obtidos a partir dos respectivos 5'-arilcalcogeno azidotimidina, cujos dados de cada um dos compostos seguem abaixo.

#### 5'- arilseleno azidotimidina 3a:



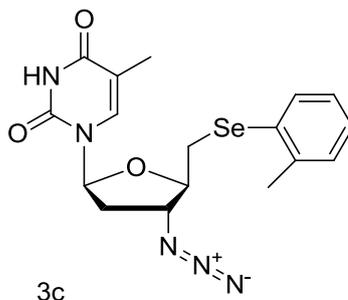
RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  9.27 (s, 1H), 7.54 (dd,  $J = 2.99, 6.50$  Hz, 2H), 7.32 – 7.26 (m, 4H), 6.12 (t,  $J = 6.55$  Hz, 1H), 4.14 (m, 2H), 3.24 (t,  $J = 5.80$  Hz, 2H), 2.53 – 2.30 (m, 2H), 1.86 (s, 3H). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  163.85, 149.89, 135.41, 132.34, 129.48, 127.91, 111.36, 84.95, 82.81, 62.79, 37.36, 29.69, 12.43.

O perfil espectral do 5'- arilseleno azidotimidina 3a aparece nas figuras 6a e 6b.

**5'- arilseleno azidotimidina 3b:**

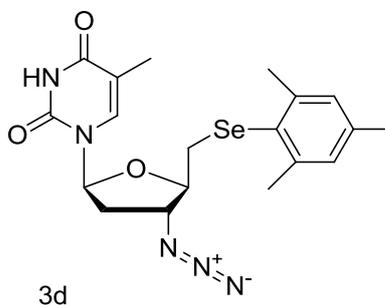
RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.57 (s, 1H), 7.46 (d,  $J = 8.08$  Hz, 2H), 7.30 (s, 1H), 7.13 (d,  $J = 7.82$  Hz, 2H), 6.12 (t,  $J = 6.53$  Hz, 1H), 4.21 – 4.05 (m, 3H), 3.23 – 3.20 (m, 2H), 2.49 – 2.43 (m, 1H), 2.35 (s, 3H), 1.90 (s, 3H). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  163.39, 149.86, 137.92, 135.35, 132.79, 130.46, 125.06, 111.53, 84.68, 83.04, 62.90, 37.47, 30.42, 21.09, 12.68.

O perfil espectral do 5'- arilseleno azidotimidina 3b aparece nas figuras 7a e 7b.

**5'- arilseleno azidotimidina 3c:**

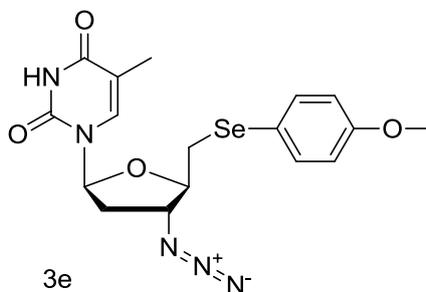
RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  9.64 (s, 1H), 7.49 (d,  $J = 7.70$  Hz, 1H), 7.23 – 7.13 (m, 4H), 6.12 (t,  $J = 6.50$  Hz, 1H), 4.22 – 4.08 (m, 3H), 3.27 – 3.20 (m, 2H), 2.46 (s, 3H), 1.85 (s, 3H). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  164.05, 150.28, 139.09, 135.73, 131.51, 130.33, 127.40, 126.91, 111.25, 84.94, 82.72, 62.86, 37.47, 28.73, 22.49, 12.24.

O perfil espectral do 5'- arilseleno azidotimidina 3c aparece nas figuras 8a e 8b.

**5'- arilseleno azidotimidina 3d:**

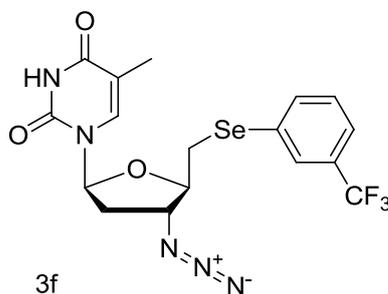
RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.85 (s, 1H), 7.38 (s, 2H), 6.18 (t,  $J = 6.6$  Hz, 1H), 4.34- 4.13 (m, 3H), 3.54 (m, 2H), 2.99 (s, 9H), 2.5 – 2.27 (m, 1H), 1.94 (s, 3H)  
 RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  163.51, 150.06, 141.15, 138.42, 135.36, 128.85, 126.76, 111.54, 84.98, 82.56, 68.83, 37.46, 29.68, 26.65, 21.31, 12.64.

O perfil espectral do 5'- arilseleno azidotimidina 3d aparece nas figuras 9a e 9b.

**5'- arilseleno azidotimidina 3e:**

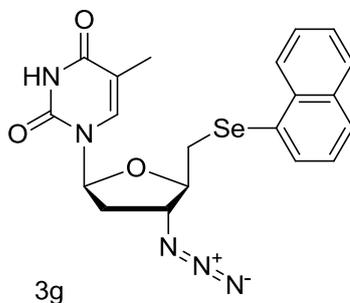
RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.90 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.33 (d,  $J = 1.1$  Hz, 2H), 6.91 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H), 6.14 (t,  $J = 6.5$  Hz, 1H), 4.26 – 4.03 (m, 2H), 3.84 (m, 3H), 3.16 (s, 3H), 1.94 (s, 3H). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  163.47, 159.73, 149.94, 135.50, 132.22, 120.71, 115.16, 111.31, 84.96, 83.02, 62.87, 55.34, 37.39, 29.70, 12.60.

O perfil espectral do 5'- arilseleno azidotimidina 3e aparece nas figuras 10a e 10b.

**5'- arilseleno azidotimidina 3f:**

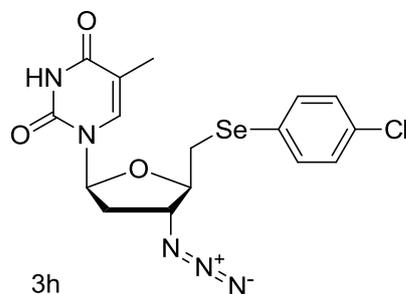
RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  9.63 (m, 1H), 7.86 – 7.70 (m, 3H), 7.64 – 7.39 (m, 2H), 6.12 (t,  $J = 6.5$  Hz, 1H), 4.18 – 4.01 (m, 3H), 3.33 (m, 2H), 2.46 (m, 1H), 1.87 (s, 3H). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  163.7, 150.63, 146.94, 136.50, 135.68, 132.91, 128.48, 126.11, 83.56, 82.82, 68.32, 62.17, 35.23, 29.70, 12.62.

O perfil espectral do 5'- arilseleno azidotimidina 3f aparece nas figuras 11a e 11b.

**5'- arilseleno azidotimidina 3g:**

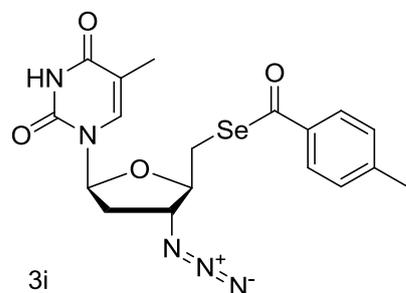
RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.85 (s, 1H), 8.40 (d,  $J = 8.29$  Hz, 1H), 7.91 – 7.83 (m, 3H), 7.63 – 7.52 (m, 2H), 7.40 (dd,  $J = 7.27, 8.11$  Hz, 1H), 7.23 (d,  $J = 1.17$  Hz, 1H), 6.07 (t,  $J = 6.53$  Hz, 1H), 4.19 – 4.09 (m, 2H), 3.33 – 3.23 (m, 2H), 2.48 – 2.32 (m, 2H), 1.86 (s, 3H). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  163.44, 149.87, 135.40, 132.79, 129.09, 127.18, 126.99, 126.44, 125.81, 111.23, 85.50, 83.01, 63.12, 37.30, 30.20, 12.22.

O perfil espectral do 5'- arilseleno azidotimidina 3g aparece nas figuras 12a e 12b.

**5'- arilseleno azidotimidina 3h:**

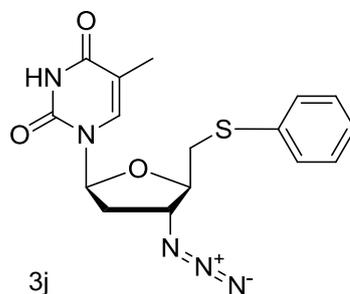
RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  9.85 (s, 1H), 7.49 – 7.45 (m, 2H), 7.23 (s, 2H), 7.21 (s, 1H), 6.08 (t,  $J = 6.43$  Hz, 1H), 4.22 – 4.01 (m, 2H), 3.28 – 3.18 (m, 2H), 2.49 – 2.36 (m, 2H), 1.86 (s, 3H). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  164.25, 150.35, 135.56, 133.98, 129.70, 127.22, 111.15, 85.25, 82.75, 62.71, 37.41, 30.04, 12.40.

O perfil espectral do 5'- arilseleno azidotimidina o 3h aparece nas figuras 13a e 13b.

**5'- arilseleno azidotimidina 3i:**

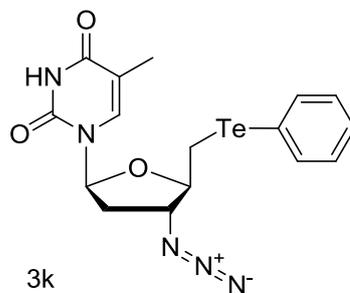
RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  9.90 (s, 1H), 7.96 (dd,  $J = 8.15, 16.40$  Hz, 3H), 7.24 (s, 2H), 6.19 (t,  $J = 6.44$  Hz, 1H), 4.75 – 4.5 (m, 2H), 4.31- 4.10 (m, 2H), 2.62 – 2.49 (m, 1H), 2.42 (s, 3H), 1.69 (s, 3H). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  12.4, 21.3, 21.9, 38.1, 62.8, 83.4, 86.2, 110.9, 129.5, 129.8, 133.7, 136.6, 144.2, 150.8, 163.7, 190.1.

O perfil espectral do 5'- arilseleno azidotimidina 3i aparece nas figuras 14a e 14b.

**5'- arilsulfeto azidotimidina 3j:**

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  9.51 (s, 1H), 7.42 (d,  $J = 7.54$  Hz, 2H), 7.33 (t,  $J = 7.56$  Hz, 2H), 7.27 – 7.22 (m, 2H), 6.11 (t,  $J = 6.49$  Hz, 1H), 4.29 – 4.06 (m, 2H), 3.31 (m, 2H), 2.49 – 2.36 (m, 2H), 1.84 (s, 3H). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  164.03, 150.28, 135.62, 134.92, 129.29, 127.05, 111.24, 85.20, 82.55, 62.23, 37.38, 36.26, 12.35.

O perfil espectral do 5'- arilsulfeto azidotimidina 3j aparece nas figuras 15a e 15b.

**5'- ariteluro azidotimidina 3k:**

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  9.22 (s, 1H), 7.87 – 7.70 (m, 1H), 7.40 (d,  $J = 1.19$  Hz, 1H), 7.29 (m, 4H), 6.22 (t,  $J = 6.61$  Hz, 1H), 4.42 – 4.12 (m, 2H), 3.95 – 3.79 (m, 2H), 2.47 (dd,  $J = 6.26, 13.31$  Hz, 2H), 1.98 (s, 3H). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  163.44, 149.87, 135.40, 132.79, 129.09, 126.44, 111.23, 85.50, 83.01, 63.12, 37.30, 30.20, 12.22.

O perfil espectral do 5'- ariteluro azidotimidina 3k aparece nas figuras 16a e 16b.

## **Exemplo 2. Atividade Antioxidante dos derivados 5'- arilseleno azidotimidina**

A atividade antioxidante 5'- arilseleno azidotimidina foi testada no ensaio de peroxidação lipídica (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico ou TBARS) e pelo mimetismo da atividade da enzima glutathione peroxidase. Estes testes são de extrema importância, pois dados da literatura indicam que diferentes classes de organocalcogênios podem ter efeito antioxidante. De importância particular para um fármaco com efeito em múltiplos alvos, os derivados 5'- arilseleno azidotimidina poderiam ter efeitos farmacológicos importantes relacionados a uma inibição da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio. De fato, tanto o câncer como a AIDS estão associadas com uma produção excessiva de radicais livres e inibidores potenciais da produção de radicais livre poderiam diminuir os efeitos colaterais associados com o tratamento destas patologias.

### Materiais utilizados

DMSO, ácido tiobarbitúrico (TBA), Malondialdeído foi obtido da Sigma (St. Louis, MO). Todos os demais reagentes químicos a serem utilizados no experimento são de pureza analítica e todas as soluções foram preparadas com água destilada.

### Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos (150 – 250g) obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria (Santa Maria, RS, Brasil). Os animais foram mantidos em um ambiente com temperatura controlada ( $23^{\circ}\text{C} \pm 1$ ) e com um ciclo de 12 horas claro/escuro. As dietas, tanto sólida quanto hídrica, foram fornecidas *ad libitum*. Antes do início do experimento, os animais passaram por um período de adaptação de 20 dias.

### Preparação dos tecidos

Os animais foram mortos por decaptação. Os cérebros foram removidos e homogenizados em 10mM de tampão Tris-HCl, pH 7.4 (1/10, w/v), e centrifugados a 2000 rpm por 10 min. O sobrenadante considerado fração S1 foi mantido em gelo para os ensaios de TBARS.

### Determinação do nível de TBARS

A determinação do nível de TBARS foi determinada de acordo com Ohkawa et al. (1979) e Puntel et al. (2007), e a quantidade de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é expressa como nmol de MDA/g de tecido. Disseleneto de difenila foi usado como controle positivo

### Atividade Tiol Peroxidase

A atividade catalítica dos compostos como modelo enzimático da GPx-like foi realizado de acordo com o método de Tomoda et al. (1994), usando benzenotiol (PhSH) como uma glutathione alternativa. Nesta etapa, 50 mM de benzenotiol e 20mM de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) foram diluídos em metanol. Compostos ou DMSO (veículo) foram pipetados em uma cubeta de quartz, contendo metanol com ou sem 500 $\mu$ M dos derivados 5'- arilseleno azidotimidina. Em seguida, o benzenotiol e  $H_2O_2$  foram pipetados. A oxidação do benzenotiol foi monitorada em 305 nm, durante 180 seconds.

### Análise estatística

Todos os procedimentos foram realizados em duplicata e suas medidas analisadas estatisticamente através de análise da variância de uma via (ANOVA) ou 2 vias quando necessário, seguida pelo teste de Duncan quando o teste F for significativo ( $p < 0.05$ ). Todos os dados serão expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

## Resultados e Discussão

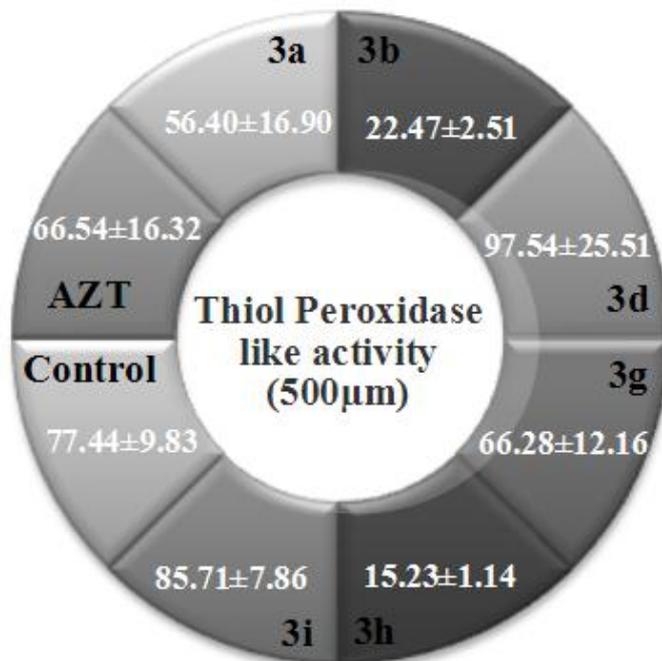
A peroxidação lipídica foi determinada pelo método de Ohkawa et al. e Puntel et al. Os derivados 5'- arilseleno azidotimidina foram testados em duas concentrações (100 $\mu$ M e 200 $\mu$ M).

Na concentração 200 $\mu$ M, todos os derivados do AZT inibiram a produção de TBARS ( $p < 0,05$ ) em homogenizados de cérebro, conforme pode ser notado na figura 2.

O composto 3g apresentou a maior potência como inibidor da lipoperoxidação (inibição da produção de TBARS). Os compostos 3b e 3h também demonstraram boa atividade antioxidante, quando comparados ao AZT e ao grupo controle (Fe).

A atividade mimética da Gpx dos compostos derivados 5'- arilseleno azidotimidina foi determinada pelo método de Tomoda et al. usando o benzenotiol (PhSH) como substituto da glutathiona reduzida (GSH). A análise estatística indicou que os compostos 3b e 3h degradaram a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de modo mais eficiente que os compostos 3a, 3d, 3g, 3i, AZT e DMSO (grupo controle), como pode ser visualizado na figura 3. Obs:  $p < 0,05$ .

O tempo necessário para consumir metade da concentração do benzenotiol é apresentado na tabela 3. Os compostos 3h e 3b apresentaram um t<sub>50</sub>, que foi 4-5 vezes menor do que o do DMSO e do AZT (Figuras 2, 3 e tabela 3).

Tabela 3: Tempo requerido para oxidar 50% de benzenotiol ( $T_{50}$ ).

### Exemplo 3. Atividade Antiotumoral dos derivados 5'- arilseleno azidotimidina (3a, 3b e 3h)

Desde 1965, um grande interesse tem sido ligado ao possível papel dos radicais livres nos tecidos tumorais, relacionando a produção excessiva de destes radicais nas células tumorais. Neste contexto, é um consenso entre grande parte dos pesquisadores deste campo, que os radicais de oxigênio participam tanto na fase inicial como na promoção do câncer.

Na fase de iniciação, radicais de oxigênio em conexão com vários agentes cancerígenos, poderia mudar o material genético celular normal a uma composição genética neoplásica. Na fase de promoção, a participação de radicais livres foi inicialmente sugerida em razão dos efeitos dos peróxidos orgânicos, que promoveram o desenvolvimento do câncer. Inexoravelmente, os sistemas antioxidantes capazes de serem usados como compostos antitumorais podem ser descritos como fármacos camaleônicos, devido à possibilidade de combinar a capacidade de ser eficaz para o tratamento células

tumorais e permitir a quimioproteção contra EROS ou outras espécies de sistemas pró-oxidantes, normalmente muito presente nos tecidos alterados.

Em conexão com estas afirmações e com base nos resultados descritos, os compostos 3b e 3h foram selecionados para serem apresentados nos estudos *in vitro* antitumorais, juntamente com o composto 3a e AZT.

### Materiais e métodos utilizados

As células humanas de carcinoma de bexiga (5637), utilizadas nos ensaios realizados, foram obtidas a partir do banco de células do Rio de Janeiro (PABCAM da Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil). As células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 1% L-glutamina e 1% de penicilina/estreptomicina, Gibco (Grand Island , NY, EUA). As células foram cultivadas a 37 °C em uma atmosfera de 95% de ar umidificado e 5% de CO<sub>2</sub>.

Os experimentos foram realizados com células em fase logarítmica de crescimento. Determinação da citotoxicidade A viabilidade das células 5637 foi determinada pela medição da redução de MTT solúveis (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil- tetrazólio). As células foram semeadas a uma densidade de  $2 \times 10^4$  células por poço em um volume de 100 µL em placas de 96 poços e cultivadas a 37° C em uma atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> durante 24 h antes de serem utilizadas no ensaio de viabilidade celular.

As células foram então incubadas com diferentes concentrações de AZT, 3a, 3b e 3h (12.5 a 200 µM) para 24, 48 e 72 h. Estes componentes foram previamente dissolvido em dimetil sufóxido (DMSO) e adicionado ao meio suplementado com SFB 10% para as concentrações desejadas.

A concentração final de DMSO no meio nunca excedeu 0,25% e um grupo controle adicional foi exposto a uma concentração equivalente deste solvente. Após períodos de incubação o meio foi removido e, posteriormente, 180 µL de meio e 20 µL de MTT (5 mg MTT / mL de solução) foi adicionado a cada poço.

As placas foram incubadas por mais três horas e o meio foi descartado. Foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  de DMSO a cada poço, e o formazan foi solubilizado em um agitador por 5 minutos a 100 x g. A absorbância de cada poço foi lida em um leitor de microplacas (Mindray, Seattle, USA) no comprimento de onda de 492 nm.

A inibição do crescimento celular foi determinada da seguinte forma: inibição do crescimento =  $(1 - \text{Abs. células tratadas} / \text{Abs. células controles}) \times 100\%$ . Todos os experimentos foram validados por pelo menos dois experimentos independentes em triplicatas para cada experimento.

### Morfologia Celular

As células foram cultivadas em placas de cultivo de 96 poços, com uma densidade de  $2 \times 10^4$  células por poço, a temperatura de  $37^\circ \text{C}$ , em uma atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  durante o período de 24 h. As células foram incubadas com 50 e 100  $\mu\text{M}$  de AZT, 3a, 3b e 3h, por 48 h.

No final do período de incubação, as células foram observadas e fotografadas em microscópio óptico invertido de fluorescência Olympus IX71 (Olympus Optical Co., Ltd. de Tóquio, Japão), conforme mostrado na figura 4b.

### Ensaio de apoptose

O ensaio Guava Nexin (Guava Technologies, USA) foi realizado seguindo as instruções do fabricante. As células foram tratadas com 50 e 100  $\mu\text{M}$  de AZT, 3a, 3b e 3h por 48 h. Cerca de  $2,0 \times 10^4$  a  $1,0 \times 10^5$  células (100  $\mu\text{L}$ ) foram adicionadas a 100  $\mu\text{L}$  de Reagente Guava Nexin e incubadas no escuro em temperatura ambiente por 20 min, após os quais as amostras foram lidas no sistema de citometria de fluxo Guava EasyCyte. Neste ensaio, células anexin V-negativas e 7-AAD-positivas indicam presença de detritos nucleares; anexin V-positivos e 7-AAD-positivas indicam presença de células em apoptose

tardia; anexin V-negativos e 7-AAD-negativos indicam células saudáveis, e anexin V-positivos e 7-AAD-negativos indicam células em apoptose inicial.

#### Análise da Expressão Gênica utilizando PCR em Tempo Real

As células foram cultivadas em placas de cultivo de 6 poços, com uma densidade de  $2 \times 10^5$  células por poço, a temperatura de 37° C, em uma atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> durante o período de 24 h. As células foram incubadas com 50 e 100  $\mu$ M de (AZT, 3a, 3b e 3h) por 48 h.

Após este período as células foram lavadas com tampão fosfato (PBS; Gibco) e a extração de RNA foi realizada. A extração de RNA total, a síntese de cDNA e PCR em tempo real foram realizadas conforme descrito previamente. Resumidamente, o RNA total foi extraído utilizando Reagente TRIzol (Invitrogen, USA). O RNA foi quantificado no Nanovue (GE, USA), sendo padronizado para a concentração de 4 ng/ml, e então, submetido à reação de transcriptase reversa para obtenção de cDNA (ácido desoxirribonucléico complementar), seguindo as instruções do manual dos kits High Capacity cDNA Reverse Transcription® (Applied Biosystems, USA), para a análise da expressão gênica. O cDNA sintetizado foi então utilizado como template na reação de qRT-PCR. Reações Real-Time PCR foram executadas em termociclador Stratagene® Mx3005P™ Real-Time PCR System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), utilizando SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™, UK), utilizando primers descritos na tabela 4. Os dados da expressão gênica foram analisados através análise de variância a partir dos valores de Ct (threshold cycle) obtidos na reação de qRT-PCR.

**Tabela 4: Primers utilizados na reação de qRT-PCR para as amostras de RNA provenientes do cultivo celular.**

Primers	Sequência 5'→ 3'	Referência
Bcl-2 For	GTGTGGAGAGCGTCAACC	Chen et al., 2010
Bcl-2 Rev	CTTCAGAGACAGCCAGGAG	
Bax For	ATGCGTCCACCAAGAAGC	Chen et al., 2010
Bax Rev	ACGGCGGCAATCATCCTC	
Casp9 For	CCAGAGATTCGCAAACCAGAGG	Huang et al., 2007
Casp9 Rev	GAGCACCGACATCACCAAATCC	
Survivin For	CTGTGGGCCCCTTAGCAAT	Wang et al., 2008
Survivin Rev	TAAGCCC GGGAATCAAAACA	
GAPDH For	GGATTTGGTCGTATTGGG	Hu et al., 2010
GAPDH Rev	TCGCTCCTGGAAGATGG	

### Análise dos dados

O conjunto de dados de MTT e PCR em tempo real foram analisados utilizando ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Dois fatores foram considerados: composto utilizado (quatro níveis) e concentração de compostos (dois níveis). Significância considerada foi de  $P < 0,05$  em todas as análises. Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média).

### Resultados e Discussão

#### Determinação da citotoxicidade

Os quatro componentes (AZT, 3a, 3b e 3h) mostraram uma atividade citotóxica in vitro em 24, 48 e 72 h quando utilizamos células humanas de carcinoma de bexiga (5637). Quando comparado com AZT (62,6-61,1%), a 3a (91,3-66,9%), 3b (92,7-87,3%) e 3h (88,8-74,0%) apresentou maior citotoxicidade nas concentrações de 200-100  $\mu$ M. Além disso, o AZT, 3b e 3h em uma concentração de 50  $\mu$ M em 48 h mostraram um efeito citotóxico, inibindo 50% das células tumorais, conforme figura 4a. Ao considerar o período de exposição aos componentes o efeito citotóxico foi mais eficaz em 48 h.

### Morfologia Celular

Nas figuras 4a e 4b, pode-se observar a morfologia de forma comparativa das células não tratadas e tratadas com 50 e 100  $\mu\text{M}$  de AZT, 3a, 3b e 3h em 48 h. Diferenças na morfologia das células, que incluiu alteração de uma célula em forma esférica e desprendimento da superfície da placa de 96 poços, foi observada em 3a, 3b e 3h, que se tornou mais evidente na concentração 100  $\mu\text{M}$ . Estas alterações não foram observadas na concentração equivalente de AZT (Vide figura 4a).

### Análises de apoptose

O ensaio de coloração (Anexin-PE) foi realizado para caracterizar a indução da apoptose com as concentrações de 50  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  de 3a, 3b e 3h em células 5637. Anexin V se ligou as células que expressaram fosfatidilserina na camada externa da membrana celular, caracterizando células iniciando o processo de apoptose.

Os resultados (figuras em anexo) indicam que AZT induz porcentagem similares de apoptose em ambas as concentrações, quando comparados com os grupos controles. No entanto, 3a, 3b e 3h mostraram alta porcentagem de células coradas com anexin V (apoptose precoce e tardia) 90.74, 89.60 e 92.80%, respectivamente, quando tratadas com 100  $\mu\text{M}$ . Além disso, 3h foi capaz de induzir alta porcentagem de apoptose também na concentração de 50  $\mu\text{M}$  (71.12%). Isso demonstra o potencial desses componentes para induzir a apoptose em células de 5637.

### Expressão de gene - Expressão gênica por qPCR

Nós investigamos a expressão do gene do Bcl-2 (anti-apoptótico) e Bax (pró-apoptótico). Os níveis de mRNA para Bcl-2 foram significativamente menores nas células expostas aos compostos AZT, 3h, 3b, 3a com 100  $\mu\text{M}$  em comparação com os níveis nas células do controle (Figura 5b). Além disso, os níveis de mRNA para Bax foram significativamente maiores nestes mesmos

grupos, exceto para AZT que os níveis de mRNA para Bax não diferiram dos controles (Figura 5a). O nível de mRNA para Bax foi significativamente maior que os níveis de Bcl-2 para os compostos 3b e 3a na concentração de 100  $\mu$ M, quando comparados aos controles, assim os níveis de mRNA para Bcl-2 foram significativamente maiores do que mRNA para Bax, mostrando que a relação de Bax: Bcl-2 foi afetada por esses compostos (Figura 5e). Também foi investigada a expressão de mRNA para os genes caspase-9 e survivin. Os compostos 3b e 3a em 100  $\mu$ M induziram um aumento significativo dos níveis de mRNA para Caspase - 9 em comparação aos controles (Figura 5c), enquanto os compostos 3a, 3b e 3h induziram uma decréscimo significativo na expressão do gene Survivin em comparação aos controles (Figura 5d). Diversos genes estão envolvidos na regulação da apoptose. Bcl-2 é um regulador anti-apoptótico, enquanto Bax é um regulador pró-apoptótico. O equilíbrio na expressão entre a Bcl-2 e Bax desempenha um papel importante na manutenção da morfologia e funcionamento celular. Vários estudos têm demonstrado que a superexpressão de Bcl-2 pode perturbar regulação das proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak. Além disso, um aumento na expressão Bcl-2 impede a ativação da liberação do citocromo c pela mitocôndria, inibindo assim a ativação das caspases, como caspase-9 e caspase-3, e prevenindo a apoptose. Outros estudos têm demonstrado que a Bcl-2 pode atuar como canal protéico na membrana mitocondrial. Assim, as células estão ativas quando Bcl-2 é abundante e morrem se Bax é superexpresso. No presente estudo, descobrimos que a expressão de Bcl-2 foi down-regulada pelos compostos de 3h, 3b, 3a, enquanto a expressão Bax foi up-regulada. Nossos resultados sugerem que Bax e Bcl-2 estão envolvidas na mediação dos efeitos da apoptose associados com os compostos (3h, 3b, 3a) em células 5637. Caspases desempenham um papel central na apoptose, uma rota bem definida de morte celular programada. Acredita-se que a ativação da caspase-9 é resultado da liberação de citocromo c pela mitocôndria para o citoplasma e sua associação posterior com a proteína Apaf-1. O conjunto do citocromo c, Apaf-1 e procaspase-9, chamado apoptossomo, desencadeia a ativação da caspase-

9. Assim, os níveis de mRNA para caspase 9 foram significativamente maiores com os compostos (3a, 3b, 3h), mostrando que a caspase - 9 está envolvida na mediação de efeitos apoptóticos associados com estes compostos. Em células 5637, os compostos (3a, 3b, 3h) também modulam a expressão do gene anti-apoptótico, survivin, que os níveis de mRNA são down- regulado quando as células tumorais foram tratadas com os compostos (3a, 3b, 3h). Os dados de expressão gênica confirmam os resultados MTT o de citometria de fluxo, onde os compostos (3a, 3b, 3h) são mais eficientes para levar as células tumorais a apoptose do que o AZT.

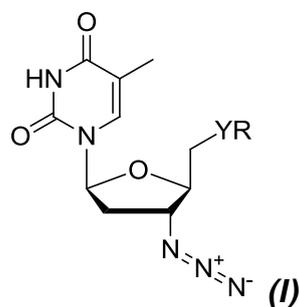
Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo, sem limitar o escopo da mesma.

Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidos no escopo das reivindicações anexadas.

### Reivindicações

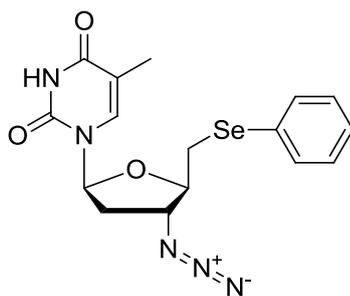
CALCOGENO-NUCLEOSÍDEOS, USO DE CALCOGENO-NUCLEOSÍDEOS COM AÇÃO ANTIOXIDANTE/ANTITUMORAL, COMPOSIÇÃO E PROCESSO DE SÍNTESE DE CALCOGENO-NUCLEOSÍDEOS.

1. *Os calcogeno-nucleosídeos (5'- arilcalcogeno azidotimidina) são caracterizados por compreenderem a fórmula geral I:*

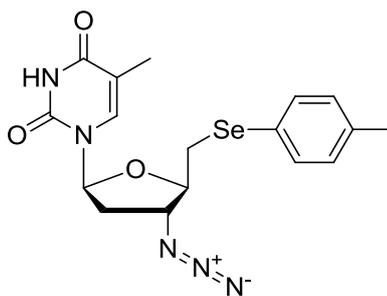


onde R representa pelo menos um grupamento arila e Y representa pelo menos um átomo de selênio, enxofre e/ou telúrio.

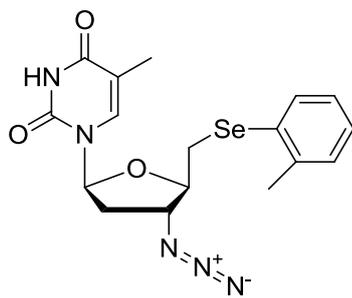
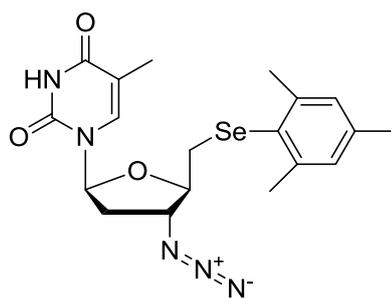
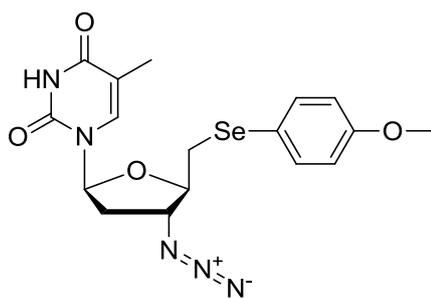
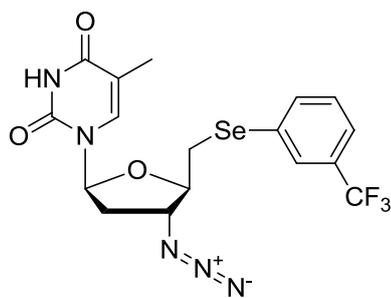
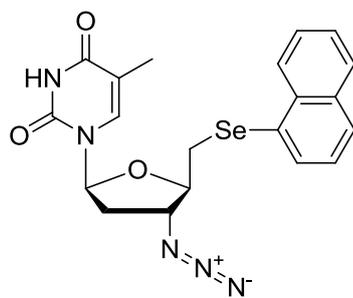
Os 5'- arilcalcogeno azidotimidina, de acordo com a reivindicação 1, são caracterizados por serem escolhidos do grupo que compreende:

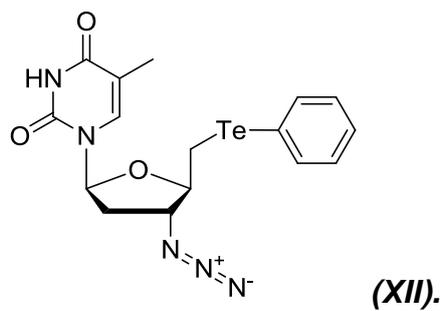
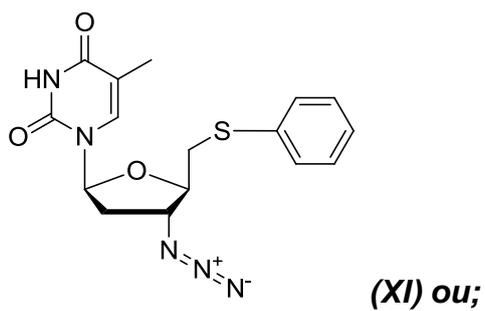
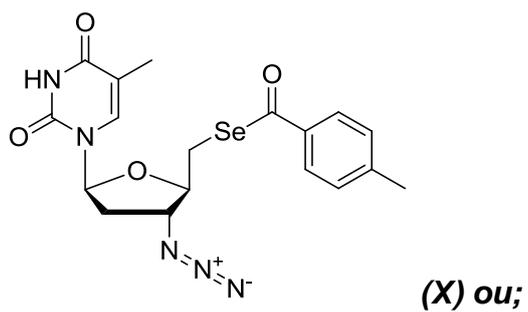
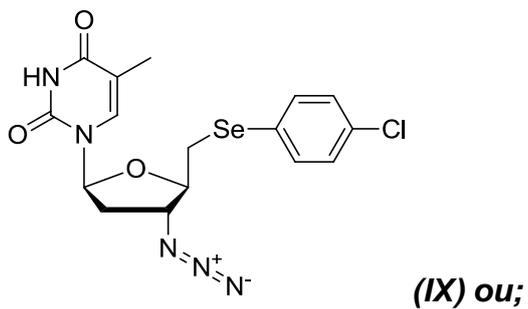


(II) ou;

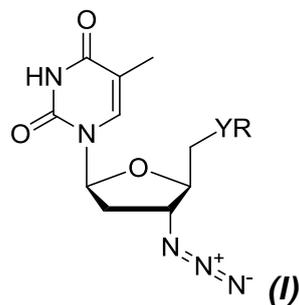


(III) ou;

**(IV) ou;****(V) ou;****(VI) ou;****(VII) ou;****(VIII) ou;**

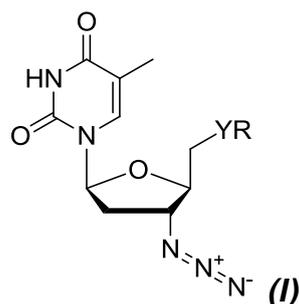


2. **Uso dos 5'- arilcalcogeno azidotimidina são caracterizados pelo calcogeno-nucleosídeos compreendido na fórmula geral I:**



onde *R* representa pelo menos um grupamento arila e *Y* representa pelo menos um átomo de selênio, enxofre e/ou telúrio; para ser utilizado na obtenção de uma droga com perfil antioxidante.

3. *Uso dos 5'- arilcalcogeno azidotimidina são caracterizados pelo calcogeno-nucleosídeos compreendido na fórmula geral I:*



onde *R* representa pelo menos um grupamento arila e *Y* representa pelo menos um átomo de selênio, enxofre e/ou telúrio; para ser utilizado na obtenção de uma droga com perfil antitumoral.

4. Processo de síntese dos 5'- arilcalcogeno azidotimidina, é **caracterizado**, adicionalmente, por compreender pelo menos uma das etapas a seguir:

- a) *realizar uma interconversão de grupo funcional, a partir do AZT, transformando o grupamento hidroxila em um bom grupo abandonador; e*
- b) *substituir o grupo abandonador por calcogênio empregando*

***diferentes dicalcogenetos arílicos.***

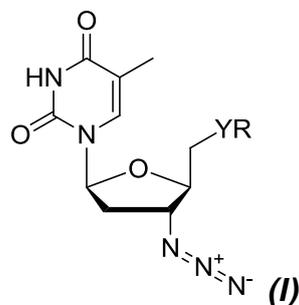
***Em uma concretização preferencial, o referido processo síntese, adicionalmente, compreende pelo menos uma das etapas a seguir:***

- a) Solubilizar AZT em THF seco, sob atmosfera de Argônio;
- b) Resfriar o sistema e adicionar  $\text{Et}_3\text{N}$ , seguido de agitação da mistura;
- c) Adicionar cloreto de mesila, seguido de agitação da mistura;
- d) Extrair a reação com uma solução de  $\text{NaHCO}_3$ ;
- e) Extrair a fase orgânica com diclorometano;
- f) Combinar as fases orgânicas e secá-las com  $\text{MgSO}_4$ ;
- g) Evaporar o solvente por pressão;
- h) Cristalizar o produto em acetato de etila, e secar em bomba de alto vácuo;
- i) Adicionar o dicalcogeneto em um tubo de Schlenk, sob atmosfera inerte de argônio, em DMSO seco;
- j) Adicionar KOH, seguido de agitação da mistura, durante 5 minutos;
- k) Após esse período adicionar ao sistema reacional uma solução do mesilato do AZT, solubilizado em DMSO seco;
- l) Aumentar a temperatura da reação até  $80^\circ\text{C}$ ;
- m) Acompanhar por placas cromatográficas, a fim de verificar o consumo do mesilato e a formação do produto;
- n) Destilar o DMSO sob pressão reduzida e solubilizar o produto em diclorometano e etanol;
- o) Purificar o produto em coluna cromatográfica em gel de sílica, utilizando como eluente diclorometano, diclorometano/etanol (9:1).

## Resumo

### CALCOGENO-NUCLEOSÍDEOS, USO DE CALCOGENO-NUCLEOSÍDEOS COM AÇÃO ANTIOXIDANTE/ANTITUMORAL, COMPOSIÇÃO E PROCESSO DE SÍNTESE DE CALCOGENO-NUCLEOSÍDEOS.

A presente invenção faz referência a uma série de calcogeno-nucleosídeos derivados do AZT (5'- arilcalcogeno azidotimidina), contendo átomos pertencentes à família dos calcogênios em sua estrutura, compreendendo uma fórmula geral



*onde R representa pelo menos um grupamento arila e Y representa pelo menos um átomo selênio, enxofre e/ou telúrio. A presente invenção faz referência, ainda, à uma droga com potencial farmacêutico compreendendo os 5'- arilcalcogeno azidotimidina de acordo com a fórmula geral I, além do uso do na obtenção de um fármaco com ação antioxidante e/ou antitumoral e o processo de síntese do referido 5'- arilcalcogeno azidotimidina, da fórmula geral I. A presente invenção se situa no campo da medicina, química e biologia.*

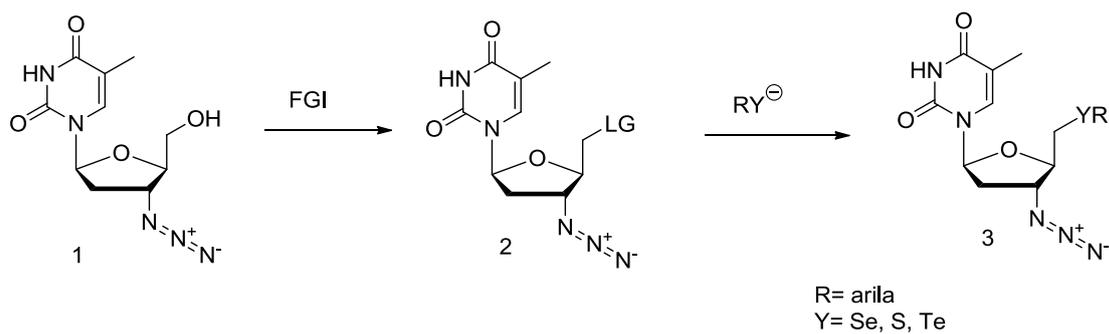
**FIGURAS**

Figura 1

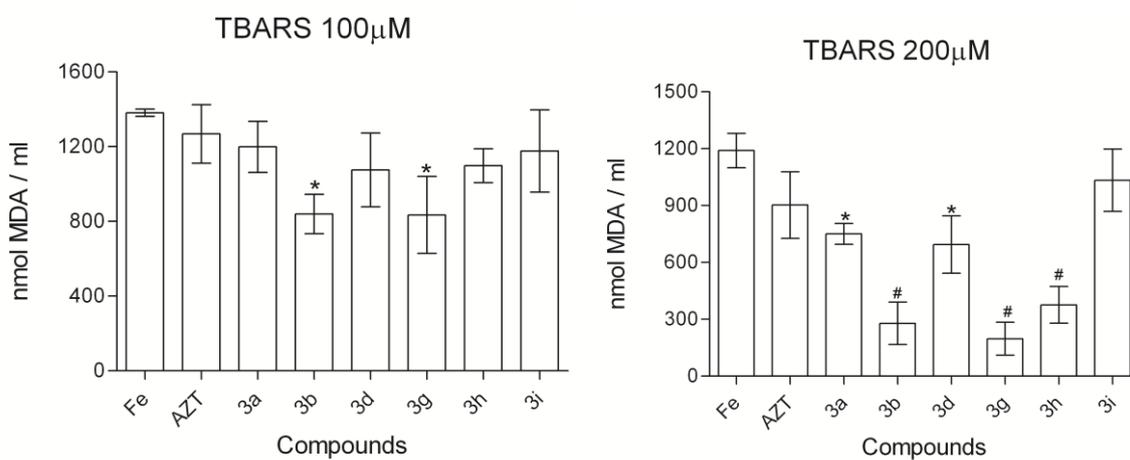


Figura 2

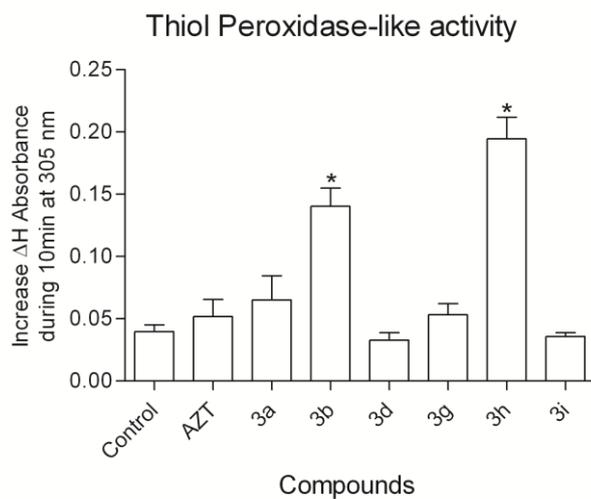


Figura 3

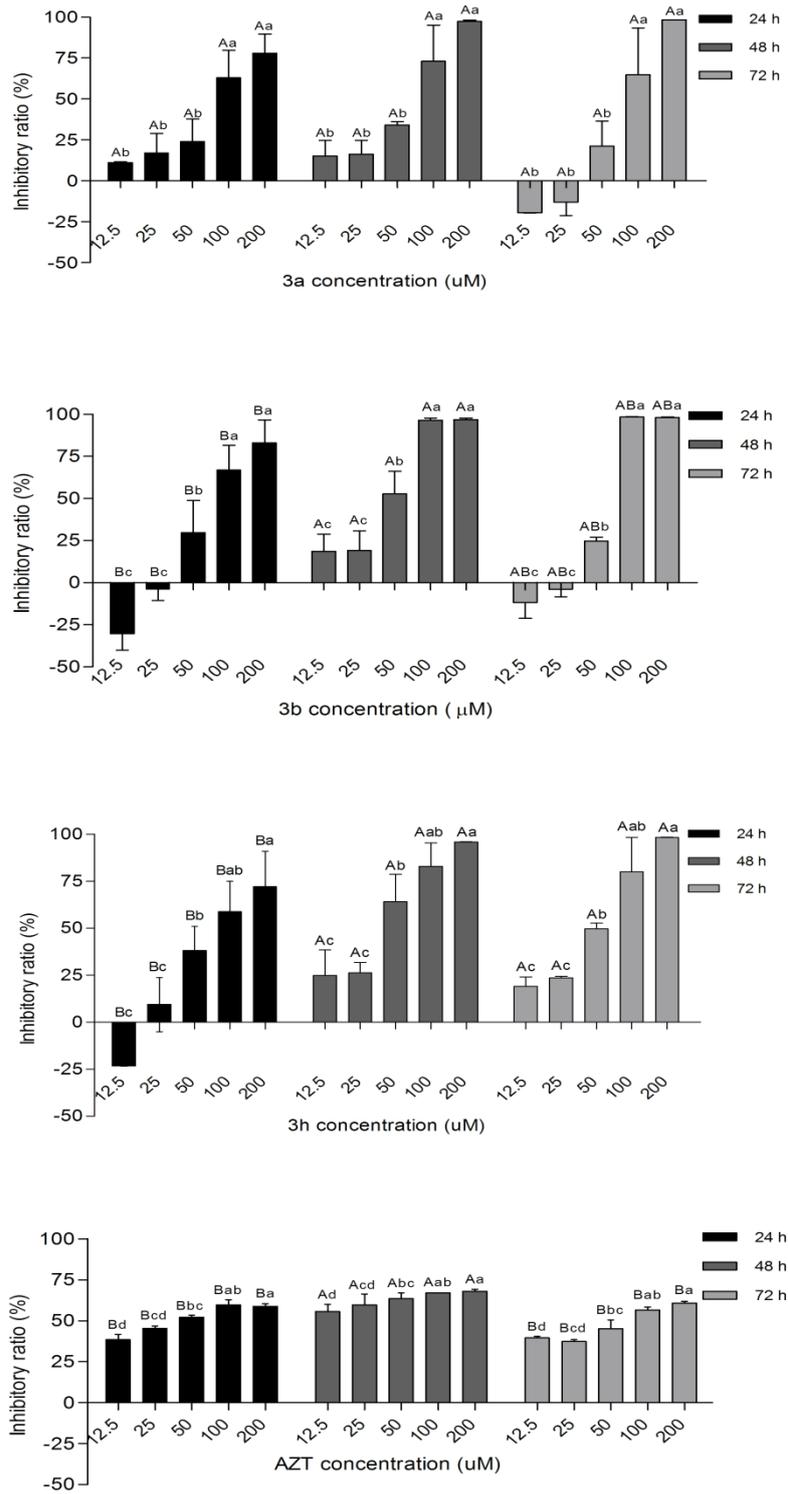


Figure 4a

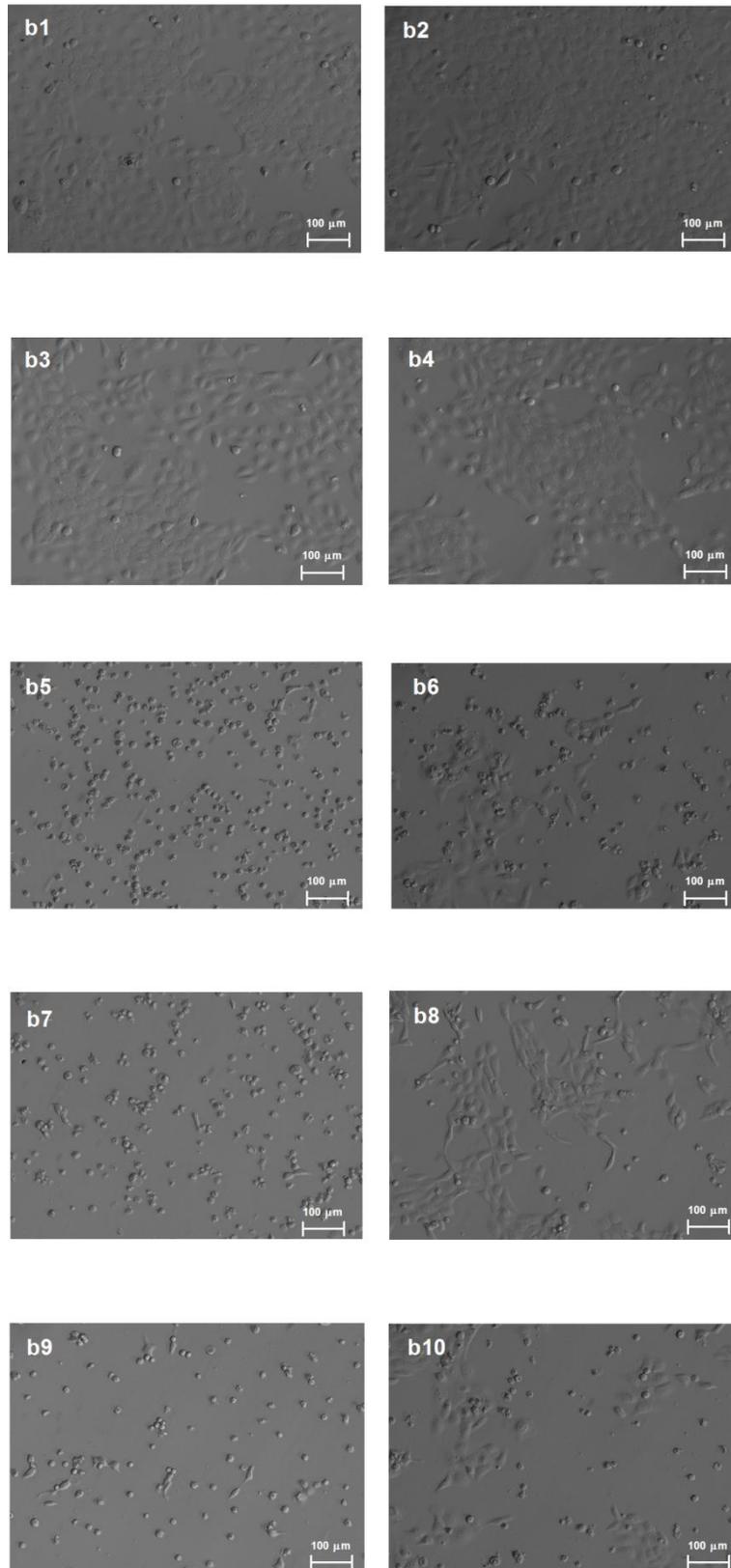


Figura 4b

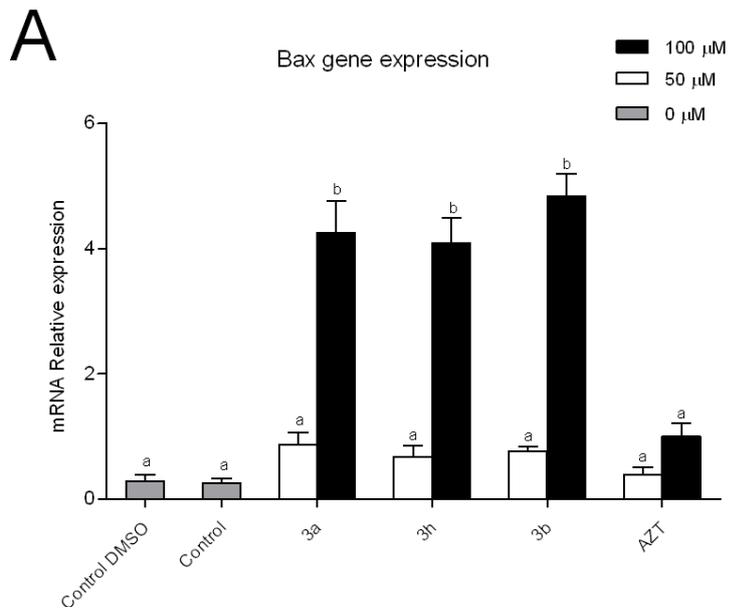


Figura 5a

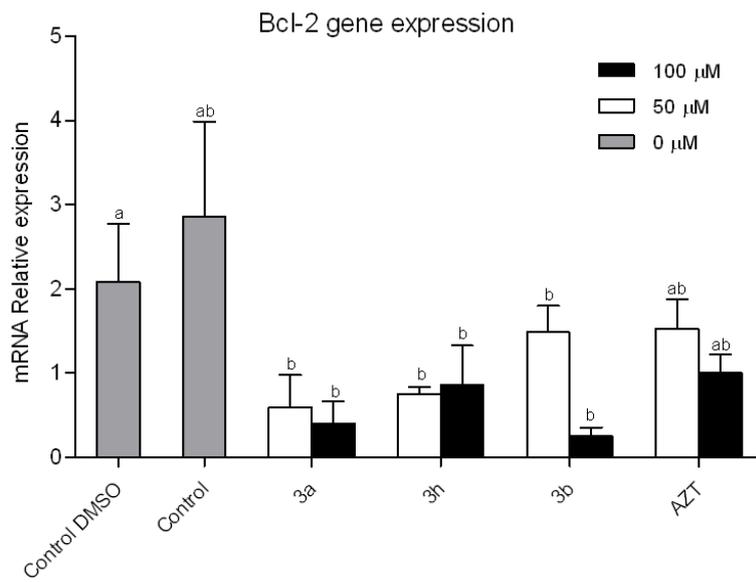


Figura 5b

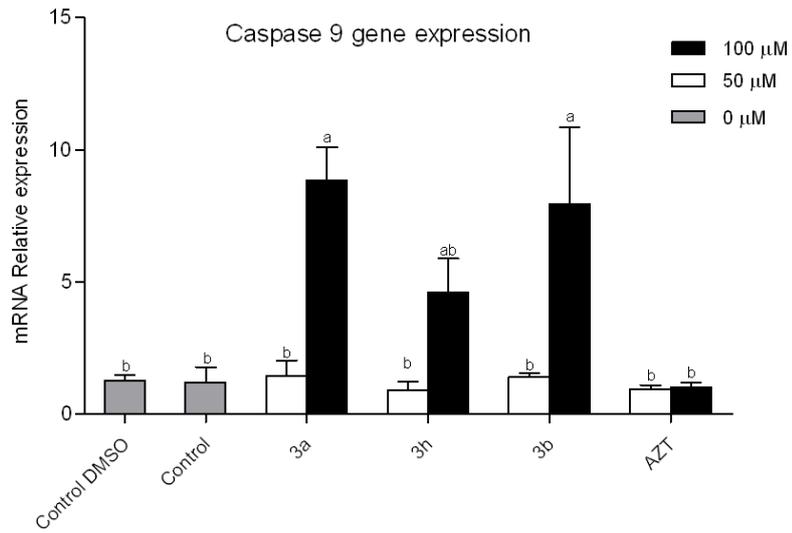


Figura 5c

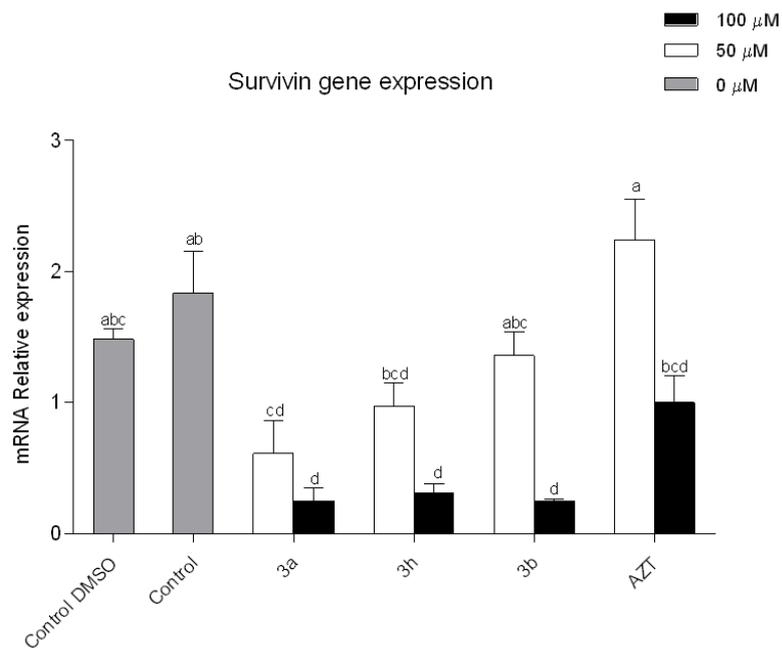


Figura 5d

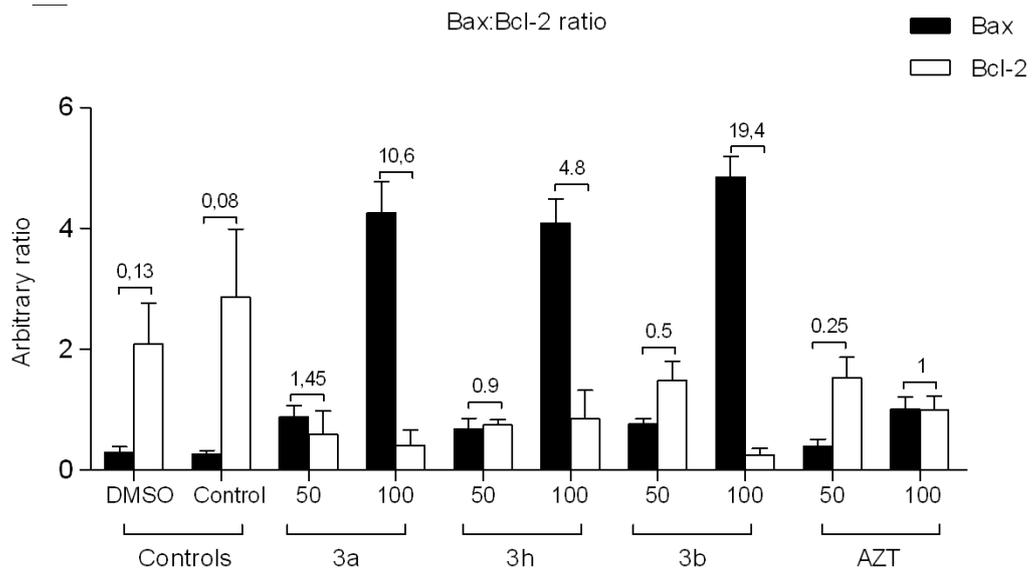


Figura 5e

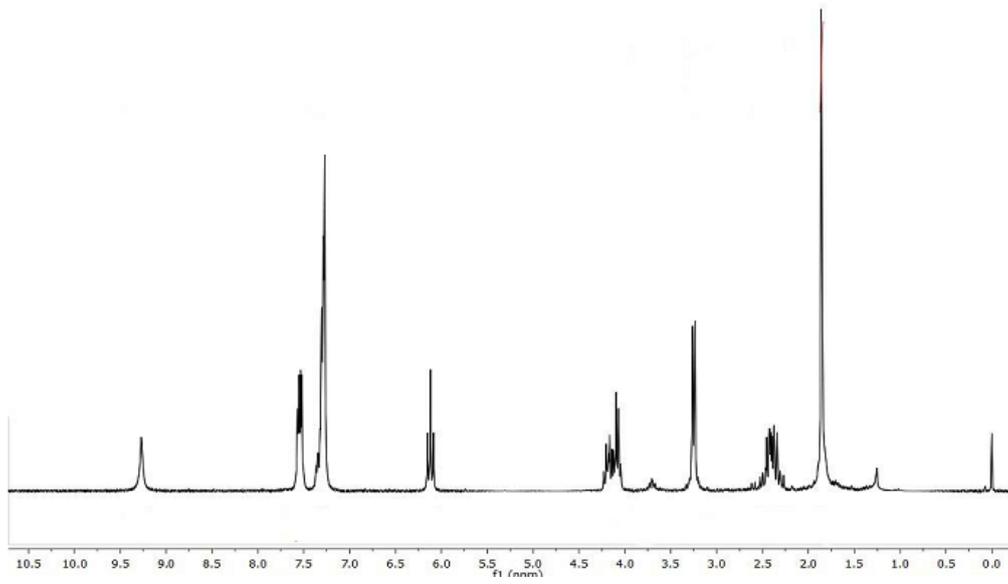


Figura 6a

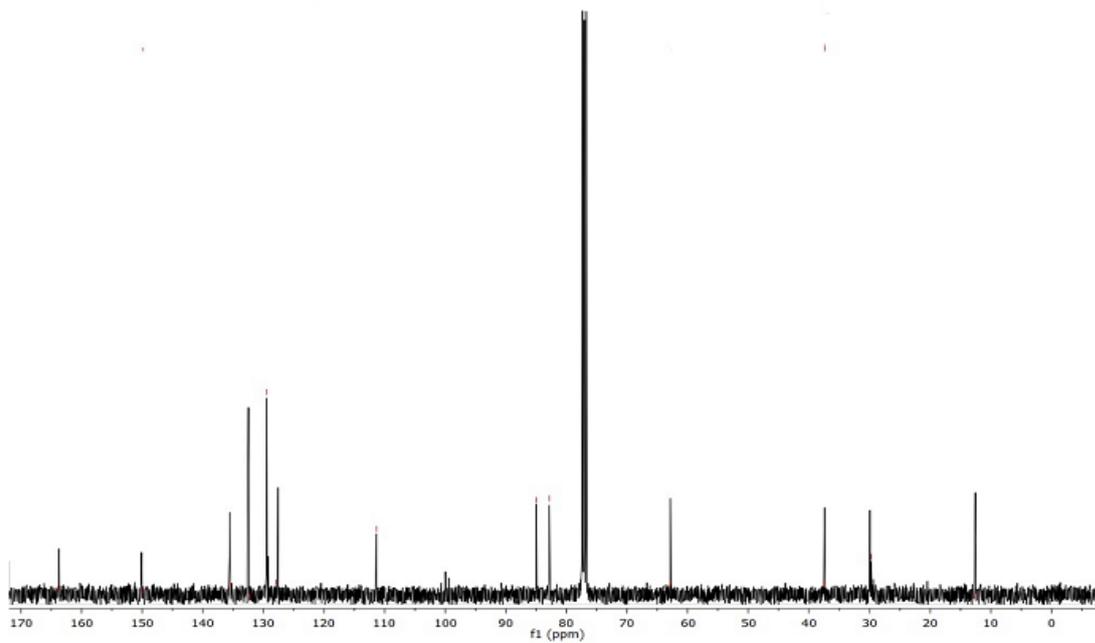


Figura 6b

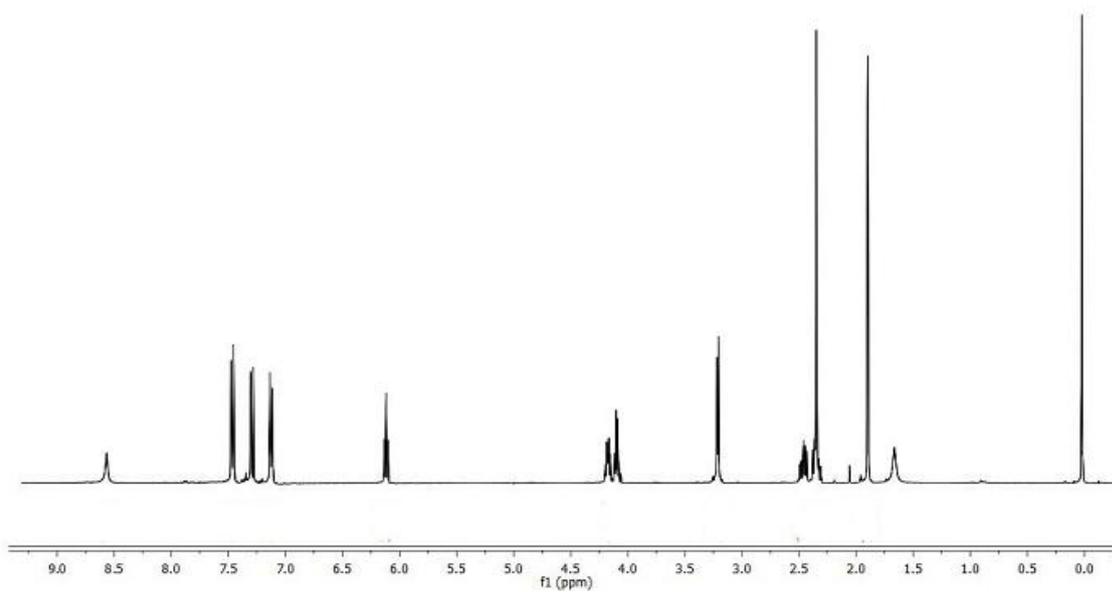


Figura 7a

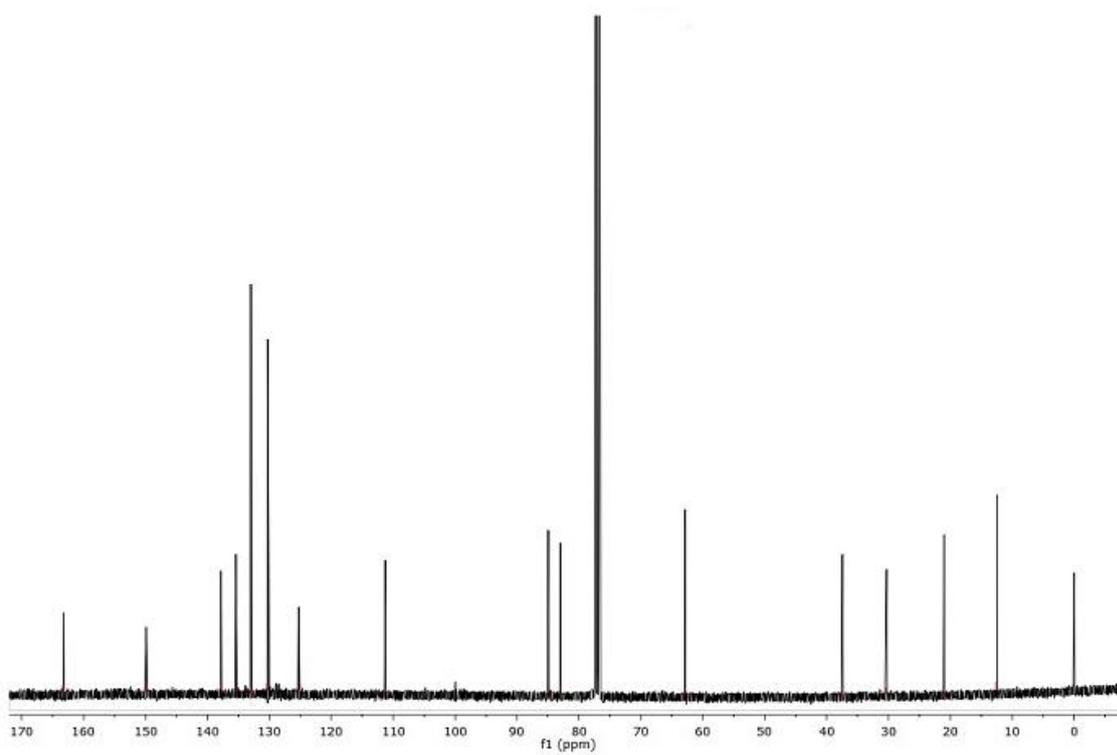


Figura 7b

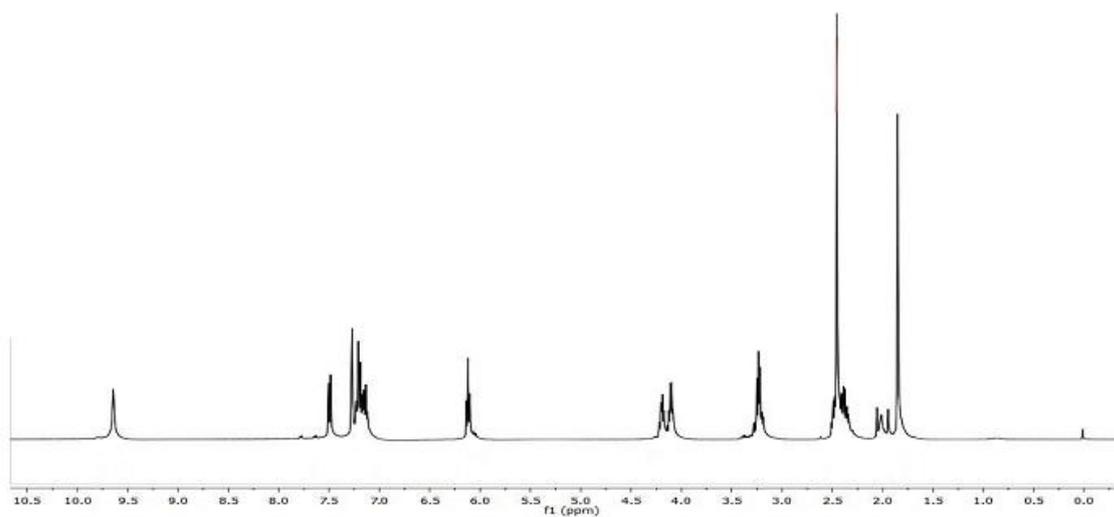


Figura 8a

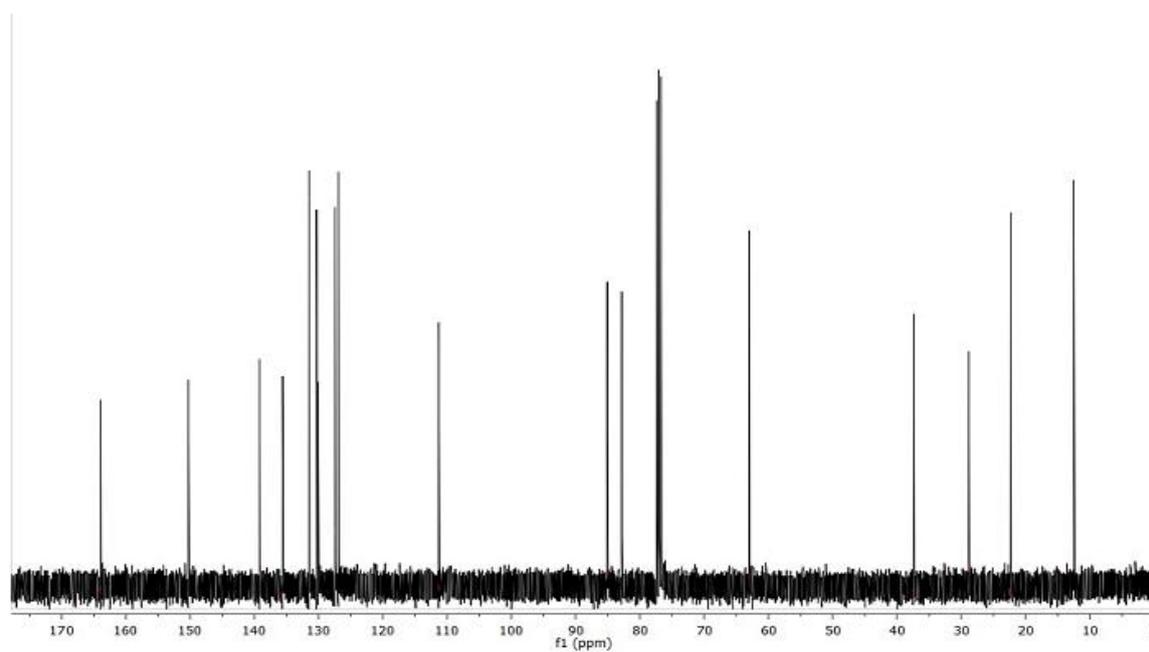


Figura 8b

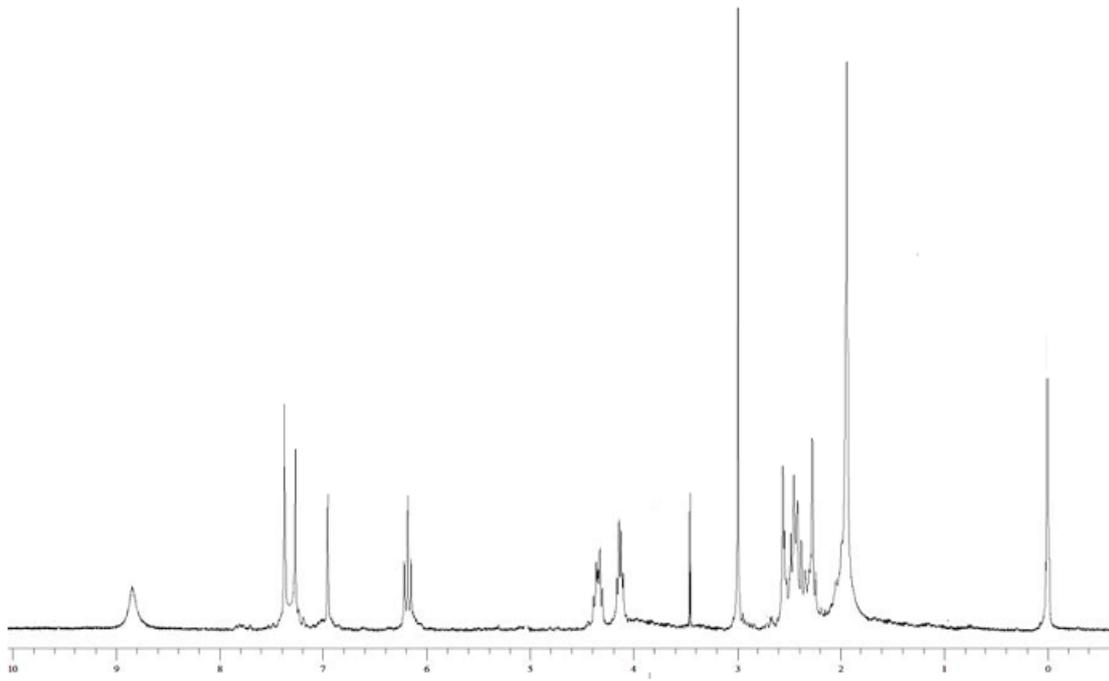


Figura 9a

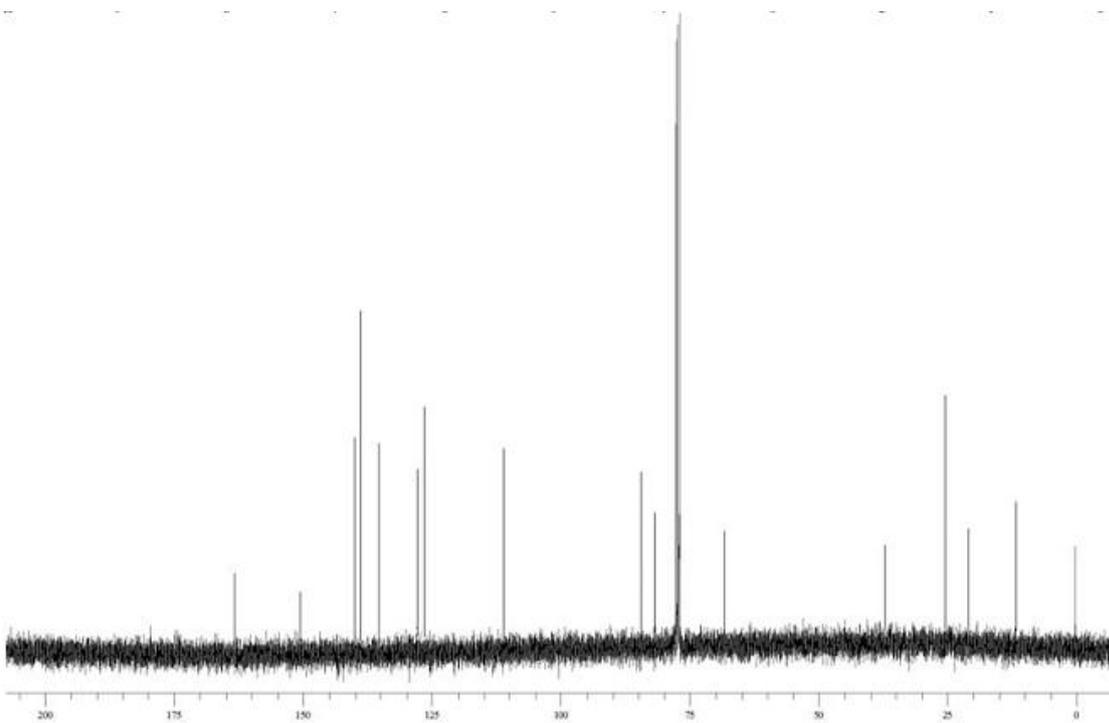


Figura 9b

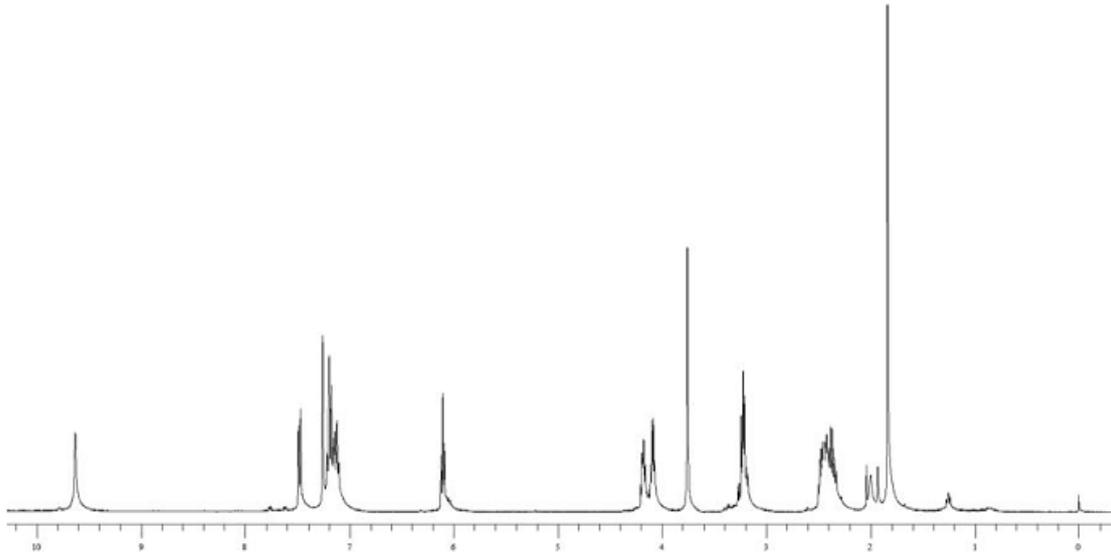


Figura 10a

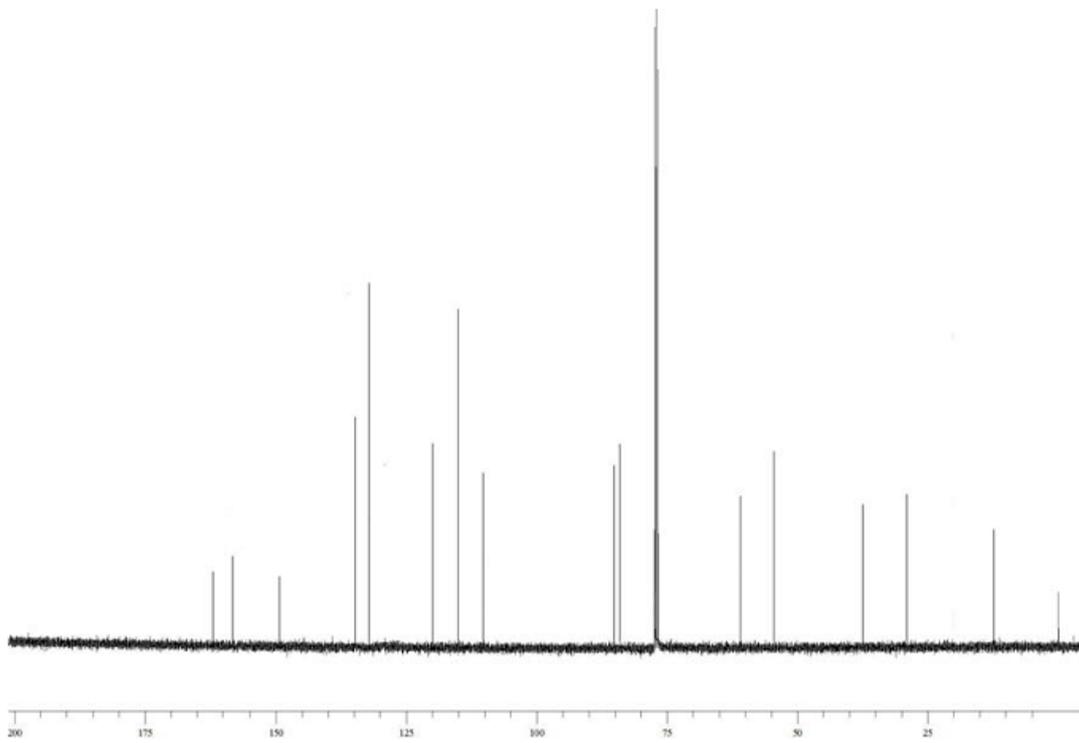


Figura 10b

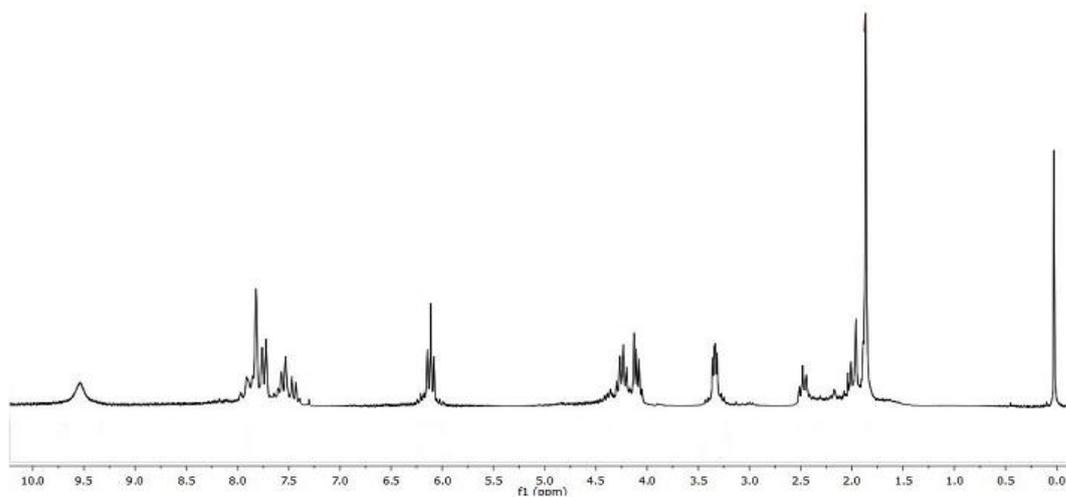


Figura 11a

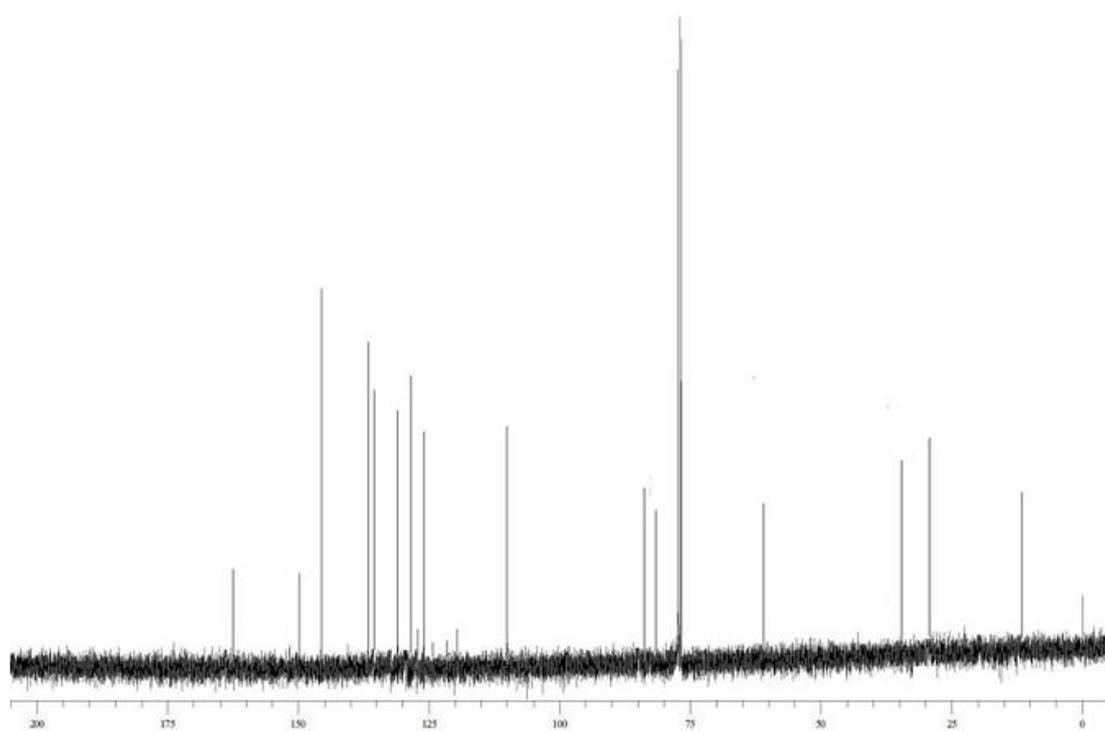


Figura 11b

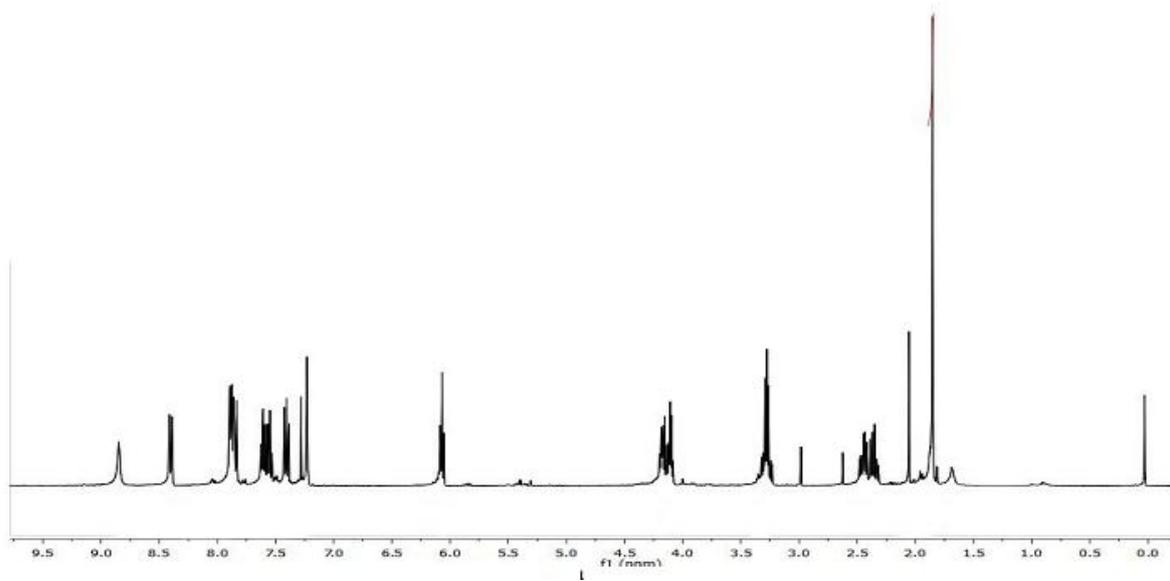


Figura 12a

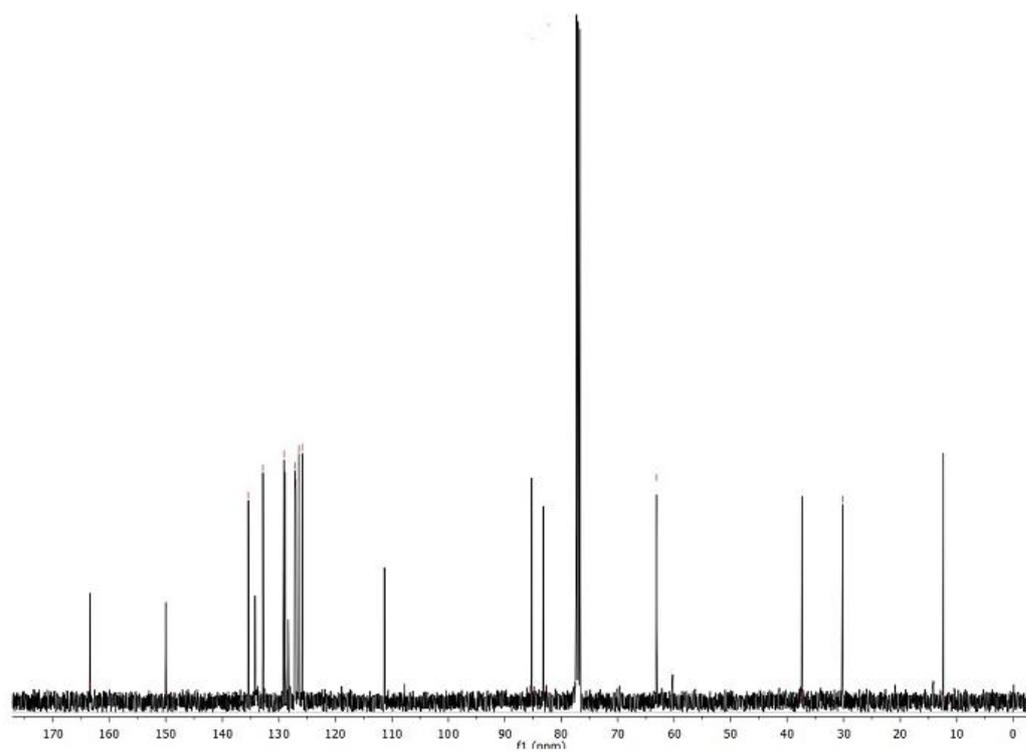


Figura 12b

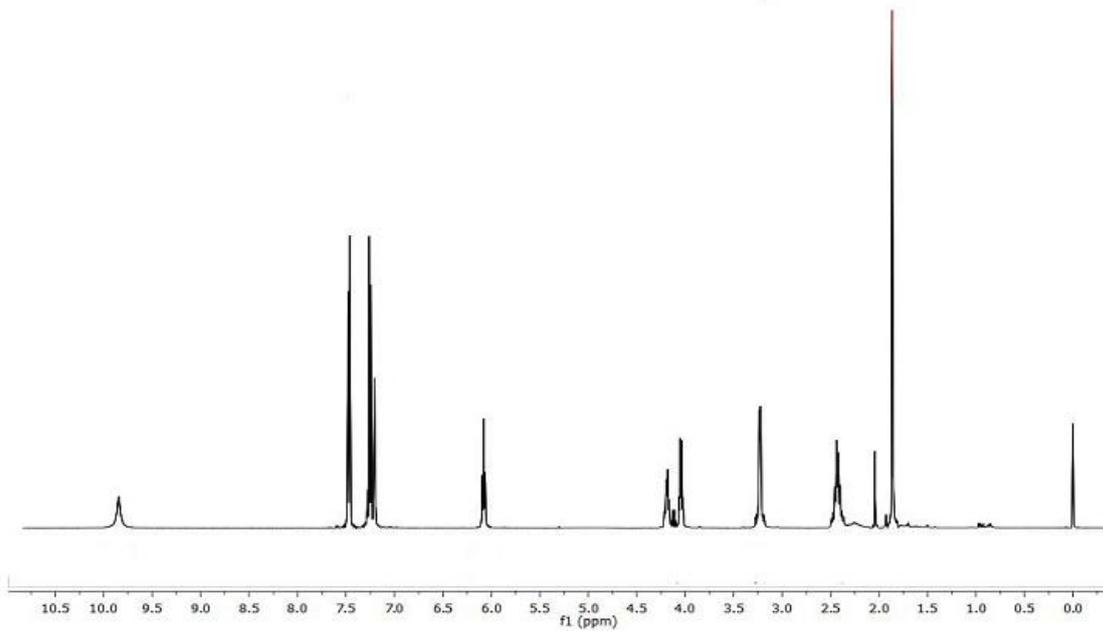


Figura 13a

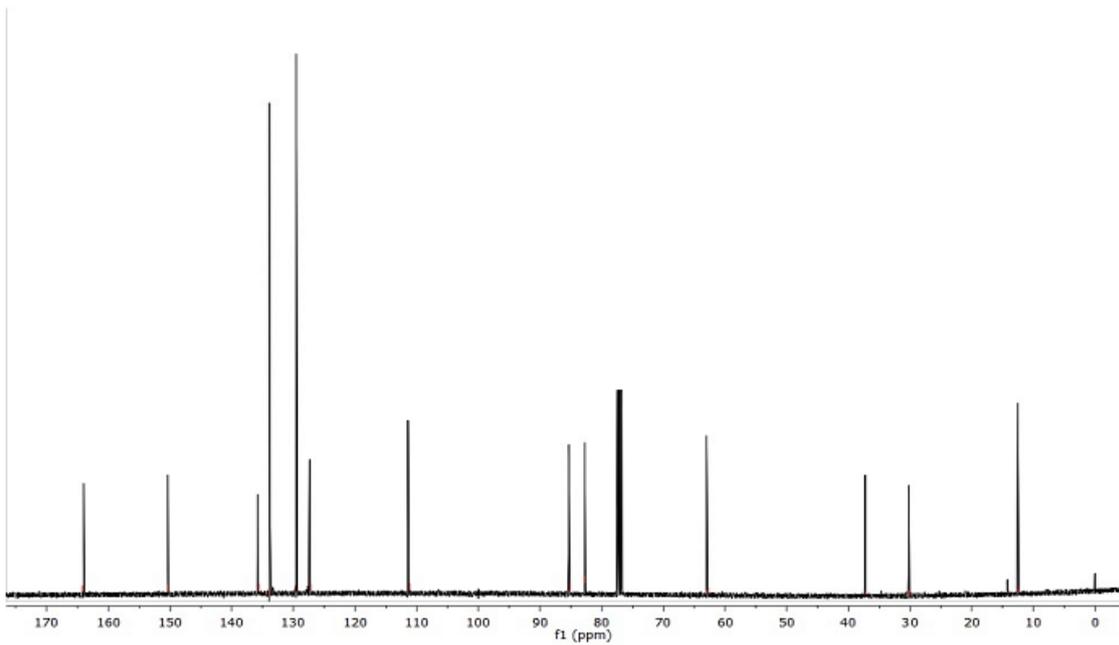


Figura 13b

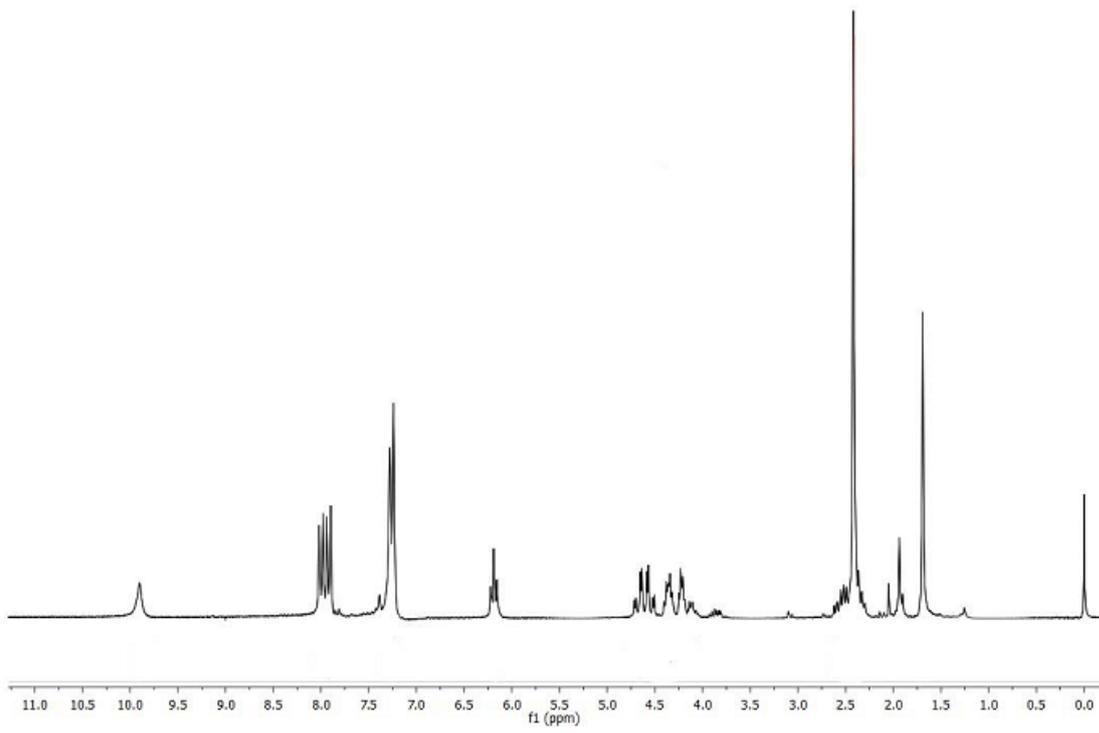


Figura 14a

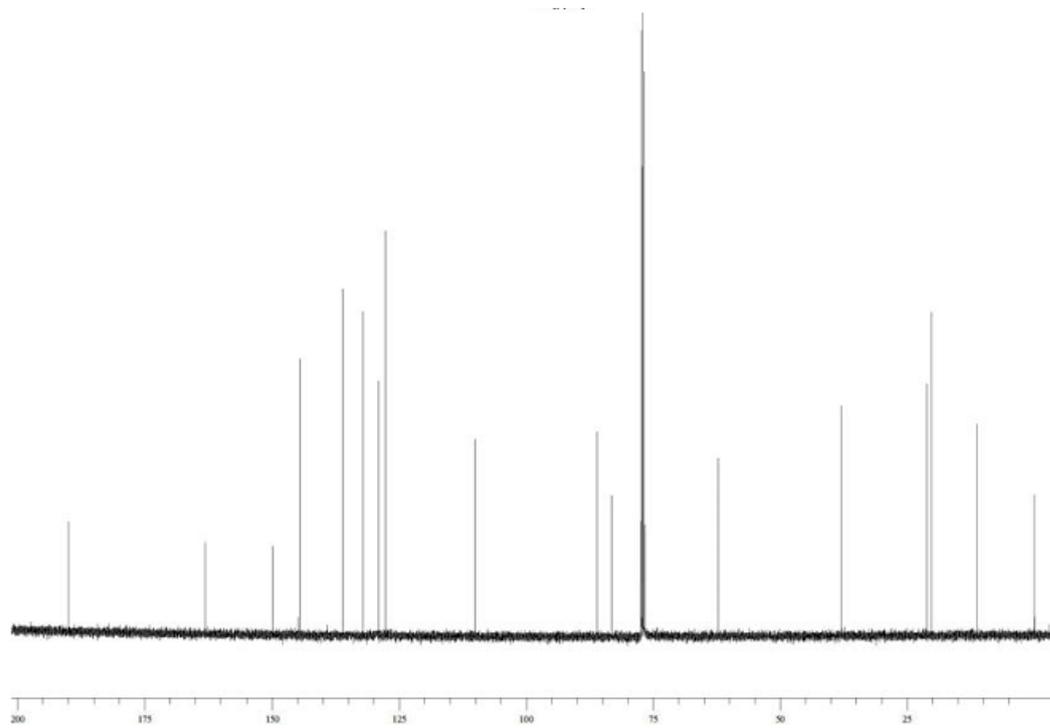


Figura 14b

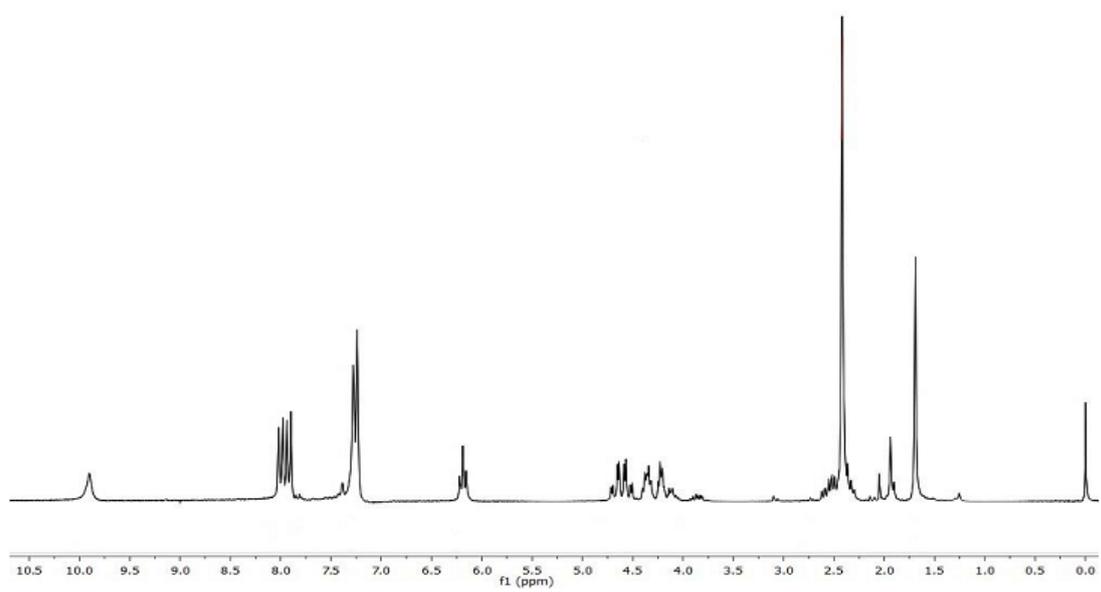


Figura 15a

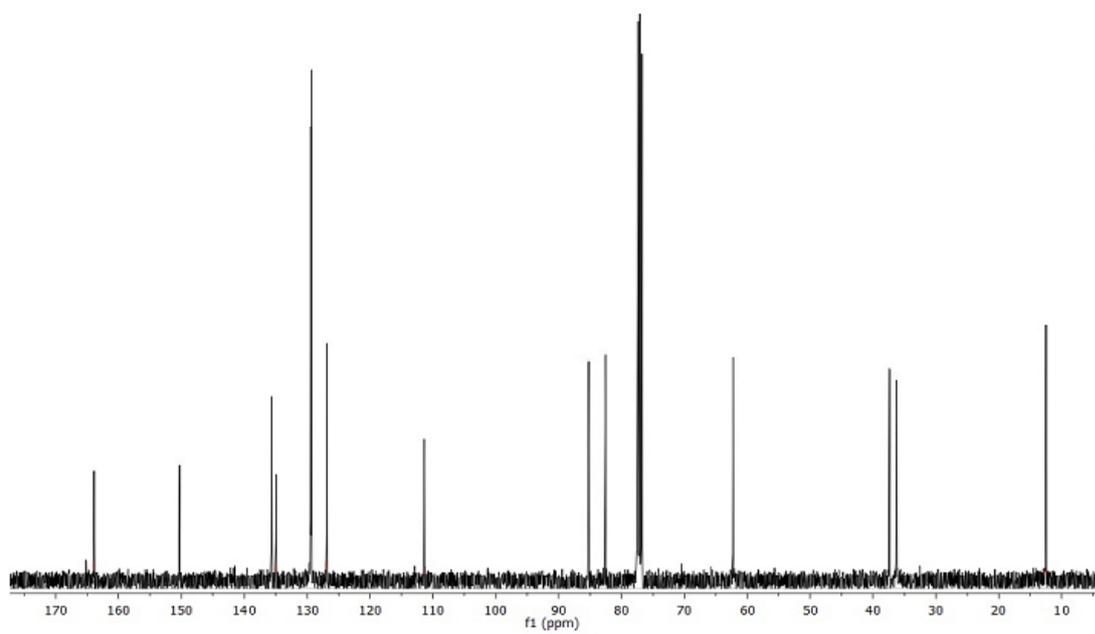


Figura 15b

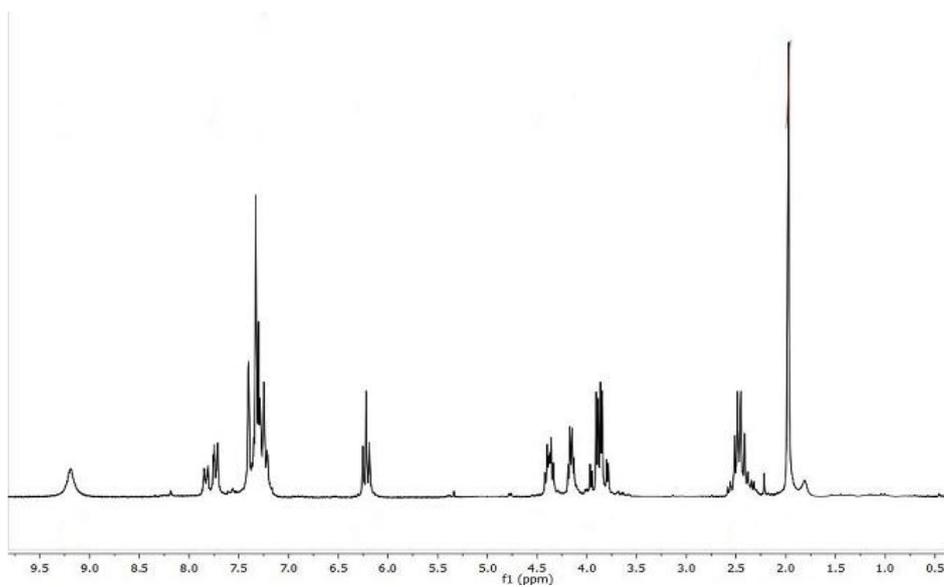


Figura 16a

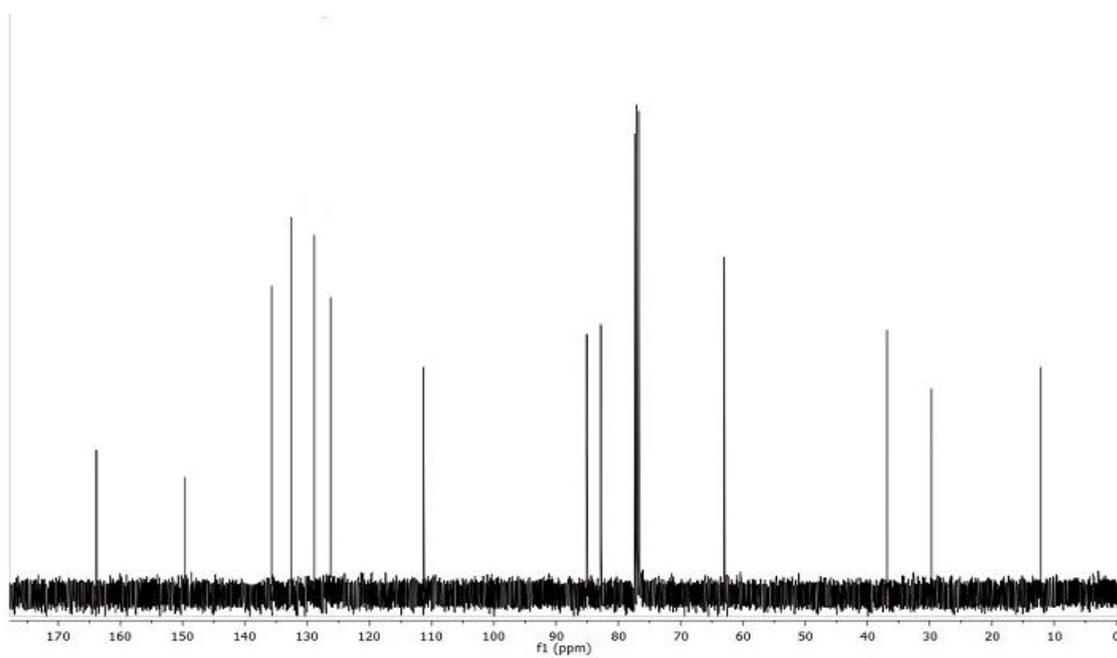


Figura 16b

## **Anexos**

### **CALCOGENO-NUCLEOSÍDEOS, USO DE CALCOGENO-NUCLEOSÍDEOS COM AÇÃO ANTIOXIDANTE/ANTITUMORAL, COMPOSIÇÃO E PROCESSO DE SÍNTESE DE CALCOGENO-NUCLEOSÍDEOS.**

#### **Breve Descrição dos Anexos**

As figuras em anexo mostram uma análise do Anexina V-PE de células 5637 tratadas com 50 e 100  $\mu\text{M}$  de AZT, 3a, 3b e 3h em 48 h, onde:

Anexo 1 faz referência ao controle com meio/FBS (A);

Anexo 2 faz referência ao controle DMSO (B);

Anexo 3 faz referência ao AZT 100  $\mu\text{M}$  (C);

Anexo 4 faz referência ao AZT 50  $\mu\text{M}$  (D);

Anexo 5 faz referência ao 3a 100  $\mu\text{M}$  (E);

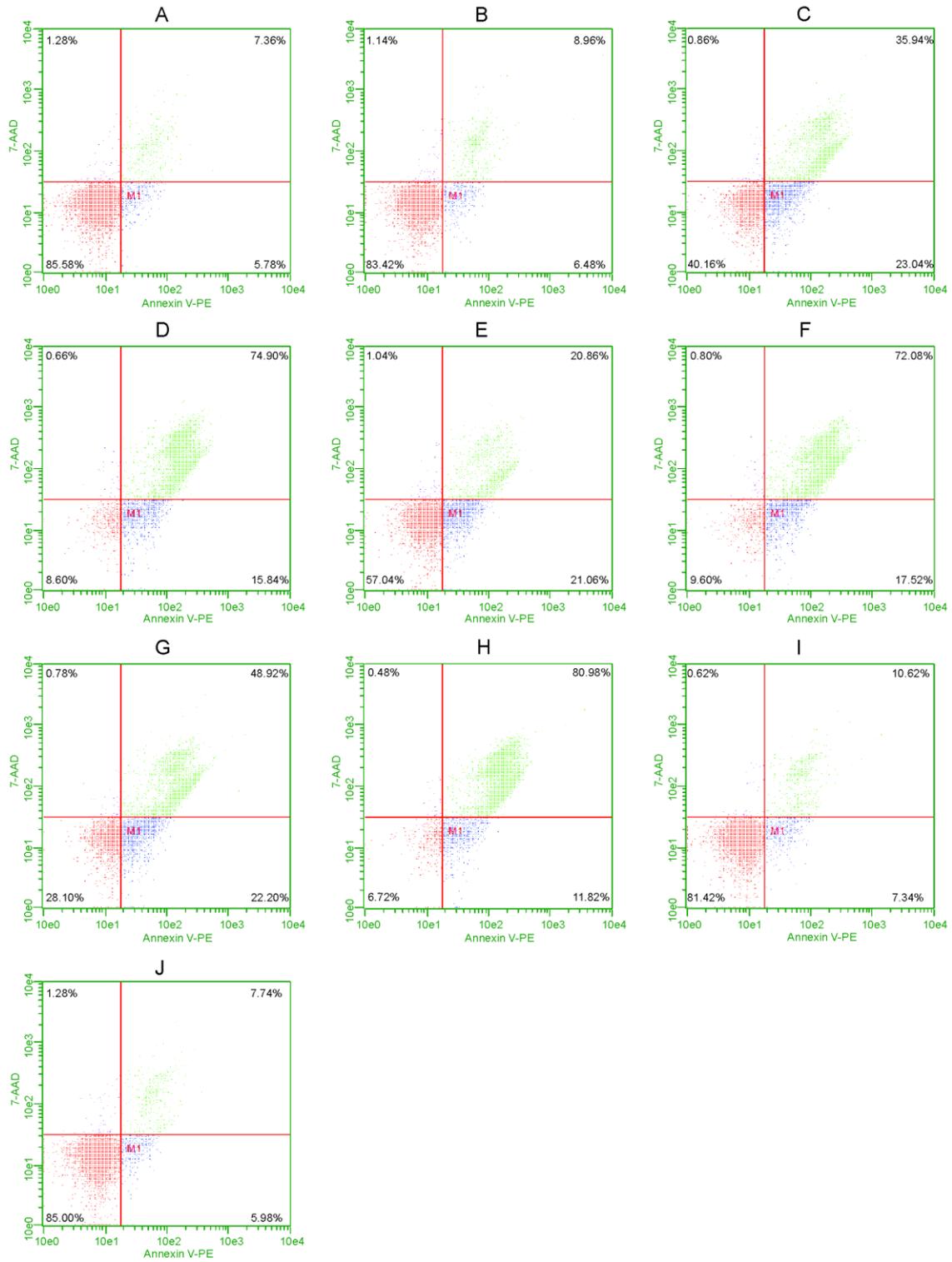
Anexo 6 faz referência ao 3a 50  $\mu\text{M}$  (F);

Anexo 7 faz referência ao 3b 100  $\mu\text{M}$  (G);

Anexo 8 faz referência ao 3b 50  $\mu\text{M}$  (H);

Anexo 9 faz referência ao 3h  $\mu\text{M}$  100 (I); e

Anexo 10 faz referência ao 3h 50  $\mu\text{M}$  (J).



## 5. DISCUSSÃO

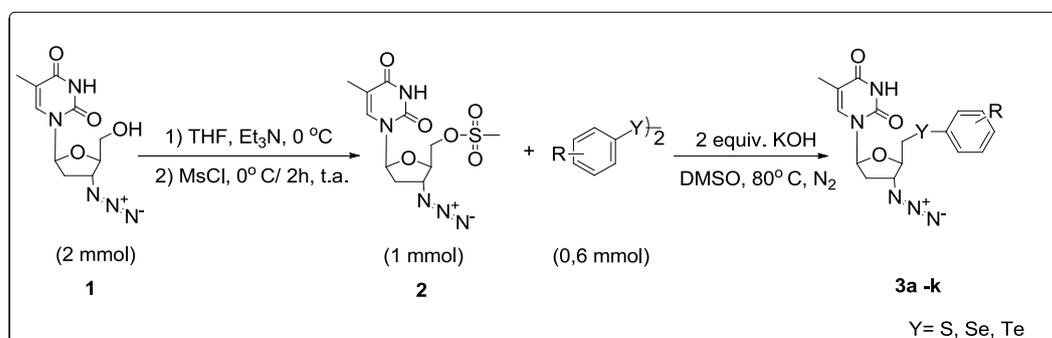
Nos últimos anos, um grande número de análogos de nucleosídeos com atividade anticâncer foram planejados e sintetizados. Aparentemente, esse fato se deve a uma necessidade na busca de análogos que sejam capazes de inibir seletivamente a proliferação de células cancerosas. No entanto, as drogas antitumorais nucleosídicas são comumente associadas a vários efeitos adversos, além de ainda não terem seus mecanismos de ação bem descritos (Sarmah et. al., 2010).

Um dos primeiros análogos nucleosídeos, planejados e sintetizados com potencial antitumoral foi a zidovudina ou mais conhecido como AZT. Este composto retornaria mais tarde em 1985, para se tornar o fármaco de primeira escolha ao combate do vírus HIV. Nos últimos anos, diversos trabalhos tem tentado desenvolver pró-drogas a partir do AZT, a fim de explorar seu efeito antitumoral, mas problemas envolvendo a baixa biodisponibilidade, instabilidade gástrica e diminuição na seletividade limitam suas aplicações. Outros trabalhos fazem ressalvas a combinações medicamentosas, unindo o AZT com outros agentes antitumorais como a cisplatina, 5-fluorouracil, e paclitaxel (Wu et. al., 2007).

Pensando em explorar e potencializar a atividade antitumoral do AZT, foi proposto neste trabalho uma rota sintética simples e conveniente, visando a preparação de um novo bloco de análogos nucleosídeos, utilizando como materiais de partida o AZT e diferentes dicalcogenetos. A proposta sintética tem como base a incorporação de átomos de selênio, enxofre e telúrio substituindo a hidroxila presente na posição 5' da pentose, visto que esta posição apresenta um ponto de ancoragem interessante, tanto do ponto de vista sintético quanto do ponto de vista biológico.

Como pode ser visto no **esquema 19**, inicialmente foi realizada a mesilação da hidroxila presente no carbono 5', a fim de converter o grupamento hidroxila em um melhor grupo de saída naquela posição, possibilitando posteriormente a inserção dos calcogenetos na molécula do AZT. Primeiramente, sob atmosfera inerte, foi adicionada trietilamina em uma solução de AZT em THF, 0° C. Após 10 minutos, ainda a 0° C, gota a gota o

cloreto de mesila, foi acrescentado ao sistema reacional, diluído em THF. A reação foi mantida sob agitação, a temperatura ambiente durante 2h, após esse período, observou-se a formação do respectivo mesilato do AZT **2**, com rendimento superior a 90%. O passo seguinte consistiu na incorporação do respectivo calcogeneto a estrutura do mesilato, utilizando um protocolo previamente otimizado, envolvendo a clivagem dos respectivos dicalcogenetos em meio básico, levando a formação dos derivados calcogeno-AZT. O protocolo proposto foi otimizado através do estudo das diferentes variáveis que poderiam afetar o meio reacional, tais como, solvente e o agente redutor. Dessa forma, verificou-se que as condições mais eficientes a serem utilizadas nesse protocolo seriam o DMSO como solvente e KOH como agente redutor. O principal motivo para a utilização do DMSO como solvente está ligado ao fator solubilidade do mesilato. Para tanto, o KOH torna-se mais conveniente como meio redutor, já que o NaBH<sub>4</sub> e o Zn<sup>0</sup> necessitariam de condições mais favoráveis para sua utilização. Subseqüentemente o procedimento foi estendido para outros disselenetos, dissulfeto e ditelureto, verificando a versatilidade do protocolo proposto. Obtendo rendimentos que variaram de 62-92%.

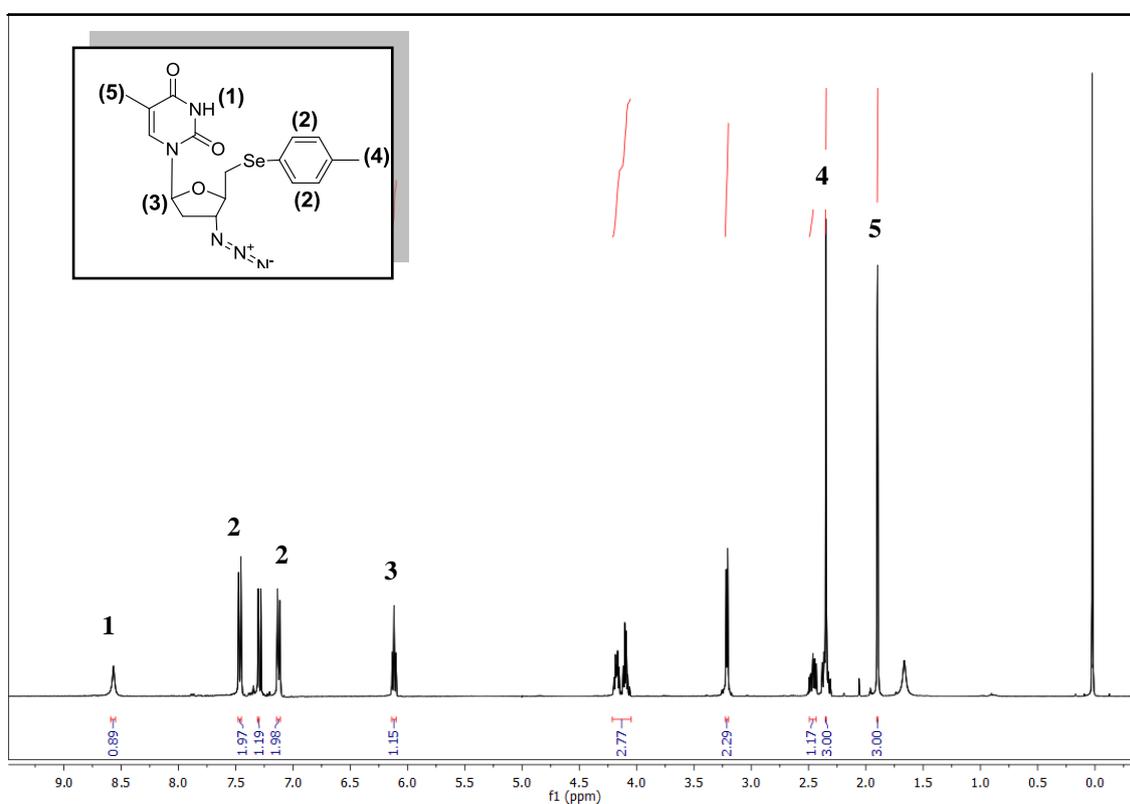


**Esquema 19:** Rota sintética para obtenção dos derivados 5'-calcogeno azidotimidina

A título de exemplo, discutiremos, a atribuição de sinais nos espectros de RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C, para o composto **3b**, como representante dos 5'-arilcalcogeno azidotimidina.

No espectro de RMN <sup>1</sup>H (**Figura 12**), pode ser observado, na região de 8,57 ppm, um singlete, com integral relativa a 1H, característico de hidrogênios ligados a nitrogênio secundário, denominado **H-1**. Nas regiões de 7,46 e 7,13 ppm, temos 2 dubletos, cada um com integral relativa de 2H, e com constante

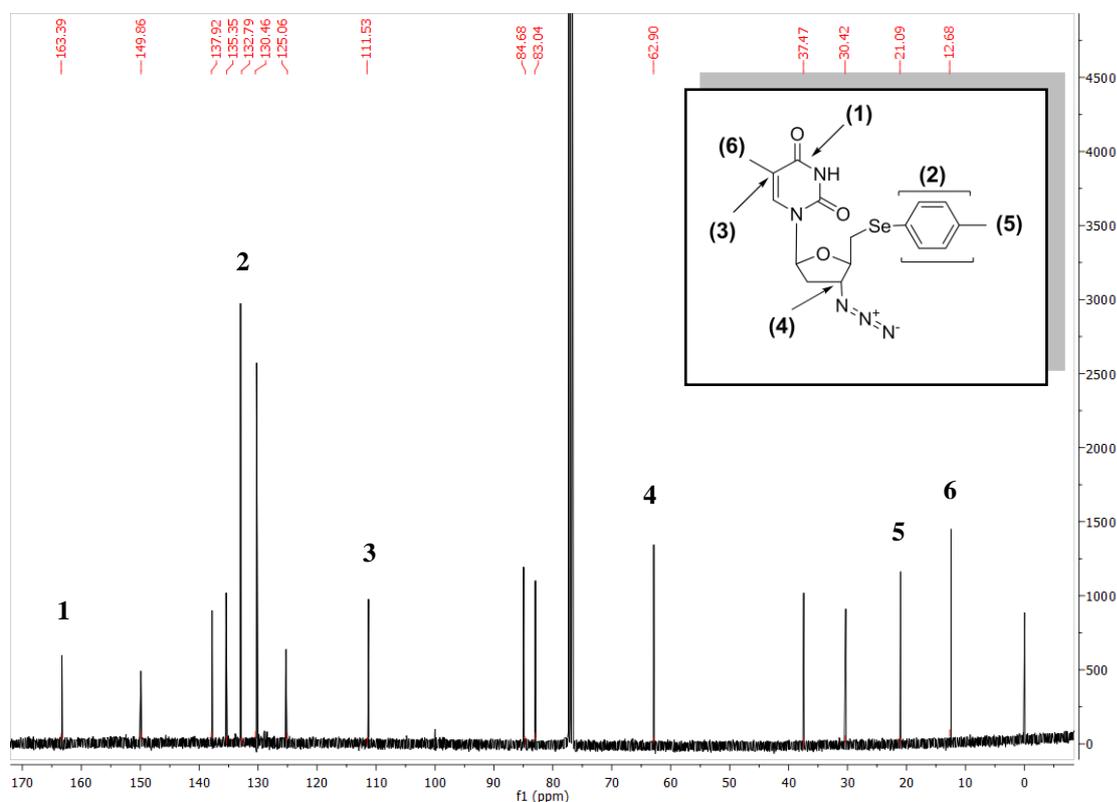
de acoplamento de 8,18 Hz e 7,89 Hz, respectivamente, característicos de hidrogênios aromáticos, denominado **H-2**. Além disso, pode ser observado, em 6,09 ppm um tripleto com integral relativa de 1H, e constante de acoplamento de 6,43 Hz, referente ao hidrogênio da  $\beta$ -N<sub>1</sub>-ligação glicosídica, entre a timina e o anel de desoxirribose, denominado **H-3**. Em 2,35 ppm, verifica-se um singleto, com integral relativa a 3H, correspondente ao hidrogênio da metila ligado ao anel aromático, denominado **H-4**. Em 1,90 ppm, aparece um singleto com integral relativa de 3H, que corresponde aos hidrogênios da outra metila ligada a timina, denominado como **H-5**



**Figura 12:** Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) J(Hz) / 400 MHz

No espectro de RMN <sup>13</sup>C, **figura 13**, pode ser observado, em 163.69 ppm, um sinal referente ao carbono ligado a carbonila denominada **C-1**. Os sinais referentes aos carbonos aromáticos encontram-se em 137.92, 135.35, 132.79, 130.46 ppm (**C-2**). Em 111.53 ppm, verifica-se um sinal referente ao carbono quaternário presente na timina (**C-3**). Em 62.90 ppm, observa-se um sinal relativo ao carbono ligado a azida, denominado **C-4**. Já em 21.09 ppm,

há um sinal relativo ao carbono da metila ligado ao anel aromático (**C-5**). Um sinal relativo em 12.68 ppm referente a outra metila, só que esta ligada a timina (**C-6**), pode ser observado neste deslocamento.



**Figura 13:** Espectro de RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) J(Hz) / 100 MHz

As diversas limitações clínicas podem ser observadas quando se trata de novas terapias, não só tumorais, mas em geral, principalmente quando se refere a efeitos adversos normalmente envolvidos com a toxicidade da droga. Um exemplo disso é a terapia que envolve o uso constante do AZT. Efeitos como supressão da medula óssea, miopatia, anemia, náuseas, vômitos, dor de cabeça, fadiga, dores musculares, diminuição dos glóbulos brancos, entre outros (Wu et. al., 2007), podem ser resultado do balanço negativo entre as defesas antioxidantes do organismo e a formação de radicais livres. Inclusive, os radicais livres podem estar envolvidos tanto no mecanismo de ação como nos mecanismos do efeito tóxico (reação adversa) de diversos fármacos. O envolvimento de radicais livres é apontado em diversas patologias, tendo seu papel sugerido tanto como causa primária quanto como responsável pela evolução e manifestações clínicas dos quadros fisiopatológicos (Sinha, 1989).

Com isso, nos últimos anos, o rápido crescimento do papel dos radicais livres, principalmente das espécies reativas de oxigênio em patologias, trouxe

consigo novas idéias para a terapia de diversas doenças. Assim, o conceito de que moléculas contendo selênio podem ser melhores nucleófilos (e, portanto antioxidantes) do que os antioxidantes clássicos têm levado ao desenvolvimento de novos organocalcogênios sintéticos (Arteel et. al., 2001). Tanto, que nas últimas décadas, o interesse em bioquímica, farmacologia e toxicologia de compostos orgânicos de selênio aumentou de maneira significativa devido à variedade de propriedades biológicas desempenhadas por estes compostos (Nogueira et. al., 2004).

A toxicidade de certas drogas é a responsável por muitos efeitos adversos vistos em determinadas terapias, muitas envolvendo a produção radicais livres, o que torna de grande importância a análise inicial do potencial desses compostos. Além disso, compostos contendo selênio aparecem como um eficiente sistema de proteção antioxidante. Com o intuito de verificar a toxicidade apresentada pelos compostos, foi realizada uma análise da toxicidade de determinados análogos de selênio do AZT ligados a diferentes grupos arilas, através de testes *in vitro*, verificados por indicadores de estresse oxidativo, como a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a atividade peroxidase dependente de tiol. Como, pode ser verificado nas figuras 2 e 3 da patente.

A peroxidação de ácidos graxos insaturados nas membranas lipídicas é um processo conhecido como peroxidação lipídica. A lipoperoxidação caracteriza-se pelo aumento na produção TBARS e MDA em consequência do ataque das EROs às membranas celulares, provocando perda de seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos, e formação de produtos citotóxicos, culminando com a morte celular (Ferreira et. al., 1997). Como a membrana celular e a matriz intracelular são estruturas vitais para a célula, não é surpreendente verificar que a lesão induzida por EROs influencie na extensão dos processos das doenças (Bulkley, 1983). Nos resultados obtidos, presentes na Figura 2 da patente, pode ser verificado que em 200 $\mu$ M, todos os análogos nucleosídeos selecionados inibiram significativamente a produção de malondialdeído ( $p < 0,05$ ) em homogenado de cérebro de ratos. Além disso, o composto **3g** mostra ter um perfil antioxidante mais elevado (inibição da produção de TBARS) do que os demais compostos testados. O composto **3b**, bem como **3h** também mostraram excelentes resultados quando comparados com o AZT.

Outro importante sistema de desintoxicação do organismo, é a enzima glutathiona peroxidase (GPx), que desempenha um papel fundamental catalisando a redução de peróxidos perigosos e seus derivados para a água ou álcoois. No sítio ativo dessa enzima, o aminoácido mais importante é uma L-selenocisteína, que é responsável pela redução de hidroperóxidos à custa da glutathiona tripeptídica GSH. Depois da descoberta, de que o selênio desempenha um papel fundamental nas enzimas GPx, diversos compostos organoselênio tem sido desenvolvidos buscando mimetizar a ação catalítica dessa enzima.

O ebselen foi o primeiro composto a sugerir terapia de inativação dos hidroperóxidos na presença da glutathiona. O mecanismo catalítico do ebselen sugere a redução de hidroperóxidos por tióis. Em 1988, Maiorino e colaboradores, executando um estudo cinético da catálise da reação de GPx através do ebselen, concluíram que o mecanismo se pareceu cineticamente idêntico ao da reação da enzima, um mecanismo de pingue-pongue (Maiorino *et al.*, 1988). Após essa descoberta, diversos trabalhos têm sido desenvolvidos envolvendo a síntese de compostos envolvendo moléculas de selênio, quer por modificação da estrutura básica de ebselen ou por incorporação de algumas características estruturais da enzima nativa. Os compostos miméticos da GPx descritos na literatura podem ser classificados em três categorias principais: (i) amidas selenenil cíclicas possuindo ligação Se-N, (ii) disselenetos de diarila, e (iii) monoselenetos aromáticos ou alifáticos (Bhabak *et. al.*, 2010). Esta classificação poderia ser estendida aos compostos **3b** e **3h**, ao analisamos os resultados experimentais da atividade do tipo tiol peroxidase presentes na Figura 3 da patente, a fim de verificarmos a capacidade dos análogos de selênio do AZT mimetizar a atividade da glutathiona peroxidase. Dessa forma, esses compostos poderiam ser classificados como monoselenetos aromáticos já que estes, conforme os resultados obtidos mostraram-se eficientes na decomposição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, inclusive mais do que os outros compostos da série, inclusive do que o AZT.

O papel dos radicais livres, envolvendo o câncer emergiram após 1965, principalmente devido a estudos realizados, relatando a produção excessiva de radicais livres em células tumorais. Com base nos resultados obtidos uma terapia antioxidante para o tratamento de pacientes com câncer surgiu como alternativa. Infelizmente, resultados experimentais sobre o excesso de radicais

livres no tecido cancerígeno, provaram que essa terapia não surtiria o desejado efeito.

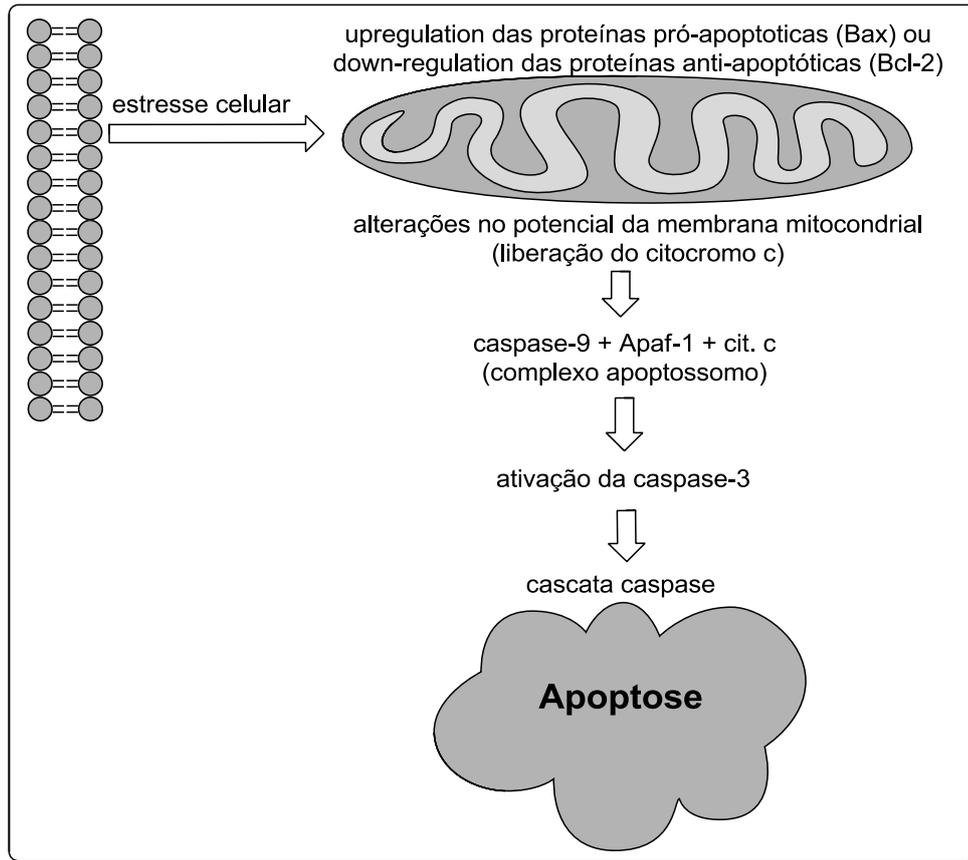
Foram descritos diversos estudos acerca do possível papel dos radicais de oxigênio no câncer e na carcinogênese, principalmente devido a descoberta da superóxido dismutase (SOD) (Denisov et. al., 2005). Apesar dos resultados contraditórios, a conclusão geral é de que as células tumorais são normalmente caracterizados pela redução na atividade da CuZnSOD e por uma possível redução na atividade de MnSOD. A origem da diminuição da expressão da SOD nas células do câncer ainda é desconhecida.

Há uma diferença principal entre o papel de radicais livres no câncer e outras patologias, tais como doenças cardiovasculares, hipertensão, diabetes mellitus, etc. Em contraste com estas últimas doenças onde as fontes de superprodução de radicais livres são bem estabelecidos (células vasculares e macrófagos na doenças cardiovasculares e leucócitos na inflamação), a origem e os níveis de produção de radicais livres nas células tumorais ainda são incertas. A maioria dos pesquisadores concordam que as EROs participam da iniciação e promoção do câncer. No estágio inicial, as EROs em conjunto com diversos agentes cancerígenos, podem mudar o material genético celular para a composição genética neoplásica. Na fase de promoção a participação dessas espécies foi primeiramente sugerido em razão aos efeitos de peróxidos orgânicos, que promovem o desenvolvimento do câncer. A reação das EROs com o DNA resultante acaba por formar adutos específicos, tais como 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG). Este é um passo importante da carcinogênese porque 8-OHdG é carcinogênico e sua formação se correlaciona, em muitos casos com o desenvolvimento do câncer (Denisov et. al., 2005)

Os compostos selecionados para avaliarmos o potencial antitumoral, frente a células de câncer de bexiga, foram os compostos que apresentaram melhores resultados antioxidantes, **3b** e **3h**. Para avaliá-los com relação a sua estrutura-atividade foram adicionados aos testes o composto **3a** e o AZT.

Após ser realizada a determinação da citotoxicidade, morfologia celular, análise apoptótica e expressão genética em células humanas de carcinoma de bexiga, pode-se verificar que os resultados obtidos apontam para uma elevada atividade pró-apoptótica dos compostos **3a**, **3b** e **3h**, muito maior do que o AZT (Figuras em anexo) além de realizar uma modulação da expressão gênica.

A apoptose pode ser iniciada por sinais extracelulares ou intracelulares, que podem incluir fatores de crescimento, irradiação -UV ou - $\gamma$ , agentes quimioterápicos, choque térmico, ausência de nutrientes, ou por uma família de proteínas transmembranas de receptores de morte celular. Estes sinais podem transduzir ao adaptador de membrana protéica e transmitir as proteases específicas de cisteína o que chamamos de iniciador de caspases. Ao analisar os resultados obtidos que caracterizaram os compostos **3a**, **3b** e **3h** com relação a atividade antitumoral, percebe-se que o mecanismo pelo qual os compostos poderiam estar induzindo a apoptose, deveria passar por uma via intrínseca. Essa via deve ser ativada na presença de um estresse celular, como a ativação de oncogenes ou dano celular, esse pode ser verificado quando analisa-se os resultados obtidos pela determinação da citotoxicidade e morfologia celular, presentes nas Figuras 4a e 4b da patente. Posteriormente, deve ocorrer uma ativação do gene supressor tumoral p53 levando a uma *upregulation* de várias proteínas pró-apoptóticas (por exemplo, Bax) ou inibição de anti-apoptóticos membros o Bcl-2 família. Esta ativação pode causar alterações na membrana mitocondrial, havendo liberação de moléculas pró-apoptóticas tais como citocromo c e do fator de indução de apoptose (AIF), a partir do espaço inter-mitocondrial da membrana. Essa liberação do citocromo c é regulada, pelo menos em parte, pelo equilíbrio entre os membros pró-apoptóticos (Bax) e anti-apoptótico (Bcl-2) na membrana mitocondrial. Uma vez liberado, citocromo c liga-se a fator apoptótico 1 ativador de proteases (Apaf-1), o que resulta na formação do complexo apoptossomo Apaf-1-caspase-9, ativando também o iniciador de caspase-9. Com o iniciador ativado de caspases-9, ocorre a ativação efetiva da caspase-3, -6 e -7, que são responsáveis pela clivagem de substratos celulares, resultando na associação bioquímica clássica e morfológica com o fenótipo apoptótico (**Esquema 20**). A cascata apoptótica descrita acima pode ser verificada ao analisarmos detalhadamente os dados obtidos para expressão gênica, apresentados nas Figuras 5a-e presente na patente.



**Esquema 20:** Cascata apoptótica clássica

## 6. CONCLUSÕES

Nos últimos anos, diversos estudos, investigações pré-clínicas e ensaios de intervenção clínica tem suportado o papel dos análogos nucleosídicos e dos compostos de selênio como potentes agentes quimiopreventivos para o câncer. A dose e a forma estrutural com que estes compostos se apresentam são fatores críticos para a prevenção do câncer. Além disso, a indução da apoptose e/ ou inibição do crescimento celular pode representar a prevenção do câncer através da união sintética desses compostos. No entanto, poucos trabalhos tem testado seus potenciais em induzir a apoptose. Tal investigação pode proporcionar um melhor entendimento com base no mecanismo quimiopreventivo do câncer, assim como, auxiliar na síntese de melhores agentes quimioterápicos

Realizou-se a síntese de uma série de nucleosídeos, análogos do AZT, contendo determinados calcogenetos na posição 5' de sua estrutura. Além disso realizamos testes *in vitro*, para testar o potencial biológico da série de selênio. De acordo com os resultados apresentados nesta tese, podemos inferir que:

- Foi sintetizada uma nova série de nucleosídeos através da inserção de moléculas de calcogenetos arílicos em um nucleosídeo derivado da timidina, o AZT, através de uma rota sintética simples e eficiente;

- A série de selênio sintetizada teve seu perfil toxicológico avaliado através de indicadores de estresse oxidativo, como a produção de TBARS e a atividade do tipo tiol peroxidase. Desses, os compostos **3b** e **3h** apresentaram resultados expressivos, apresentando perfil como antioxidante. O composto **3g** apresentou perfil antioxidante ao inibir a produção de TBARS, no entanto, este não obteve bons resultados quanto a capacidade em mimetizar a enzima tiol peroxidase.

- Os compostos **3b** e **3h** tiveram seus potenciais antitumorais avaliados frente a linhagem celular de câncer de bexiga (5637), tendo suas atividades avaliadas através da determinação da citotoxicidade, capacidade apoptótica, morfologia celular e expressão gênica. Tanto o compostos **3b** quanto o **3h**, apresentaram em 100 µM uma capacidade maior que o AZT, e o composto **3a**.

Inclusive este ultimo apresentou atividade apoptótica maior que o AZT, mas em concentrações mais baixas que 100 $\mu$ M, este nao apresenta bons resultados.

Considerando todos os resultados apresentados nesta tese, pode-se concluir que, apesar de serem dados preliminares os compostos selecionados, **3b** e **3h**, apresentam-se como potenciais candidatos terapêuticos. Estes análogos do AZT além de apresentarem perfil antioxidante, apresentam características que podem incluí-los como agentes antitumorais, podendo ser usados quimiopreventivamente. No entanto, estudos adicionais a fim de verificar um perfil toxicológico e bioquímico mais completo *in vivo*, serão realizadas, com o objetivo de definir um possível mecanismo para ação desses compostos.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados apresentados nesta tese, e visando comprovar a toxicologia destes compostos, novos testes foram realizados, juntamente a grupos de pesquisas desta universidade. Tais como:

- Dano no DNA em leucócitos;
- Viabilidade Celular;
- Peroxidação Lipídica;
- Tioredoxina reductase;
- Atividade do tipo Tiol Oxidase;
- Propriedades miméticas da GPx.

Os resultados obtidos encontram-se na seção anexos, na fase final para submissão.

Além disso, visando explorar a atividade encontrada nos compostos apresentados nessa tese, foi realizada a síntese de uma nova série análoga de derivados de AZT, realizando uma modificação estrutural na função azida dos derivados calcogeno-AZT, levando a formação de novos calcogeno-AZT triazóis.

A síntese desta nova série encontra-se em fase final. Além disso, estes novos compostos serão submetidas a testes para sua avaliação biológica.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almondes, K.G.S., Leal, G.V.S., Cozzolino, S.M.F., Philippi, S.T., Rondó, P.H.C. O papel das selenoproteínas no câncer. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, 56, 484-488, 2010.
- Arteel, G. E., Sies, H. The biochemistry of selenium and the glutathione system. **Environ. Toxicol. and Pharmacol.**, 10, 153–158, 2001.
- Baker SD, Khor SP, Adjei AA, et al. Pharmacokinetic, oral bioavailability, and safety study of fluorouracil in patients treated with 776C85, an inactivator of dihydropyrimidine dehydrogenase. **J. Clin. Oncol.**, 14, 3085–3096, 1996.
- Bhabak, K.P., Mugesh, G. Functional Mimics of Glutathione Peroxidase: Bioinspired Synthetic Antioxidants. **Acc. Chem. Res.**, 43, 1408-1419, 2010
- Bonate, P.L., Arthaud, L., Cantrell, W. R., Stephenso, K., Secrist III, J. A., Weitman, S. Discovery and development of clofarabine: a nucleoside analogue for treating cancer. **Nat. Rev. Drug Discovery**, 5, 855-863, 2006.
- Bulkley, G.B.; The role of oxygen free radicals in human disease processes. **Surgery**, 94, 407- 411, 1983.
- Cadenas, E., Packer, L. Handbook of Synthetic Antioxidants. **Marcel Dekker INC**, New York, 2002.
- Chapdelaine, D., Cardinal-David, B., Prevost, M., Gagnon, M., Thumin, I., Guindon, Y. A Stereoselective Approach to Nucleosides and 4'-Thioanalogues from Acyclic Precursors. **J. Am. Chem. Soc.**, 131, 17242–17245, 2009.
- Chaudiere, J., Courtin, O., Leclaire, J. Glutathion oxidase activity of selenocystamine: a mechanistic study. **Arch. Biochem. Biophys.**, 296, 328–336, 1992.
- Chu, C.K. Recent advances in Nucleosides: Chemistry and Chemotherapy. **Elsevier Science B.V.**, Amsterdam, 2002.

- Cihlar, T., Ray, A. S. Nucleoside and nucleotide HIV reverse transcriptase inhibitors: 25 years after zidovudine. **Antiviral Res.**, 85, 39–58, 2010.
- Clercq, E. D. Antiviral drugs in current clinical use. **J. Clin. Virol.**, 30, 115–133, 2004.
- Damaraju, V.L., Damaraju, S., Young, J. D., Baldwin, S.A., Mackey, J., Sawyer, M. B., Cass, C.E. Nucleoside anticancer drugs: the role of nucleoside transporters in resistance to cancer chemotherapy. **Oncogene**, 22, 7524–7536, 2003.
- Desai, D., Sinha, I., Null, K., Wolter, W., Suckow, M. A., King, T., Amin, S., Sinha, R. Synthesis and antitumor properties of selenocoxib-1 against rat prostate adenocarcinoma cells. **Int. J. Cancer**, 127, 230–238, 2010.
- E. Denisov, I. Afanasev. Oxidation and Antioxidants in Organic Chemistry and Biology. **Taylor & Francis Group**, Boca Raton, 2005.
- Ferreira, A.L.A., Matsubara, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, 43, 61-68, 1997.
- Fresco, P., Borges, F., Marques, M.P.M., Diniz, C.. The Anticancer Properties of Dietary Polyphenols and its Relation with Apoptosis. **Curr. Pharm. Des.**, 16, 114-134, 2010
- Galmarin, C.M, Mackey, J.R., Dumontet, C. Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment. **The Lancet Oncol.**, 3, 415-424, 2002.
- Gore, S. D., Jones, C., Kirkpatrick, P. Decitabine. **Nat. Rev. Drug discovery**, 5, 891-892, 2006.
- Gumina, G., Choi, Y., Chu, C. K. Recent advances in Antiviral Nucleosides. **Elsevier Science B.V**, 2003.
- Herdewijn, P. Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine. **Wiley-Vch Verlag gmbh & Co. Kga**, Weinheim, 2008.
- Horwitz, J.P., Chua, J., Noel, M. Nucleosides. V. the monomesylates of 1-(2'-deoxy- $\beta$ -D-lyxofuranosyl) thymidine. **J. Org. Chem.**, 29, 2076-2078, 1964.

- Jacob, C., Giles, G.I., Giles, N. M., Sies, H. Sulfur and Selenium: The Role of Oxidation State in Protein Structure and Function. **Angew. Chem. Int. Ed.**, 42, 4742 – 4758, 2003.
- Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ Mechanisms of hepatotoxicity. **Toxicol. Sci.** 65,166–76, 2002.
- James LP, Mayeux PR, Hinson JA. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. **Drug Metab. Dispos.** 31, 1499–506, 2003.
- Jeong, L. S., Tosh, D. K., Kim, H. O., Wang, T., Hou, X., Yun, H.S., Kwon, Y., Lee, S. K., Choi, J., Zhao, L. X. First Synthesis of 4'-Selenonucleosides showing unusual southern conformation. **Org. Lett.**, 10, 209-212 , 2008.
- Jeong, L. S., Tosh, D.K., Choi, W. J., Lee, S. K., Kang, Y.-J., Choi, S., Lee, J. H., Lee, H., Lee, H. W., Kim, H. O. Discovery of a New Template for Anticancer Agents: 2'-deoxy-2'-fluoro-4'-selenoarabinofuranosyl- cytosine (2'-F-4'-Seleno-ara-C). **J. Med. Chem.**, 52, 5303–5306, 2009.
- Koketsu, M., Senda, T., Yoshimura, K., Ishihara, H. Synthesis and characterization of novel 1,3-selenazine derivatives. BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O-assisted reaction of primary selenoamides with  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketones. **J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1**, 453–456, 1999.
- Koketsu, M., Yang, H. O., Kim, Y. M., Ichihashi, M., Ishihara, H. Preparation of 1,4-Oxaselenin from AgNO<sub>3</sub>/LDA-Assisted Reaction of 3-Selena-4-pentyn-1-one as Potential Antitumor Agents. **Org. Lett.**, 3, 1705–1707, 2001
- Lee, Y.-S., Park, S. M., Kim, H. M., Park, S.-K., Lee, K., Lee, C. W., Kim, B. H. C5-Modified nucleosides exhibiting anticancer activity. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 19, 4688–4691, 2009.
- Letavayová, L., Vlckova, V., Brozmanová, J. Selenium: From cancer prevention to DNA damage. **Toxicology**, 227, 1–14, 2006.
- Lorgeril, M., Salen, P. Selenium and antioxidant defenses as major mediators in the development of chronic heart failure. **Heart Fail Rev.**, 11, 13–17, 2006.
- Mackey, J.R., Baldwin, S.A., Young, J. D., Cass C.E. Nucleoside transport and its significance for anticancer drug resistance. **Drug Resistance Updates**, 1, 310-324, 1998.

- Maiorino, M.; Roveri, A.; Coassin, M.; Ursini, F. Kinetic mechanism and substrate specificity of glutathione peroxidase activity of ebselen (PZ51). **Biochem. Pharmacol.**, 37, 2267- 2271, 1988.
- McGuigan, C., Murziani, P., Slusarczyk, M., Gonczy, B., Voorde, J.V., Liekens, S., Balzarini, J. Phosphoramidate ProTides of the Anticancer Agent FUDR Successfully Deliver the Preformed Bioactive Monophosphate in Cells and Confer Advantage over the Parent Nucleoside. **J. Med. Chem.**, 54, 7247–7258, 2011.
- Meuillet, E., Stratton, S., Prasad, C.D., Goulet, A.C., Kagey, J., Porterfield, B., Nelson, M.A. Chemoprevention of prostate cancer with selenium: an update on current clinical trials and preclinical findings. **J. Cell. Biochem.**, 91, 443–458, 2004.
- Mitsuya, H., Weinhold, K.J., Furman, P.A., Clair, M.H., Lehrman, S.N., Gallo R.C., Bolognesi, D., Barry, D.W., Broder, S. 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): An antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus *in vitro*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 82, 7096-7100, 1985.
- Naithani, R. Organoselenium compounds in cancer chemoprevention. *Mini Rev Med Chem.* 8, 657-668, 2008.
- Naito, T., Yokogawa, T., Kim, H.-S., Futagami, M., Wataya, Y., Matsuda, A., Fukushima, M., Kitade, Y., Sasaki, T. Anticancer mechanisms of 1-(3-C-ethynyl-beta-D-ribo-pentofuranosyl) cytosine (ECyd, TAS-106). **Nucleic Acids Res. Supplement**, 2, 241-242, 2002.
- Nogueira, C.W., Zeni, G., Rocha, J.B. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. **Chem. Rev.**, 104, 6255- 6285, 2004.
- Nomura, M., Sato, T., Washinosu, M., Tanaka, M., Asao, T., Shuto, S., Matsuda, A. Nucleosides and nucleotides. Part 212: Practical large-scale synthesis of 1-(3-C-ethynyl- $\beta$ -d-ribo-pentofuranosyl)cytosine (ECyd), a potent antitumor nucleoside. Isobutyryloxy group as an efficient anomeric leaving group in the Vorbrüggen glycosylation reaction. **Tetrahedron**, 58, 1279–1288, 2002.

- Sampath, D., Rao, V. A., Plunkett, W. Mechanisms of apoptosis induction by nucleoside analogs. **Oncogene**, 22, 9063–9074, 2003.
- Sharma, A.K., Sharma, A., Desai, D., Madhunapantula, S.V., Huh, S. J., Robertson, G.P., Amin, S. Synthesis and Anticancer Activity Comparison of Phenylalkyl Isoselenocyanates with Corresponding Naturally Occurring and Synthetic Isothiocyanates. **J. Med. Chem.**, 51, 7820–7826, 2008.
- Sinha, B.K. Free radicals in anticancer drug pharmacology. **Chem. Biol. Interact.**, 69, 293 - 317, 1989
- Sinha, R. and El-Bayoumy, K. Apoptosis is a Critical Cellular Event in Cancer Chemoprevention and Chemotherapy by Selenium Compounds. **Curr. Cancer Drug Targets**, 4, 13-28, 2004.
- Sarmah, P., Deka, R.C.. Anticancer activity of nucleoside analogues: A density functional theory based QSAR study. **J. Mol. Model.**, 16, 411–418, 2010.
- Souza, M. V. N., Almeida , M. V. Drogas Anti-VIH: passado, presente e perspectivas futuras. **Quim. Nova**, 26, 366-372, 2003.
- Spallholz, J.E. Free radical generation by selenium compounds and their prooxidant toxicity. **Biomed. Environ. Sci.**, 10, 260–270, 1997.
- Steinbrenner, H., Sies, H. Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. **Biochim. Biophys. Acta**, 1790, 1478-1485, 2009.
- Vorbruggen, H., Ruh-Pohlenz, C. Handbook of Nucleoside Synthesis. **Wiley-Interscience**, New York, 2001.
- Wu, D., Ji, S., Wu, Y., Ju, Y., Zhao, Y. Design, synthesis, and antitumor activity of bile acid–polyamine–nucleoside conjugates. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 17, 2983–2986, 2007.
- Yeo, E.-J., Chun, Y.-S., Par, J.-W. New anticancer strategies targeting HIF-1. **Biochem. Pharmacol.**, 68, 1061–1069, 2004.
- Zeng, H., Combs, G.F. Selenium as an anticancer nutrient: roles in cell proliferation and tumor cell invasion. **J. Nutr. Biochem.**, 19, 1-7, 2008.
- Zhan, T., Lou, H. Synthesis ofazole nucleoside analogues of D-pinitol as potential antitumor agents. **Carbohydr. Res.**, 342, 865–869, 2007.

Zhang, S.-J., Jia, Z.-P., Wang, Y.-G. Design, Synthesis and Antitumor Activities of Novel 7-Arylseleno-7-deoxydaunomycinone Derivatives. **Bioorg. Med. Chem.**, 10, 3899–3904, 2002.

## 9. ANEXOS

Os artigos científicos gerados a partir desta tese, encontram-se aqui organizados. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios. Os artigos estão dispostos na forma em que foram submetidos.

## 9.1 Artigo 1

### **Chameleonic AZT-Selenides derivatives: Synthesis, Antioxidant and Antitumoral Activities.**

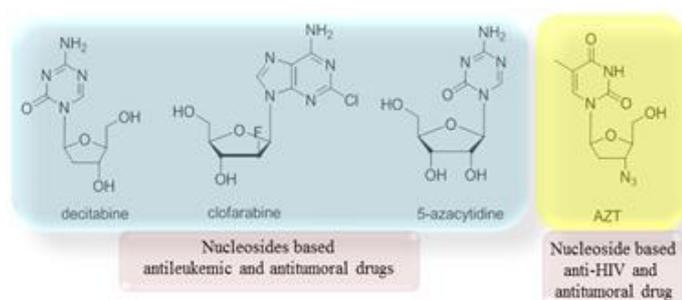
Diego de Souza, Douglas Mariano, Rafael Santos da Silva, Antonio Luiz Braga, João Batista Teixeira Rocha, Fernanda Nedel, Vinícius Farias Campos, Fabiana Seixas, Tiago Collares, Oscar Endrigo Dorneles Rodrigues

## Chameleonic AZT-Selenides derivatives: Synthesis, Antioxidant and Antitumoral Activities.

Diego de Souza,<sup>a</sup> Douglas Mariano,<sup>a</sup> Rafael Santos da Silva,<sup>a</sup> Antonio Luiz Braga,<sup>a,b</sup> João Batista Teixeira Rocha,<sup>a</sup> Fernanda Nedel,<sup>c</sup> Vinícius Farias Campos,<sup>c</sup> Fabiana Seixas,<sup>c</sup> Tiago Collares,<sup>c</sup> Oscar Endrigo Dorneles Rodrigues<sup>\*,a</sup>

Since endogenous nucleosides are key components of the molecular building blocks of life, should not be surprised the critical role that analogues of these compounds play in the treatment of various diseases.<sup>[1]</sup>

The use of nucleoside analogues as antiviral agents<sup>[2]</sup> is an interesting application to this class of compounds, especially as inhibitors of crucial enzymes such as the *reverse transcriptase* of HIV. In addition, nucleosides can be found as effective agents to cancer and leukemic therapies. For instance, the nucleosides decitabine,<sup>[3]</sup> clofarabine,<sup>[4]</sup> and 5-azacytidine<sup>[5]</sup> have been recently approved for the treatment of leukemic and myelodysplastic syndromes, as depicted in the figure 1. Interestingly, despite the large antiviral application of AZT, the antitumoral activity of this compound was reported previously,<sup>[6]</sup> demonstrating the potential use of this class of compounds as anticancer.



**Figure 1.** Examples for biologically active compounds

In another hand, organochalcogen compounds have become attractive synthetic targets for the development of new therapeutic agents. These compounds offer chemo-, regio-, and stereoselective reactions, and in life sciences selenium is known as a fundamental element.<sup>[7]</sup> In addition, organochalcogen compounds can modulate a series of biological processes and they have been related as effective agent against free radical species, and to exhibit other important biological proprieties (e.g., antioxidant, antitumor, anti-inflammatory, anti-infective and antiviral activity).<sup>[7]</sup>

Thus, the combination of the biologically active nucleoside AZT with organochalcogen moiety in a unique molecule could afford a potential new class of pharmaceutical drugs: AZT-Chalcogenides. In this way, herein, we describe the first synthesis of a new DNA building block, AZT-chalcogenides and their biologically exploitation to *in vitro* antioxidant and antitumoral activities as showed in the figure 2.



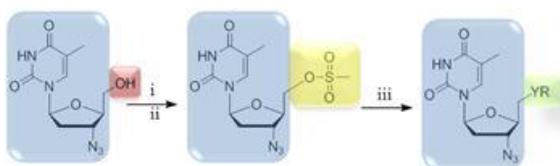
**Figure 2:** Synthesis and bio-approaches to the chalcogenium-AZT derivatives

### Results and Discussion

## 1. Synthesis of chalcogen-AZT derivatives

To the preparation of the desired compounds, a synthetic strategy was developed as depicted in the scheme 1. AZT was firstly mesylated using mesyl chloride and substituted with different chalcogenolate anions, providing a small library of structurally diverse AZT-chalcogenides derivatives.

**Scheme 1.** Synthesis of chalcogeno-AZT derivatives.



(i) AZT (1 mmol), Et<sub>3</sub>N (1.5 eq), THF, 0°C; (ii) MsCl (1.1 eq), THF, 2h, 0°C; (iii) RY<sub>2</sub> (0.6 mmol), DMSO (1mL), KOH (2.0 eq), 80°C, N<sub>2</sub>.

Our initial studies have focused on the development of an optimum set of reaction conditions. In a typical procedure, diphenyl diselenide (0.5 mmol) and mesilate-AZT (1 mmol) were reacted under argon atmosphere for 24 h at 80°C, using different solvents and reducing agents. The results are summarized in Table 1.

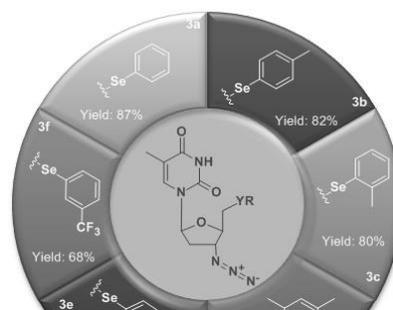
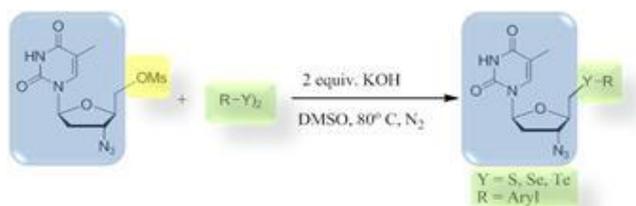
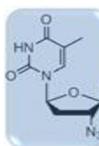
**Table 1.** Optimization of reaction conditions.

Entry	Solvent	Reducing agent	Yield 3 <sup>a</sup> %
1	DMSO	KOH	87
2	DMF	KOH	50
3	THF	KOH	10
4	THF	Zn <sup>0</sup>	---
5	THF	NaBH <sub>4</sub>	45

<sup>a</sup> Yields are given for isolated products.

Analyzing the table 1 it may be noted that reaction seems to be more effective in high polar solvents as DMF and DMSO, with a most efficiency to the last one (table 1, entry 1). THF was not able to perform the reaction probably due the lower solubility of the mesyl-AZT in this solvent. In terms of reducing agent, KOH was the most effective, compared with Zn dust and NaBH<sub>4</sub> (table 1, entries, 4 and 5). Subsequently, the same procedure could be expanded for others diselenides allowing the preparation of a small libraries of new seleno-AZT derivatives and for the synthesis of the corresponding thio- and telluro-AZT, showing the versatility of the protocol, figure 3.

In order to check the effects of the dichalcogenide moiety in the reaction course, different diaryl dichalcogenides were applied to this protocol. Analyzing the figure 3 it is possible to verify a relation of electronic effects in terms of the dichalcogenide moiety. In general, the attachment of activating groups to the aromatic ring gives higher yields than that obtained with the attachment of deactivating groups. Thus, the higher yields obtained with compounds with activating groups as substituent in the aromatic rings can be explained by an increase in the nucleophilicity of anions generated. Therefore, the lower yields observed with aryl rings containing withdrawings groups can be associated with a decrease in the chalcogenolate nucleophilicity. Comparing the chalcogenium atom, it was possible to verify that selenium and sulfur afford better yields than tellurium (examples 3a, 3j and 3k respectively). The lower yield obtained with the Te-derivative can be due to the instability of the tellurolate anion in the reaction conditions. In addition, the variety of chalcogenium moieties used allowed to prepare a small library of new chalcogeno-AZT derivatives, with different electronic and steric properties, very convenient to be explored for biologically interactions as proposed.



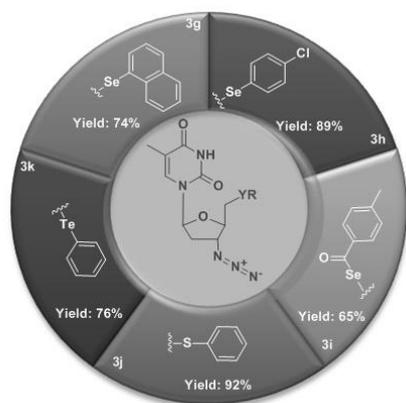
[\*] Diego de Souza,<sup>a</sup> Douglas Mariano,<sup>a</sup> Rafael Santos da Silva,<sup>a</sup> Antonio Luiz Braga,<sup>a,b</sup> João Batista Teixeira da Rocha,<sup>a</sup> Luciano Dornelles,<sup>a</sup> Fernanda Nedel,<sup>c</sup> Vinícius Farias Campos,<sup>c</sup> Fabiana Seixas,<sup>c</sup> Tiago Collares,<sup>c</sup> Lucielli Savegnago,<sup>c</sup> Oscar Endrigo Dorneles Rodrigues<sup>a</sup>

a) Departamento de Química Universidade Federal de Santa Maria 97105-900, Santa Maria, Brazil  
Fax: +55 55 3220 8761  
E-mail: [rodriguesoed@smail.ufsm.br](mailto:rodriguesoed@smail.ufsm.br)

b) Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.  
c) Molecular and Cellular Oncology Group, Graduate Program in Biotechnology, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brazil.

[\*\*] The authors gratefully acknowledge, CNPq (INCT- Catalise, INCT-NANOBIOSES, Universal) FAPERGS (Ed. PRONEM) for financial support.

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://www.angewandte.org> or from the author.

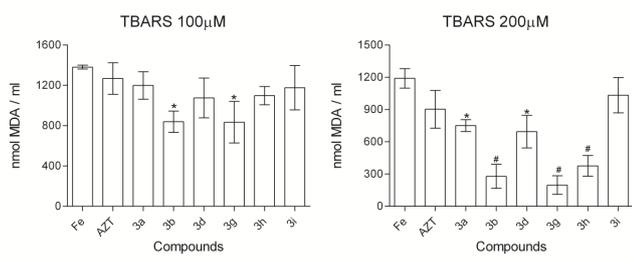


**Figure 3.** Chalcogeno-AZT derivatives

## 2. Antioxidant studies

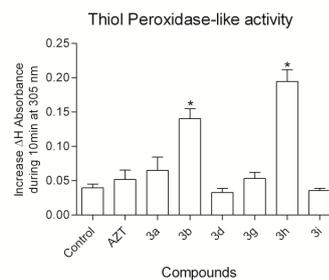
A serious drawback to the development and application of drugs to some therapies -especially as antitumoral compounds to cancer therapies- is its toxicity, which can cause various side effects. For instance, despite its effectiveness as antiretroviral and antitumoral, one of the problems related to the continued use of AZT is concerning its side effects. In order to determine the toxicity of the synthesized compounds were carried out tests *in vitro* verifying the indicators of oxidative stress (TBARS and thiol peroxidase). As described, compounds containing selenium appears as an efficient antioxidant protective system.<sup>[8]</sup> In this way, some selenium nucleosides bound to different aryl groups were selected for biological testing to examine the influence of these groups in the antioxidant activity.

The final products of the lipid peroxidation were determined in brain of homogenates by the method of Ohkawa et al.<sup>[9]</sup> and Puntel et al.<sup>[10]</sup> as Thiobarbituric Acid Reactive Substance (TBARS) with minor modifications. The compounds were analyzed in two different concentrations (100 $\mu$ M and 200 $\mu$ M). At 200 $\mu$ M, all the compounds significantly inhibited the production of malondialdehyde ( $p < 0,05$ ) in brains homogenate (Figure 7). The compound **3g** showed the highest antioxidant potency (inhibition of TBARS production). In addition, the compounds **3b** and **3h** also showed excellent results when compared with AZT.



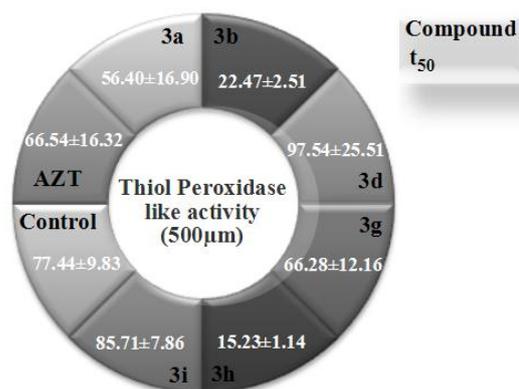
**Figure 4.** Inhibition of brain lipid peroxidation (TBARS formation) by selenium-AZT derivatives. Data are expressed as mean SEM for three different experiments. \*Indicates a significant difference from DMSO + Fe ( $p < 0,05$ ).

The thiol-peroxidase-like activity of compounds (i.e, the ability of AZT derivatives to mimic the native antioxidant glutathione peroxidase (GPx)) was evaluated according to the method of Tomoda et al.<sup>[11]</sup>, using benzenethiol (PhSH) as a glutathione alternative (Figure 5). Statistical analysis indicated that **3b** and **3h** decomposed  $H_2O_2$  more efficiently than **3a**, **3d**, **3g**, **3i**, AZT e DMSO (control group) ( $p < 0,05$ ).



**Figure 5.** GPx-like activity of selenium-AZT derivatives. All compounds were tested at 500  $\mu$ M (n=3 independent experiments done in triplicate). \*Indicates a significant difference from control group ( $p < 0,05$ ).

The time required to oxidize 50% of benzenethiol (i.e.,  $t_{50}$ ) during the reduction of hydrogen peroxide is depicted in Table 4. In line with data presented in Figure 6, compounds **3h** and **3b** had a  $t_{50}$  that was 4-5 times lower than that of DMSO and AZT (Figure 5 and Figure 6).



**Figure 6.** Time required to oxidize 50% of PhSH ( $T_{50}$ ). Data are expressed as mean $\pm$ SE determined GPx-like activity in three different experiments

## 3. Antitumoral studies

Since 1965, a great interest has been attached to the possible role of free radicals in cancer tissues, relating the excessive production of free radicals in tumor cells.<sup>[12]</sup> In this context, most

researchers agreed that oxygen radicals participate in both initiation and promotion of cancer. At the initiation stage, oxygen radicals in connection with various carcinogens, could change normal cellular genetic material to neoplastic genetic composition.<sup>[13]</sup> At promotion stage the participation of free radicals was firstly suggested on the grounds of the effects of organic peroxides, which promoted cancer development.<sup>[14]</sup>

Inexorably, antioxidant systems able to be used as antitumoral compounds can be described as a chameleonic drug, due the possibility of combining citotoxic properties against cancer cells and via chemoprotection against ROS, normally found at high levels in neoplastic tissues.<sup>[15]</sup> In connection with this and based in the results presented above, the compounds **3b** and **3h** were selected to be screened as in vitro antitumoral agents comparing with **3a** and **AZT**.

### 3.1 Determination of cytotoxicity

**AZT** and their analogs (**3a**, **3b** and **3h**) showed in vitro cytotoxicity against human bladder carcinoma cells (5637) after 24, 48 or 72 h of exposure. First, it is interesting to note that maximal cytotoxicity was obtained after 48 h of exposure to **AZT**, **3b** and **3c**. Regarding concentrations, **AZT**, **3b** and **3h** at a concentration of 50  $\mu\text{M}$  in 48 h showed an efficient cytotoxic effect, inhibiting 50% of tumor cells (Figure 7a). In addition, **AZT** inhibited cell growth more than 50% in all tested concentrations. Previous studies have demonstrated the tumor cell growth inhibition by **AZT** at low concentrations as demonstrated here.<sup>[16]</sup> The **3a** analog inhibit cell growth more than 50% only after 100  $\mu\text{M}$ . In addition, no effect of analog exposure time was observed on cell growth inhibition.

### 3.2 Cell morphology

Fig. 7 also shows the comparative morphology of untreated and treated cells with 50 and 100  $\mu\text{M}$  of **AZT**, **3a**, **3b** and **3h** after 48 h of exposure. Differences in cell morphology, which included alteration to a spherical shaped cell and detachment from the surface of the plate, was observed for compound **3a**, **3b** and **3h**. The morphological changes became more severe in the 100  $\mu\text{M}$  concentration. These alterations were not observed at equivalent concentrations of **AZT**.

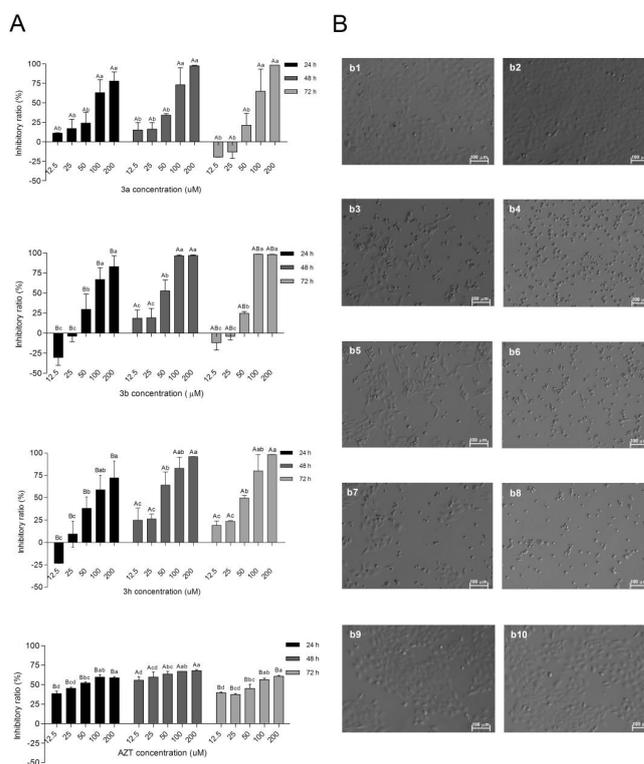
### 3.3 Apoptosis analysis

Annexin-PE staining assay was performed to determine whether or not **AZT** and Se-analogs could induce apoptosis in 5637 cells. Annexin V binds to cells that express phosphatidyl serine on the outer layer of the cell membrane, a characteristic feature of cells entering apoptosis. The results (Figure 8) indicate that **AZT** induces similar percentage of apoptosis than control groups at both concentrations. However, exposure of 5637 cells to 100  $\mu\text{M}$  of compounds **3a**, **3b** and **3h** increased the percentage of annexin V and 7-ADD-staining (early and late apoptosis) 90.74, 89.60 and 92.80%, respectively, when treated with 100  $\mu\text{M}$ . In addition, at 50  $\mu\text{M}$  compound **3h** induced a high percentage of apoptosis (71.12%), when compared to **AZT** (7.74%) and

control (7.36%). These results indicate the pro-apoptotic properties of compounds **3a**, **3b** and **3h** in 5637 cells.

### 3.4 Gene expression

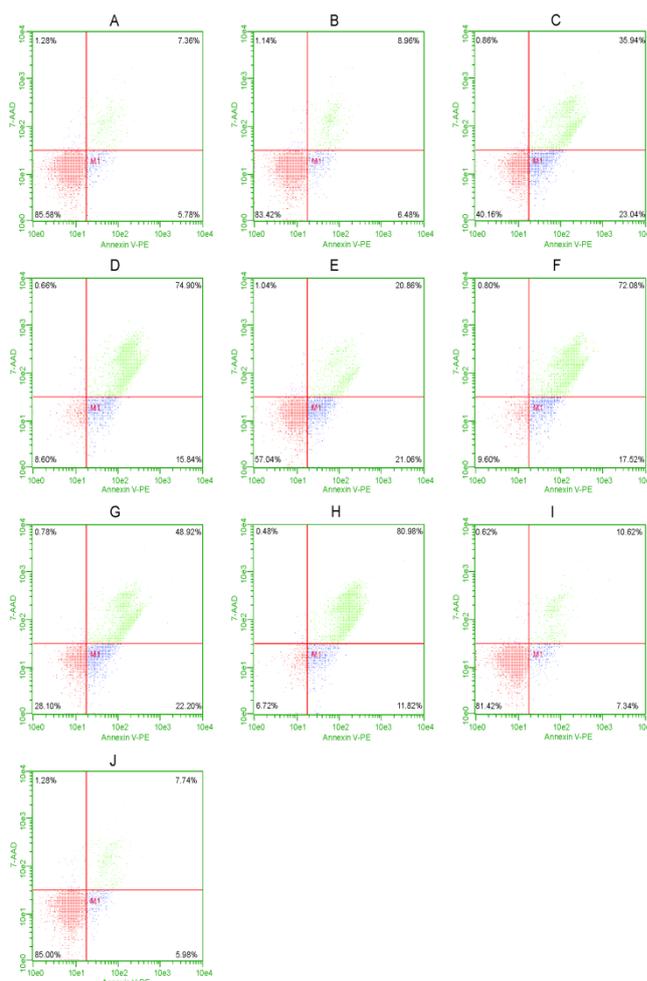
We investigated the gene expression of the antiapoptotic Bcl-2 and the pro-apoptotic Bax. Bcl-2 mRNA levels were significantly decreased in cells exposed to compounds **AZT**, **3h**, **3b**, **3a** at 100  $\mu\text{M}$  compared to levels in control cells (Fig. 9B). Moreover, Bax mRNA levels were significantly higher in these same groups except for **AZT** that Bax mRNA levels did not differ from controls (Fig. 9A). In addition, was observed a predominance of Bax to Bcl-2 for compounds 3b, 3a at concentration of 100  $\mu\text{M}$  compared to controls, where Bcl-2 was predominant to Bax, showing that Bax:Bcl-2 ratio was affected by these compounds (Fig. 9E). We also investigated the mRNA expression for Caspase-9 and survivin genes. The compounds **3b** and **3a** at 100  $\mu\text{M}$  induced a significant increase in Caspase 9 mRNA levels in comparison to controls (Fig. 9C), while compounds **3a**, **3b** and **3h** induced a significant decrease in Survivin gene expression in comparison to controls (Fig. 9D). Many genes are involved in the regulation of apoptosis. Bcl-2 is an anti-apoptotic regulator, while Bax is a pro-apoptotic regulator.<sup>[16]</sup> The balance between Bcl-2 and Bax expression plays an important role in sustaining cell morphology and function.



**Figure 7.** Panel A shows the effect of different concentration of **AZT**, **3a**, **3b** and **3h** in 24, 48 and 72 hours in the inhibition of 5637 cells. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM and differences were considered significant when  $P < 0.05$ . Uppercase indicates differences among treatment time and lowercase indicates differences among concentrations. Panel B shows the comparative morphology (16 x magnification) of

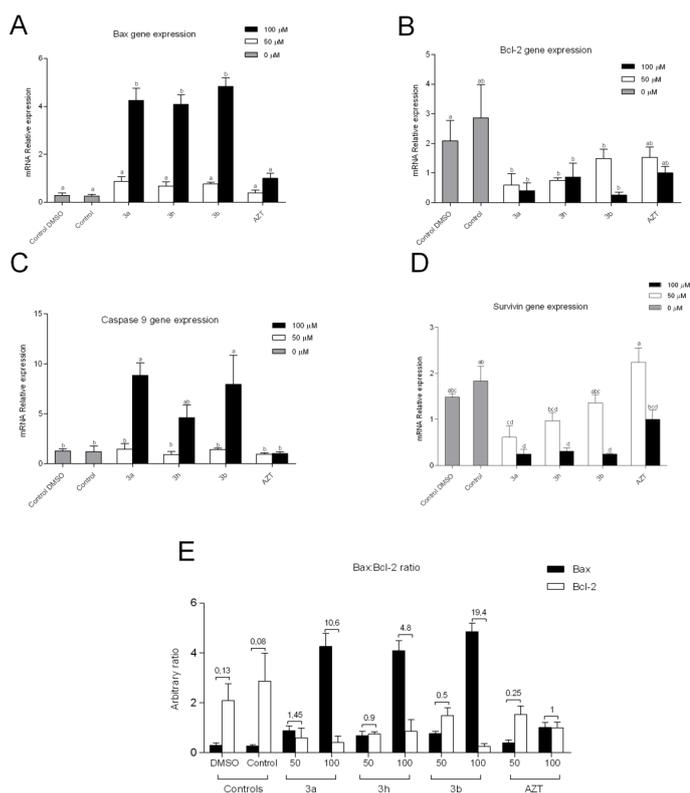
untreated and treated cells with 50 and 100  $\mu\text{M}$  of AZT, 3a, 3b and 3h after 48 h of exposition. Control with medium/FBS (b1); Control DMSO (b2); AZT 100  $\mu\text{M}$  (b3); AZT 50  $\mu\text{M}$  (b4); 3a 100  $\mu\text{M}$  (b5); 3a 50  $\mu\text{M}$  (b6); 3b 100  $\mu\text{M}$  (b7); 3b 50  $\mu\text{M}$  (b8); 3h 100  $\mu\text{M}$  (b9); 3h 50  $\mu\text{M}$  (b10).

Several studies have shown that Bcl-2 overexpression can disrupt regulation of the pro-apoptotic proteins Bax and Bak.<sup>[18]</sup> Moreover, an increase in Bcl-2 expression prevents cytochrome c release from the mitochondria, thereby inhibiting activation of caspases, such as caspase-9 and caspase-3, and preventing apoptosis.<sup>[19, 20]</sup> Other studies have demonstrated that Bcl-2 can act as a mitochondrial membrane channel protein.<sup>[21]</sup> Thus, cells are active when Bcl-2 is overexpressed and die if Bax is hyperexpressed.<sup>[22, 23]</sup> In the present study, we found that expression of Bcl-2 was down-regulated by compounds **3h**, **3b**, **3a**, whereas Bax expression was up-regulated. Our findings suggest that Bax and Bcl-2 are involved in mediating the apoptotic effects associated with compounds (**3h**, **3b**, **3a**), treatment in 5637 cells. Caspases play a central role in apoptosis, a well-studied pathway of programmed cell death. The activation of caspase-9 is believed to be a well-defined outcome of the release of mitochondrial cytochrome c into the cytoplasm and its subsequent association with the Apaf-1 protein. The assembly of cytochrome c, Apaf-1 and procaspase-9, called apoptosome, triggers the activation of caspase-9.<sup>[24]</sup> Here, the caspase 9 mRNA levels were significantly increased by treatment with compounds (**3a**, **3b**, **3h**) showing that caspase 9 are involved in mediating apoptotic effects associated with these compounds.



**Figure 8.** Annexin V-PE analysis of 5637 cells treated with 50 and 100  $\mu\text{M}$  of AZT, 3a, 3b and 3h in 48 h. Control with medium/FBS (A); Control DMSO (B); AZT 100  $\mu\text{M}$  (C); AZT 50  $\mu\text{M}$  (D); 3a 100  $\mu\text{M}$  (E); 3a 50  $\mu\text{M}$  (F); 3b 100  $\mu\text{M}$  (G); 3b 50  $\mu\text{M}$  (H); 3h 100  $\mu\text{M}$  (I); 3h 50  $\mu\text{M}$  (J).

In 5637 cells, compounds (**3a**, **3b**, **3h**) also modulates the expression of the anti-apoptotic gene,<sup>[25]</sup> survivin, which is substantially down regulated at the mRNA level when tumor cells were treated with compounds. The gene expression data confirms the results of MTT and flow cytometry that compounds (**3a**, **3b**, **3h**) are more efficient as a pro-apoptotic agents than AZT.



**Figure 9.** Effect of AZT and derivatives on apoptotic-related gene expression. Panel A – Bax, B – Bcl-2, C – Caspase 9, D – Survivin, E – Bax:Bcl-2 ratio. Data shown are the mean results  $\pm$  SEM of a representative experiment performed in triplicate (N = 3). Different letters indicate significant differences among means.

## Conclusion

Here we have proposed the synthesis of a new block of nucleosides derived from AZT containing Se, Te and S. The methodology used allowed the preparation of a small library of AZT-chalcogenides derivatives, in good yields in a modulate fashion way. The synthesized compounds were evaluated for biological applications as antioxidant and antitumoral agents. In this context, very convenient bio-approaches were observed to these chameleonic AZT-selenides showing different and desired bioactivities to new drugs candidates. As antioxidant, the selected compounds working as a chemoprotective against prooxidant systems and as antitumoral agents, the compounds demonstrated potency against bladder carcinoma 5637 cells. Additional tests against other carcinomas and for new generations of the AZT-chalcogenium derivatives are being developed in our laboratories.

## Keywords:

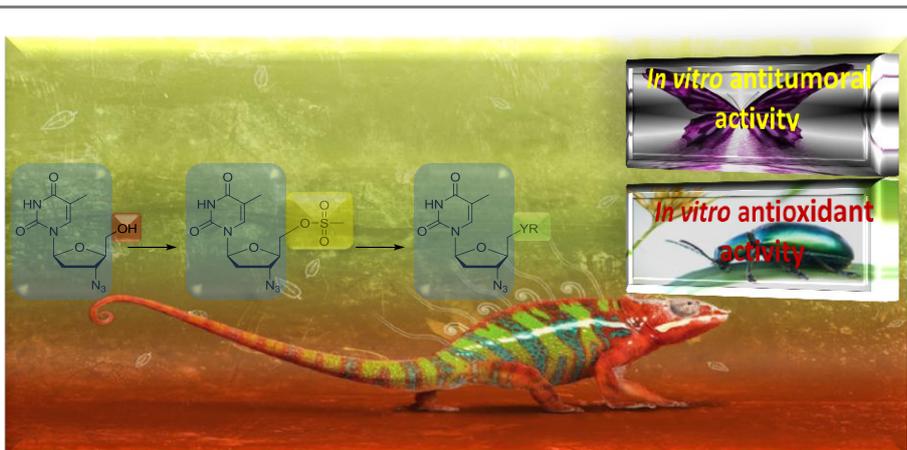
- [1] D. Chapdelaine, B.C. David, M. Pre'vost, M. Gagnon, I. Thumin, Y. Guindon. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17242–17245
- [2] E. De Clerq, *J. Clin. Virol.* **2004**, *30*, 115-133.
- [3] S. D. Gore, C. Jones, P. Kirkpatrick, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 891-892.
- [4] P. L. Bonate, L. Arthaud, W. R. Cantrell, K. Jr. Stephenson, J. A. Secrist III, S. Weitman, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 855-863.
- [5] J.P. Issa, H.M. Kantarjian, P. Kirkpatrick, *Nat Rev Drug Discov.* **2005**, *4*, 275-276,
- [6] Wu, D.; Ji, S.; Wu, Y.; Ju, Y.; Zhao, Y. *Biorg. & Med. Chem. Lett.* **2007**, *11*, 2983-2986
- [7] a) G. Muges, W.W. Du Mont, H. Sies, *Chem. Rev.*, **2001**, *101*, 2125-2180. b) C.W. Nogueira, G. Zeni, J. B. T. Rocha, *Chem. Rev.*, **2004**, *104*, 6255-6286. c) C.W. Nogueira, J.B.T. Rocha, *Arch. Toxicol.* **2011**, in press
- [8] C.W. Nogueira, J.B.T. Rocha, *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 2055-2071.
- [9] H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi, *Analytical Biochemistry.* **1979**, *95*, 351–358.
- [10] R. L. Puntel, D. H. Roos, D. Grotto, S. C. Garcia, C. W. Nogueira, J. B. T. Rocha, *Life sciences.* **2007**, *81*, 51-62.
- [11] M. Iwaoka, S. Tomoda, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 2557-2561.
- [12] A. Saprin, E. Klochko, K. Kruglikova, V. Chibrikov, N. Emanuel. *Dokl Akad Nauk SSSR* **1965**, *167*, 222–226.
- [13] M.A. Trush, T.W. Kensler, *Free Radic. Biol Med.* **1991**, *10*, 201–209.
- [14] R.A. Floyd. *FASEB J.* **1990**, *4*, 2587–2597.
- [15] P. P. Singh, A. Chandra, F. Mahdi, A. Roy P. Sharma, *Ind. J. Clin. Biochem.* **2010**, 225–243.
- [16] (a) Y-Q. Sun, T-K. Guo, Y-M. Xi, C. Chen, J. Wang, Z-R. Wang. *World J Gastroenterol* **2007**, *13*(31), 4185-4191; (b) Falchetti, A., Franchi, A., Bordi, C., Mavilia, C., Masi, L., Cioppi, F., Recenti, R., Picariello, L., Marini, F., Del Monte, F., Ghinoi, V., Martineti, V., Tanini, A. and Brandi, M. L. *Journal of Bone and Mineral Research*, **2005**, *20*, 410–418. (c) Humer J., Ferko B., Waltenberger A., Rapberger R., Pehamberger H., Muster T., *Melanoma Res.* **2008**, *5*, 314-21.
- [17] I. Metrailler-Ruchonnet, A. Pagano, S. Carnesecchi, C. Ody, Y. Donati, C. B. Argiroffo. *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, *42*, 1062-1074.
- [18] Y. Tsujimoto, C.M. Croce. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1986**, *83*, 5214-5218.
- [19] I. Budihardjo, H. Oliver, M. Lutter, X. Luo, X. Wang. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1999**, *15*, 269-290.
- [20] D. Solange, J.C. Martinou. *Trends Cell. Biol.* **2000**, *10*, 369-377.
- [21] Gross, A. *Genes Dev.* **1999**, *13*, 1899-1911.
- [22] R. Aikawa, I. Komuro, T. Yamazaki, Y. Zou, S. Kudoh, M. Tanaka, I. Shiojima, Y. Hiroi, Y. Yazaki, *J. Clin. Invest.* **1997**, *100*, 1813-1821.
- [23] O.Y. Bernecker, F. Huq, E. K. Heist, B. K. Podesser, R. J. Hajjar. *Cardiovasc. Toxicol.* **2003**, *3*, 183-190.
- [24] H. Zou, Y. Li, X. Liu, X. Wang. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 11549-11556.
- [25] W.-L.W. Wang, P. McHenry, R. Jeffrey, D. Schweitzer, P. Helquist, M. Tenniswood, *J. Cell. Biochem.* **2008**, *105*, 998-1007.

**Drug design**

Diego de Souza,<sup>a</sup> Douglas Mariano,<sup>a</sup> Rafael Santos da Silva,<sup>a</sup> Antonio Luiz Braga,<sup>a,b</sup> João Batista Teixeira da Rocha,<sup>a</sup> Fernanda Nedel,<sup>c</sup> Vinícius Farias Campos,<sup>c</sup> Fabiana Seixas,<sup>c</sup> Tiago Collares,<sup>c</sup> Oscar Endrigo Dorneles Rodrigues<sup>\*,a</sup>

Page – Page

Chameleonic AZT-Selenides derivatives: Synthesis, Antioxidant and Antitumoral Activities.



In this article we present the synthesis, characterization and biological studies for *in vitro* activity of selenium-AZT derivatives as antioxidant (TBARS and thiol peroxidase) and as antitumoral agents in Bladder Carcinoma 5637. For the selected compounds, a positive response was obtained to both the bio- showing an effective response as antioxidant and antitumoral compounds for these chameleonic synthesized chalcogeno nucleosides.

## Supporting Information

© Wiley-VCH 2011

69451 Weinheim, Germany

**Efficient synthesis and in vitro evaluation of antioxidant potential and antitumoral activity of chameleonic 5'-chalcogen azidothymidine**

Diego de Souza,<sup>†,#</sup> Douglas Mariano,<sup>†</sup> Rafael Santos da Silva,<sup>†</sup> Antonio Luiz Braga,<sup>‡</sup> João Batista Teixeira da Rocha,<sup>†</sup> Luciano Dornelles, Oscar Endrigo Dorneles Rodrigues<sup>\*,†</sup>

## Table of Contents

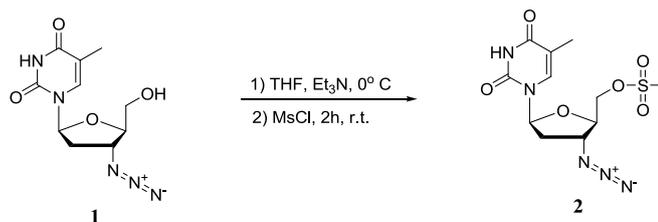
1.	<i>General Methods</i>	S3
2.	<i>Synthetic procedures</i>	S3
3.	<i>Antioxidant studies</i>	S4
4.	<i>Antitumoral studies</i>	S5
5.	<i>NMR Charts</i>	S7
6.	<i>Figures</i>	S29
7.	<i>References</i>	S31

## 1. General Methods

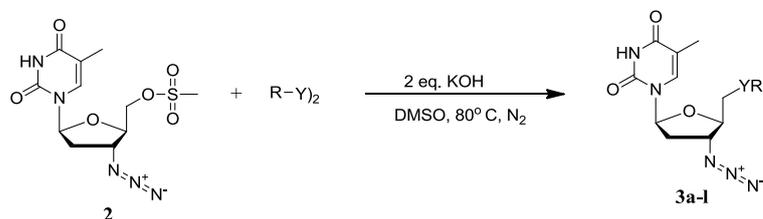
### Chemistry

The NMR spectras were recorded with a Bruker DPX-400 spectrometer with chemical shifts expressed in parts per million (in CDCl<sub>3</sub> and Me<sub>4</sub>Si as internal standard). Data are reported as follows: chemical shift, multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, brs = broad singlet, m = multiplet), coupling constants, and number of protons.

## 2. Synthetic procedures



In the two-neck round-bottom flask under an argon atmosphere was added 1 mmol AZT (1) in 7 mL THF. After dissolution of AZT, the system was cooled to 0 ° C and added triethylamine (1.5 mmol). After 10 minutes, still at 0 ° C, added dropwise mesyl chloride (1.1 mmol) diluted in 3 ml of THF. Then the ice bath was removed and the system allowed to react for 2h at room temperature. After this period the reaction was extracted with a saturated solution of NH<sub>4</sub>Cl (~ 20 mL), and the organic phase extracted with dichloromethane (3x 20 mL). The organic phases were combined and dried over MgSO<sub>4</sub>, the solvent was evaporated under reduced pressure and the product crystallized in ethyl acetate, and dried in high vacuum pump. The yield of the mesylate (2) obtained was approximately 92%.



In a Schlenk tube under argon atmosphere, was added the appropriate dichalcogenide (0.6 mmol) in dry DMSO (1.0 mL), after solubilization the dichalcogenide, was added KOH (2.0 eq.). After 5min. was added to a reaction system solution of the 1 mmol of mesylate of AZT (2) dissolved in dry DMSO (1.0 mL). Subsequently, the temperature of reaction was rise at 80 ° C. The reaction was followed by thin-layer plates in order to determine the consumption of the mesylate and the formation of the product (3). The reaction times varied according to the dichalcogenide. After this time, the DMSO was distilled and the product dissolved in dichloromethane and ethanol. The product was purified by column chromatography on silica gel, eluting with dichloromethane, dichloromethane / ethanol (9:1) . The yields obtained varied according to characteristics of the dichalcogenide.

### 3. Antioxidant studies

#### 3.1 General Chemicals

DMSO, Thiobarbituric Acid (TBA), Malondialdehyde was obtained from Sigma (St. Louis, MO). All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

#### 3.2 Animals

Adult male Wistar rats (250–350 g) from our own breeding colony (Animal House-holding, UFMSM, Brazil) were maintained in a temperature controlled room (22–25°C), on a 12-h light/dark cycle, with water and food *ad libitum*. Animals were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources of this University.

#### 3.3 Tissue preparation

Animals were killed by decapitation. Brains were removed and homogenized within in 10mM Tris–HCl buffer, pH 7.4 (1/10, w/v), and centrifuged at 2000 rpm for 10 min. The low speed supernatant fraction obtained (S1) was maintained in ice-cold for the TBARS assay.

#### 3.3 TBARS assay

The end products of the lipid peroxidation were determined in tissue samples by the method of Ohkawa et al. (1979) (1) and Puntel et al. (2007) (2) as Thiobarbituric Acid Reactive Substance (TBARS) with minor modifications. Aliquots of the homogenate were pipetted and incubated in a medium containing distilled water and 10mM Tris/HCl buffer pH 7.4, in the absence (DMSO - vehicle) or presence of compounds (at a final concentration of 100 or 200µM) and 60 µM of iron sulphate (FeSO<sub>4</sub>). Only tissue, buffer and water were added to blank group. Diphenyl diselenide was used as a positive control. The amount of TBARS produced was measured at 532 nm, using MDA as an external standard.

#### 3.4 Thiol Peroxidase like activity assay

The catalytic activity of compounds as a GPx-like model enzyme was evaluated according to the method of Tomoda et al. (1994) (3), using benzenethiol (PhSH) as a glutathione alternative. Fifteen mM of benzenethiol and 20mM of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) were diluted in methanol. Compounds or DMSO (vehicle) were pipetted in a quartz cuvette, containing methanol without or with 500µM AZT analogs. After this, benzenethiol and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were pipetted. The oxidation of benzenethiol was monitored at 305 nm, during 180 seconds.

#### 3.5 Statistical analysis

Statistical analysis was performed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Duncan's multiple range test when appropriate. All values were presented as mean±SE and the differences were considered significant when  $p < 0.05$  and  $P < 0.01$ .

#### 4. Antitumoral studies

##### 4.1. Cell Culture

The human bladder carcinoma cells (5637) were obtained from Rio de Janeiro Cell Bank (PABCAM, Federal University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil). They were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine and 1% penicillin/streptomycin, purchased respectively from Vitrocell Embriolife (Campinas, Brazil) and Gibco (Grand Island, NY, USA). Cells were grown at 37°C in an atmosphere of 95% humidified air and 5% CO<sub>2</sub>. The experiments were performed with cell in the logarithmic phase of growth.

##### 4.2. Determination of cytotoxicity

The viability of 5637 cells was determined by measuring the reduction of soluble MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] to water insoluble formazan (Ali et al., 2010). Briefly, cells were seeded at a density of  $2 \times 10^4$  cell per well in a volume of 100  $\mu$ L in 96-well plates, and grown at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 24 h before used in cell viability assay. Cells were then incubated with different concentration of AZT, S1072, S1073 and S1079 (200 – 12.5 $\mu$ M) for 24, 48 and 72 hours. These components were previously dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and added to the medium supplemented with 10% FBS to the desired concentrations. Final DMSO concentration in the medium never exceeded 0.25% and an additional group was exposed to an equivalent concentration of this solvent.

After incubation periods the media was removed and subsequently 180  $\mu$ l of medium and 20  $\mu$ l MTT (5 mg MTT/mL solution) was added to each well. The plates were incubated for an additional 3 h and medium was discarded. 200  $\mu$ l of DMSO was added to each well, and the formazan was solubilized on a shaker for 5 min at 150 rpm. The absorbance of each well was read on a microplate reader (MARCA) at a test wavelength of 492 nm. Cell inhibitory growth was determinate as follows: inhibitory growth =  $(1 - \text{Abs}_{492\text{treated cells}} / \text{Abs}_{492\text{control cells}}) \times 100\%$  (Zheng et al., 2011). All observations were validated by at least two independent experiments in triplicates for each experiment.

##### 4.3. Morphology observation

Cell were cultured in the 96 well culture plates in a density of  $2 \times 10^4$  cell per well and grown at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 24 h. Cells were then incubated with 100 and 50  $\mu$ M of AZT, S1072, S1073 and S1079 for 48 h. At the end of incubation period cell were viewed and photographed with an inverted fluorescence microscope Olympus IX71 (Olympus Optical Co., Ltd. Tokyo, Japan).

##### 4.4. Apoptotic assay

The Guava Nexin assay (Guava Technologies) was done following the manufacturer's instructions. Cells were treated with 100 and 50  $\mu$ M of AZT, S1072, S1073 and S1079 for 48 h. Briefly,  $2.0 \times 10^4$  to  $1.0 \times 10^5$  cells (100  $\mu$ L) were added to 100  $\mu$ L of Guava Nexin Reagent. Cells were incubated in the dark at room temperature for 20 min and samples (2,000 cells per well) were then acquired on the flow cytometry Guava EasyCyte System. In this assay, annexin V-negative and 7-AAD-positive indicates nuclear debris, annexin V-positive and 7-AAD-positive indicates late apoptotic cells, annexin V-negative and 7-AAD-negative indicates live health cells, and annexin V-positive and 7-AAD-negative indicates early apoptotic cells.

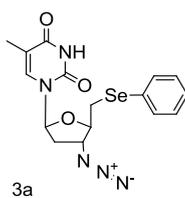
#### *4.5 Real-Time PCR gene expression*

For real time PCR cells were seeded in 6-well flat bottom plate at a density of  $2 \times 10^5$  per well and grown at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 24 h. Cells were then incubated with 100 and 50 µM of AZT, S1072, S1073 and S1079 for 48 h. After this period cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS; Gibco) and RNA extraction was performed. Total RNA extraction, cDNA synthesis and real-time PCR were conducted as previously described (Campos et al., 2010, Campos et al., 2011). Briefly, RNA samples were isolated using TRIzol® Reagent (Invitrogen™, Carlsbad, USA) and samples were DNase-treated with a DNA-free® kit (Ambion™, USA) following the manufacturer's protocol. First-strand cDNA synthesis was performed with 2 µg of RNA using High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems™, UK) according to the manufacturer's protocol. Real-Time PCR reactions were run on a Stratagene® Mx3005P™ Real-Time PCR System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) using SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™, UK) using primers described in table 1.

#### *4.6 Data analysis*

Data sets from MTT and quantitative real-time PCR were analyzed using a two-way ANOVA followed by a Tukey test for multiple comparisons. Two factors were considered: used compound (four levels) and compound concentration (two levels). Significance was considered at  $P < 0.05$  in all analyses. All data were expressed as mean  $\pm$  SEM.

## 5. NMR Charts



$\delta_{\text{H}}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 9.27 (s, 1H), 7.54 (dd,  $J = 2.99, 6.50$  Hz, 2H), 7.32 – 7.26 (m, 4H), 6.12 (t,  $J = 6.55$  Hz, 1H), 4.14 (m, 2H), 3.24 (t,  $J = 5.80$  Hz, 2H), 2.53 – 2.30 (m, 2H), 1.86 (s, 3H).  $\delta_{\text{C}}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 163.85, 149.89, 135.41, 132.34, 129.48, 127.91, 111.36, 84.95, 82.81, 62.79, 37.36, 29.69, 12.43. Exact Mass: 406.9535. HRMS ( $m/z$ ): 408.0575. Yield: 87%

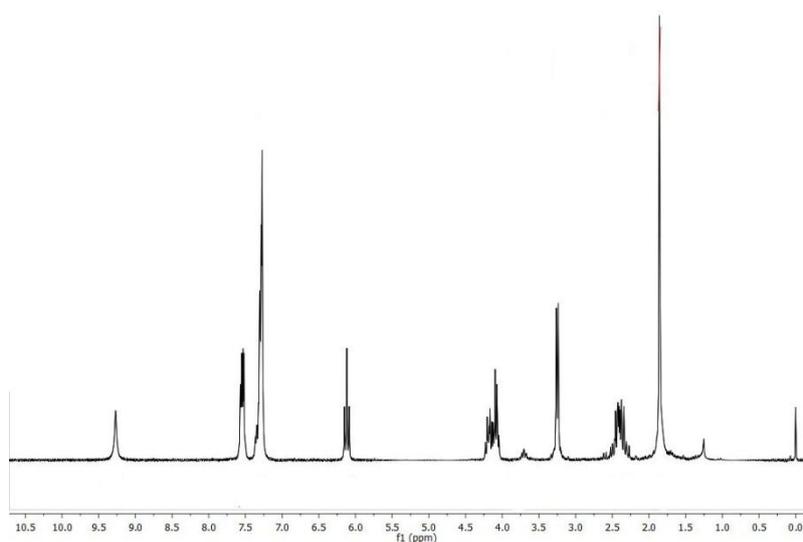


Figure S8.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 3a ( $\text{CDCl}_3$ ).

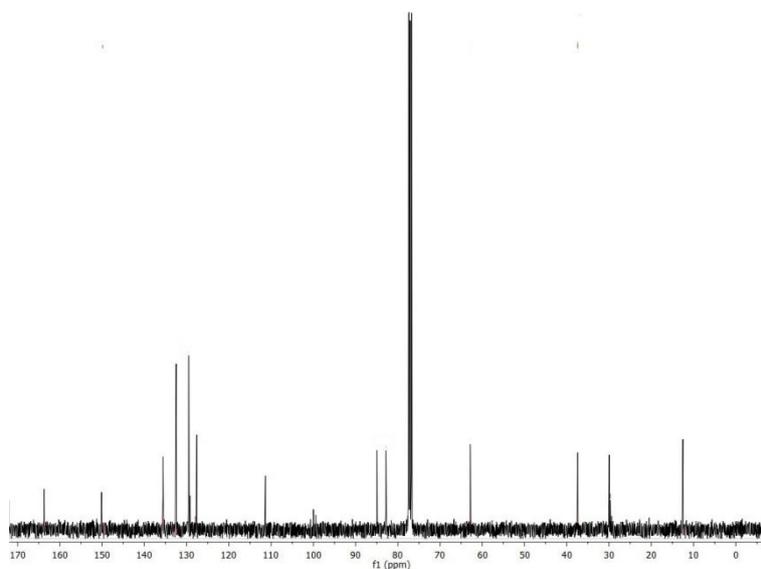
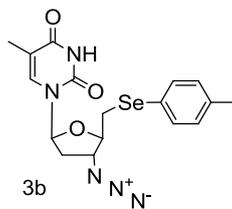
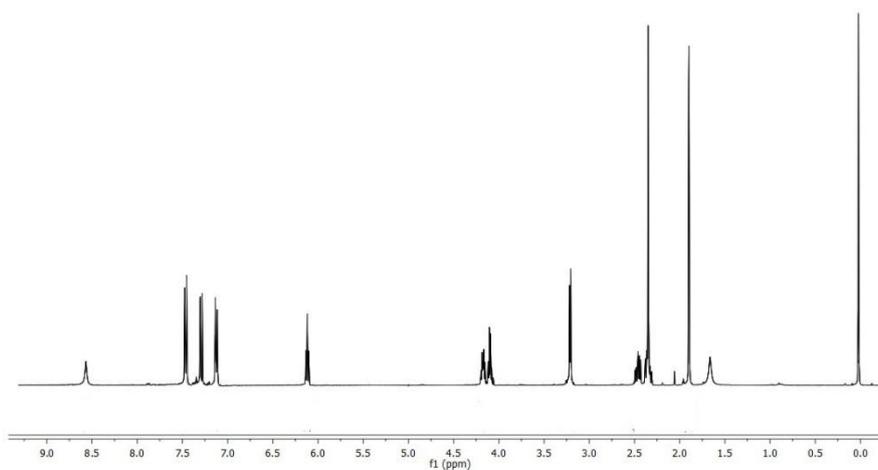


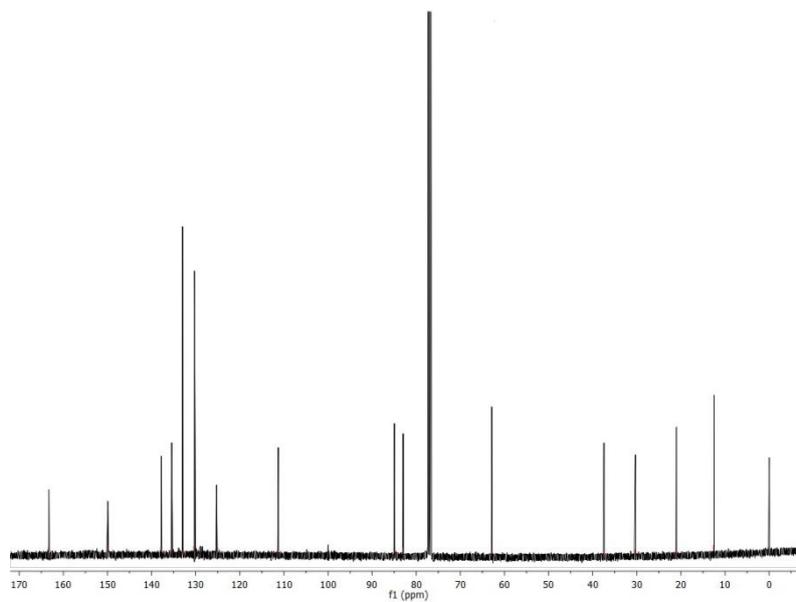
Figure S8.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 3a ( $\text{CDCl}_3$ ).



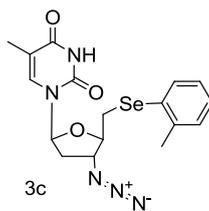
$\delta_{\text{H}}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 8.57 (s, 1H), 7.46 (d,  $J = 8.08$  Hz, 2H), 7.30 (d,  $J = 1.14$  Hz, 1H), 7.13 (d,  $J = 7.82$  Hz, 2H), 6.12 (t,  $J = 6.53$  Hz, 1H), 4.21 – 4.05 (m, 3H), 3.23 – 3.20 (m, 2H), 2.49 – 2.43 (m, 1H), 2.35 (s, 3H), 1.90 (s, 3H).  $\delta_{\text{C}}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 163.39, 149.86, 137.92, 135.35, 132.79, 130.46, 125.06, 111.53, 84.68, 83.04, 62.90, 37.47, 30.42, 21.09, 12.68. Yield: 82%. Exact Mass: 421,0653. HRMS ( $m/z$ ): 422.0723.



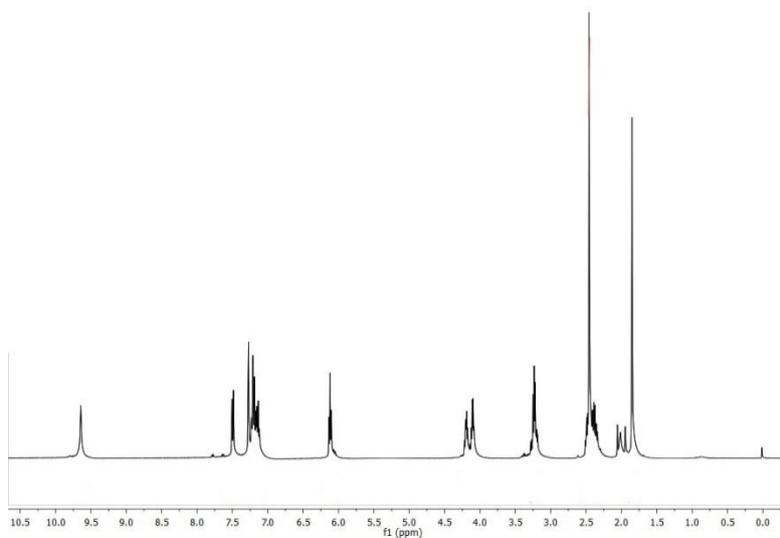
**Figure S10.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 3b ( $\text{CDCl}_3$ ).



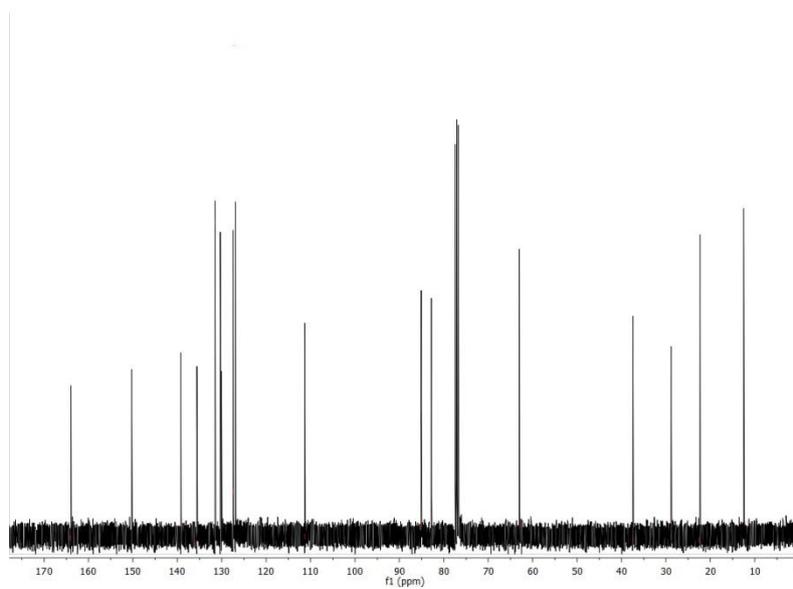
**Figure S10.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 3b ( $\text{CDCl}_3$ ).



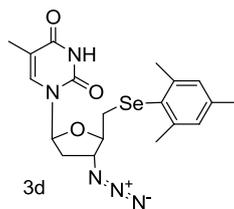
$\delta_{\text{H}}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  9.64 (s, 1H), 7.49 (d,  $J = 7.70$  Hz, 1H), 7.23 – 7.13 (m, 4H), 6.12 (t,  $J = 6.50$  Hz, 1H), 4.22 – 4.08 (m, 3H), 3.27 – 3.20 (m, 2H), 2.46 (s, 3H), 1.85 (s, 3H).  $\delta_{\text{C}}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 164.05, 150.28, 139.09, 135.73, 131.51, 130.33, 127.40, 126.91, 111.25, 84.94, 82.72, 62.86, 37.47, 28.73, 22.49, 12.24. Yield: 80%. Exact Mass: 421,0653. HRMS ( $m/z$ ): 422.0732.



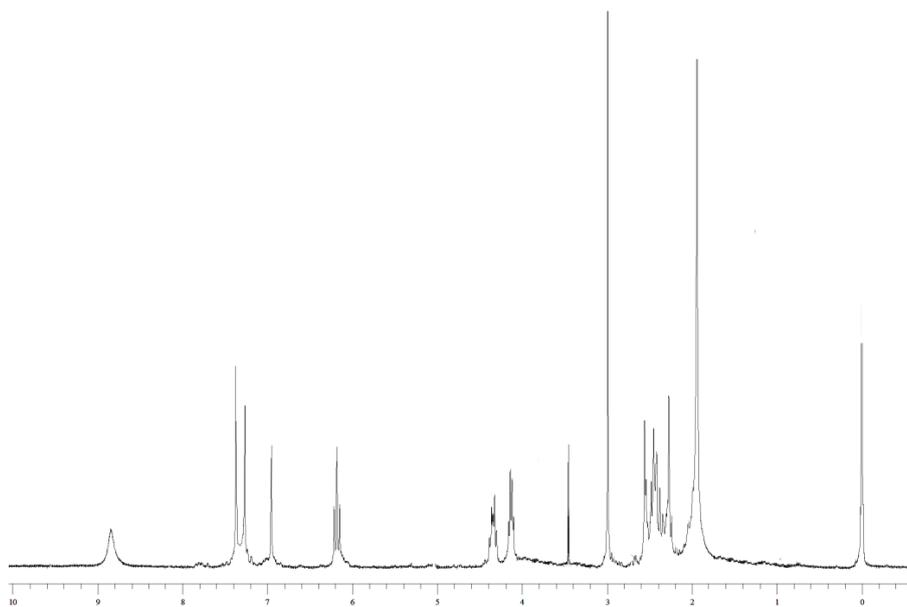
**Figure S12.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 3c ( $\text{CDCl}_3$ ).



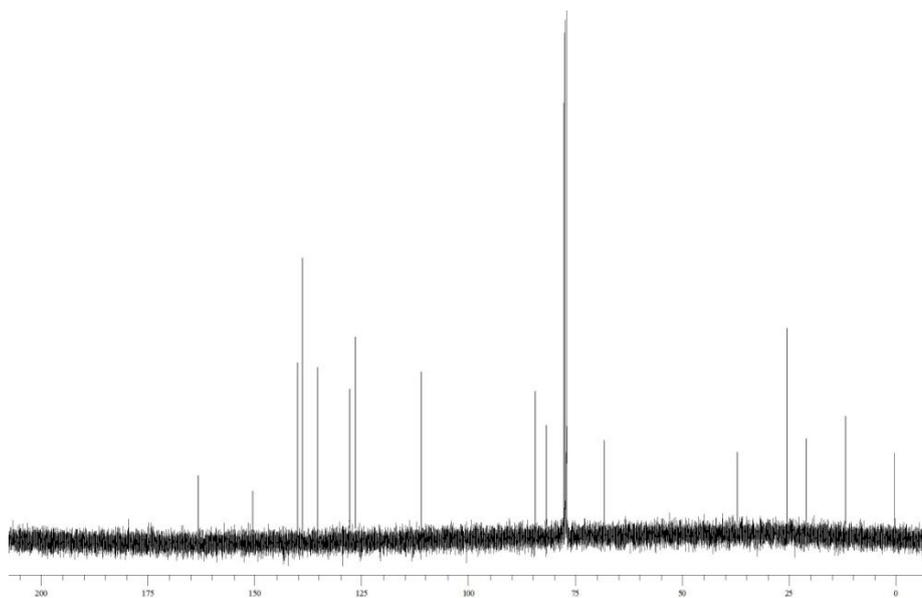
**Figure S12.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 3c ( $\text{CDCl}_3$ ).



$\delta_{\text{H}}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 8.85 (s, 1H), 7.38 (s, 2H), 6.18 (t,  $J = 6.6$  Hz, 1H), 4.34- 4.13 (m, 3H), 3.84 (m, 2H), 2.99 (s, 3H), 1.94 (s, 9H), 1.25 (s, 1H).  $\delta_{\text{C}}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 163.51, 150.06, 135.36, 128.85, 111.54, 97.60, 84.98, 82.56, 68.83, 68.79, 68.74, 61.11, 44.43, 42.67, 37.46, 29.68, 24.44, 12.64. Yield: 62%. Exact Mass: 449,0966. HRMS ( $m/z$ ): 450,1925.



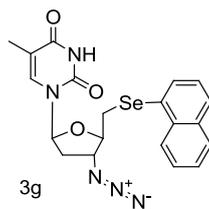
**Figure S14.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 3d ( $\text{CDCl}_3$ ).



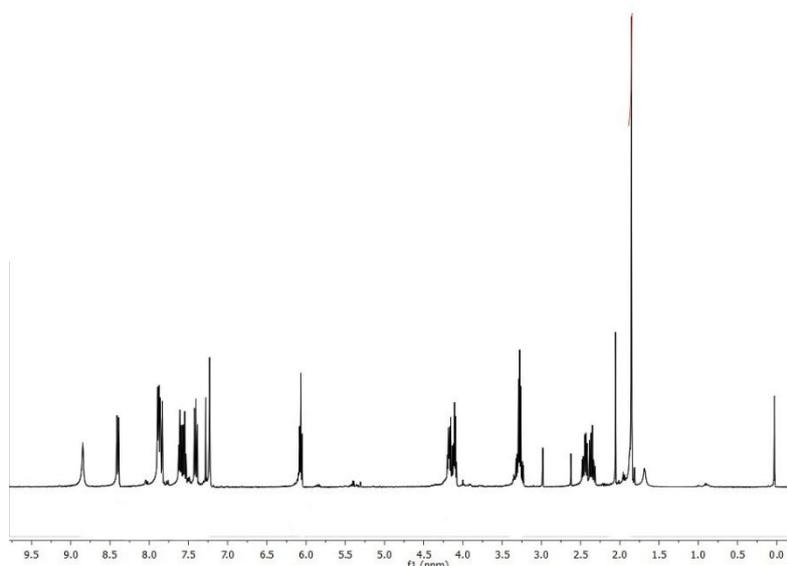
**Figure S14.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 3d ( $\text{CDCl}_3$ ).



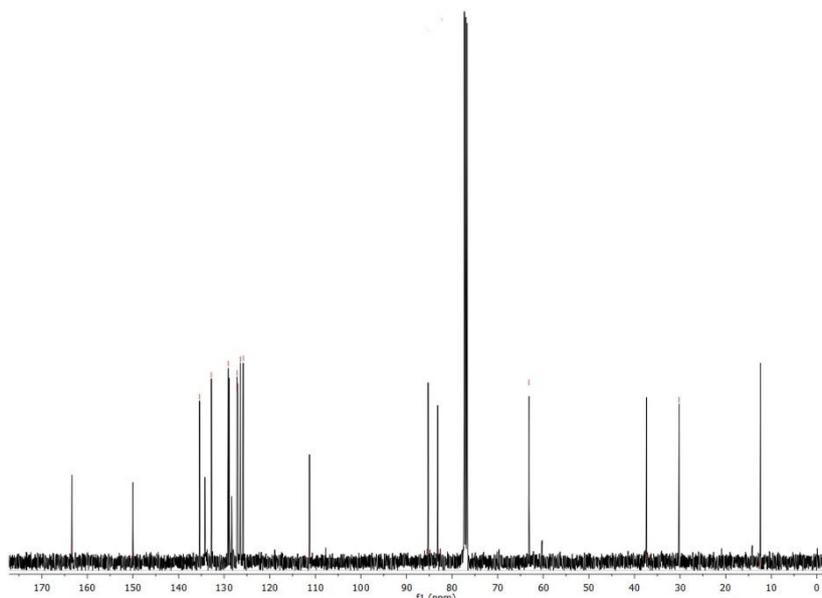




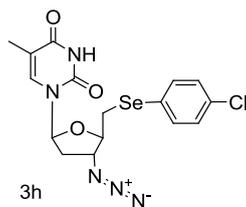
$\delta_{\text{H}}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 8.85 (s, 1H), 8.40 (d,  $J = 8.29$  Hz, 1H), 7.91 – 7.83 (m, 3H), 7.63 – 7.52 (m, 2H), 7.40 (dd,  $J = 7.27, 8.11$  Hz, 1H), 7.23 (d,  $J = 1.17$  Hz, 1H), 6.07 (t,  $J = 6.53$  Hz, 1H), 4.19 – 4.09 (m, 2H), 3.33 – 3.23 (m, 2H), 2.48 – 2.32 (m, 2H), 1.86 (s, 3H).  $\delta_{\text{C}}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 163.44, 149.87, 135.40, 132.79, 129.09, 127.18, 126.99, 126.44, 125.81, 111.23, 85.50, 83.01, 63.12, 37.30, 30.20, 12.22. Yield: 74%. Exact Mass: 457.0653. HRMS ( $m/z$ ): 458.0384.



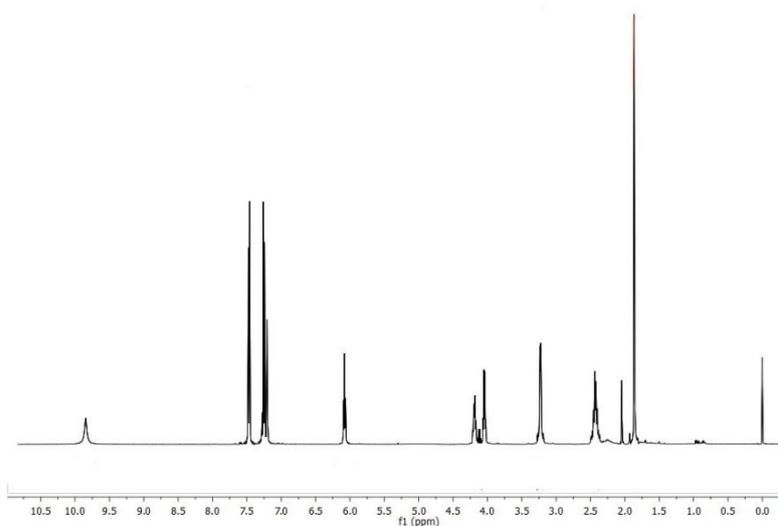
**Figure S20.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 3g ( $\text{CDCl}_3$ ).



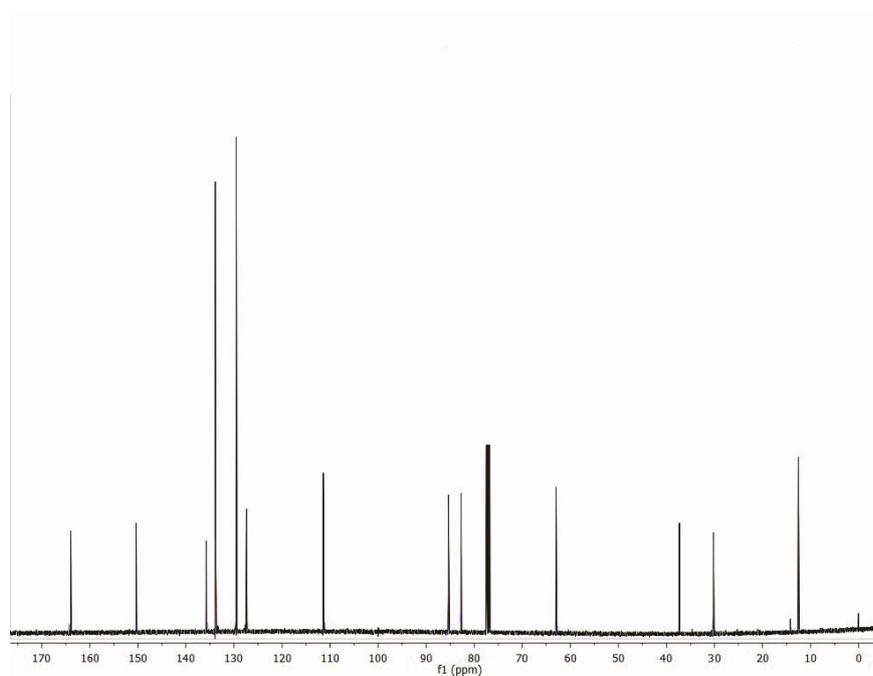
**Figure S20.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 3g ( $\text{CDCl}_3$ ).



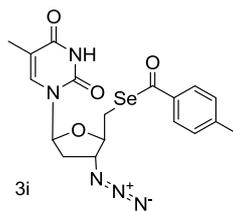
$\delta_{\text{H}}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 9.85 (s, 1H), 7.49 – 7.45 (m, 2H), 7.27 – 7.23 (m, 2H), 7.21 (s, 1H), 6.08 (t,  $J = 6.43$  Hz, 1H), 4.22 – 4.01 (m, 2H), 3.28 – 3.18 (m, 2H), 2.49 – 2.36 (m, 2H), 1.86 (s, 3H).  $\delta_{\text{C}}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 164.25, 150.35, 135.56, 133.98, 129.70, 127.22, 111.15, 85.25, 82.75, 62.71, 37.41, 30.04, 12.40. Yield: 89%.  
Exact Mass: 441.0107. HRMS ( $m/z$ ): 442.0287.



**Figure S22.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 3h ( $\text{CDCl}_3$ ).



**Figure S22.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 3h ( $\text{CDCl}_3$ ).



$\delta_{\text{H}}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 9.90 (s, 1H), 7.96 (dd,  $J = 8.15, 16.40$  Hz, 3H), 7.24 (s, 2H), 6.19 (t,  $J = 6.44$  Hz, 1H), 4.61 (ddd,  $J = 3.38, 12.46, 26.04$  Hz, 2H), 4.31 (m, 2H), 2.62 – 2.49 (m, 1H), 2.42 (s, 3H), 1.69 (s, 3H).  $\delta_{\text{C}}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  12.4, 21.3, 21.9, 38.1, 62.8, 83.4, 86.2, 110.9, 129.5, 129.8, 133.7, 136.6, 144.2, 150.8, 163.7, 190.1. Yield: 65%. Exact Mass: 449.0602. HRMS ( $m+Na$ ): 473.0582.

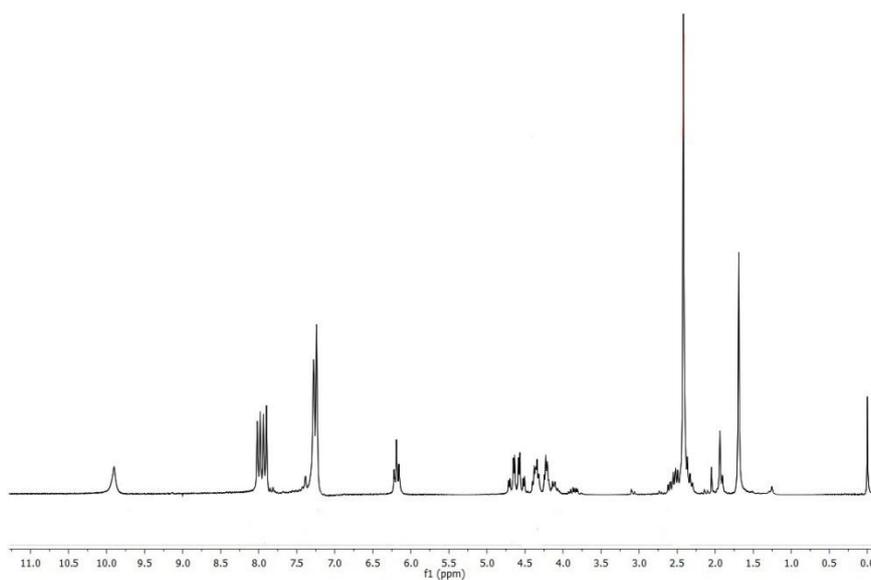


Figure S24.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 3i ( $\text{CDCl}_3$ ).

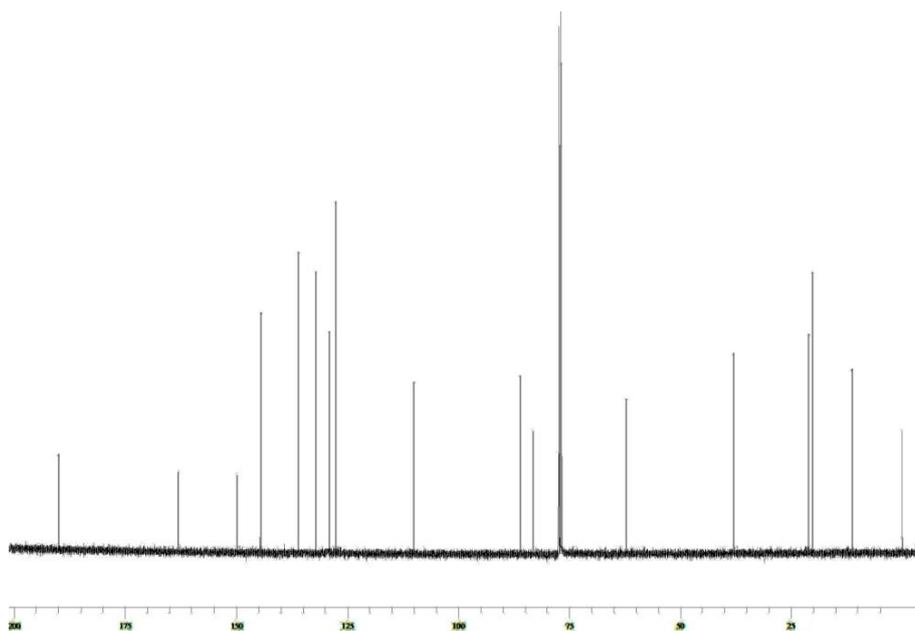
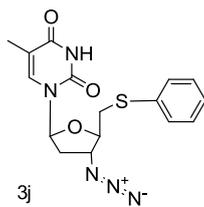


Figure S24.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 3i ( $\text{CDCl}_3$ ).



$\delta_{\text{H}}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 9.51 (s, 1H), 7.42 (d,  $J = 7.54$  Hz, 2H), 7.33 (t,  $J = 7.56$  Hz, 2H), 7.27 – 7.22 (m, 2H), 6.11 (t,  $J = 6.49$  Hz, 1H), 4.29 – 4.06 (m, 2H), 3.31 (t,  $J = 7.13$  Hz, 2H), 2.49 – 2.36 (m, 2H), 1.84 (s, 3H).  $\delta_{\text{C}}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 164.03, 150.28, 135.62, 134.92, 129.29, 127.05, 111.24, 85.20, 82.55, 62.23, 37.38, 36.26, 12.35. Yield: 92%. Exact Mass: 359.1052. HRMS ( $m + \text{Na}$ ): 382.0875.

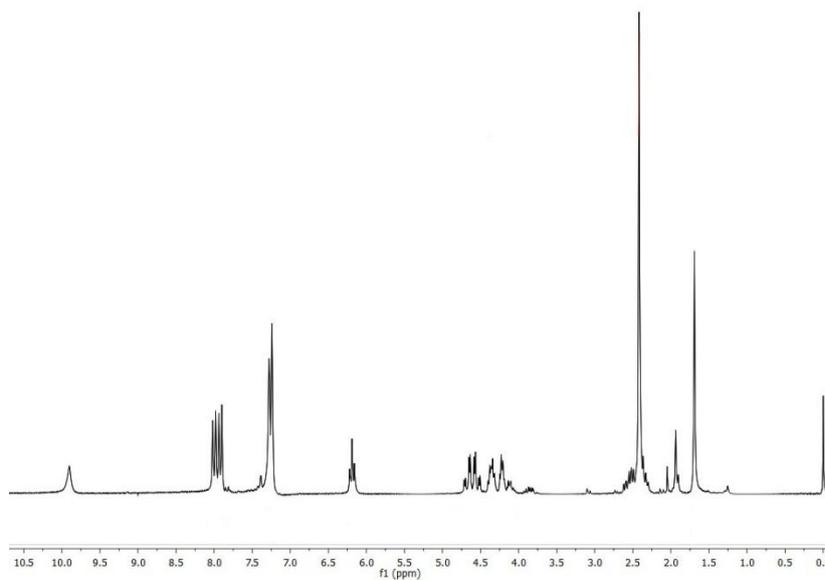


Figure S26.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 3j ( $\text{CDCl}_3$ ).

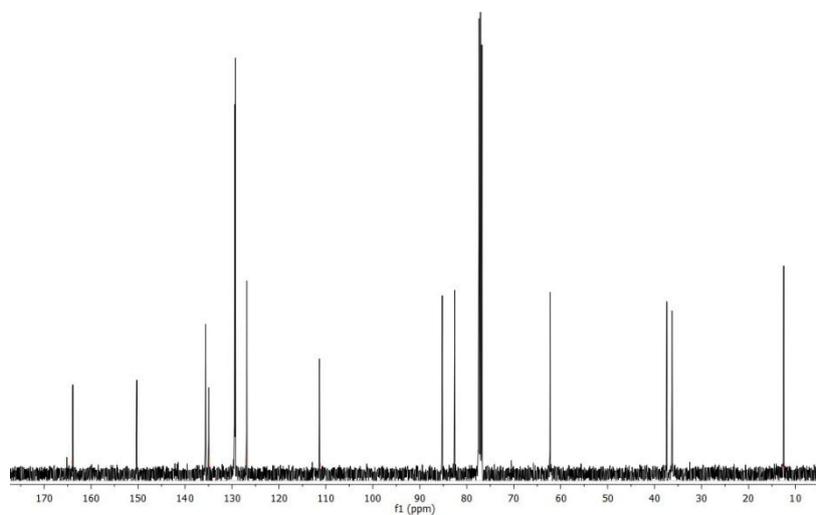
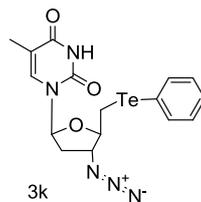
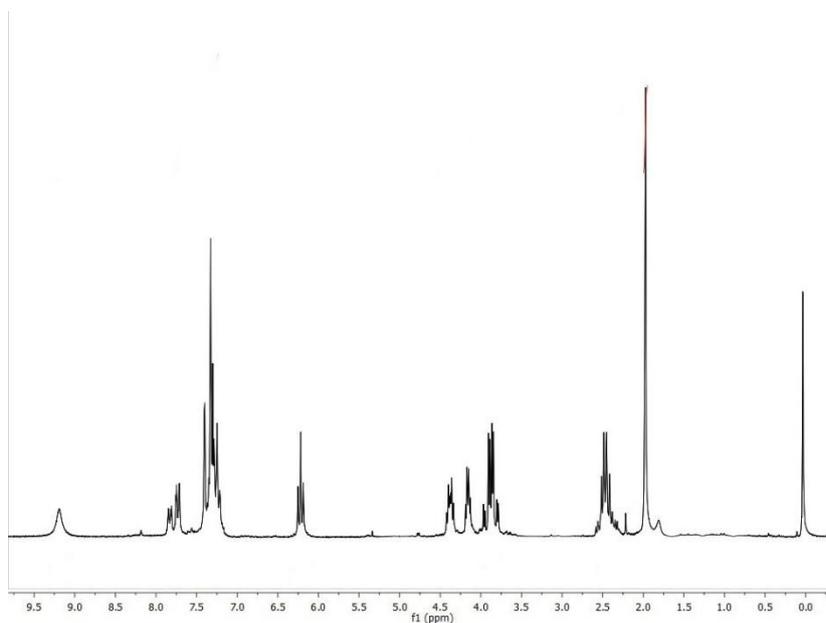


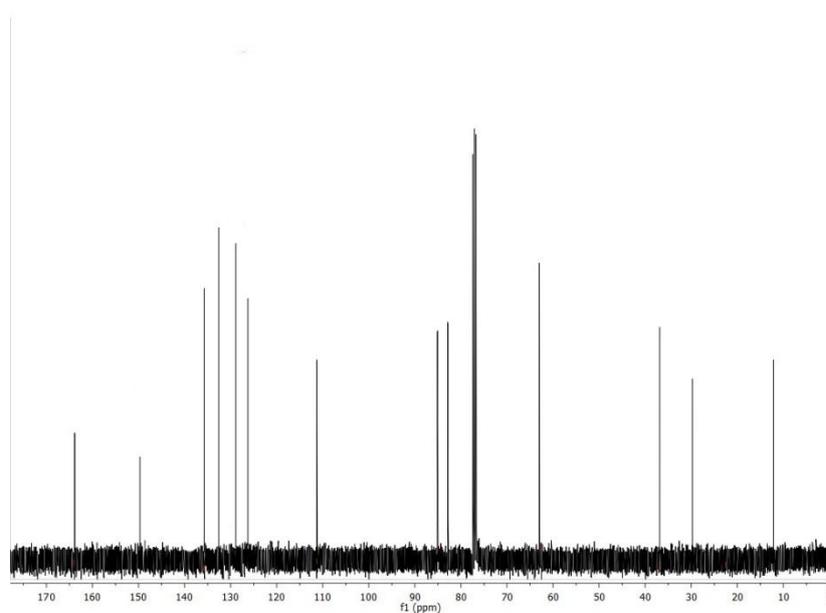
Figure S26.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 3j ( $\text{CDCl}_3$ ).



$\delta_{\text{H}}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 9.22 (s, 1H), 7.87 – 7.70 (m, 1H), 7.40 (d,  $J = 1.19$  Hz, 1H), 7.29 (dd,  $J = 6.52, 9.57$  Hz, 4H), 6.22 (t,  $J = 6.61$  Hz, 1H), 4.42 – 4.12 (m, 2H), 3.95 – 3.79 (m, 2H), 2.47 (dd,  $J = 6.26, 13.31$  Hz, 2H), 1.98 (s, 3H).  $\delta_{\text{C}}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 163.44, 149.87, 135.40, 132.79, 129.09, 127.18, 126.99, 126.44, 125.81, 111.23, 85.50, 83.01, 63.12, 37.30, 30.20, 12.22. Yield: 76%. Exact Mass: 457.0394. HRMS ( $m + \text{Na}$ ): 480.0218.

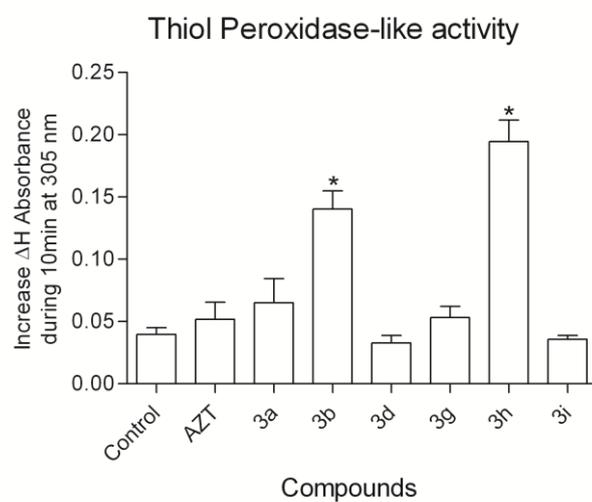
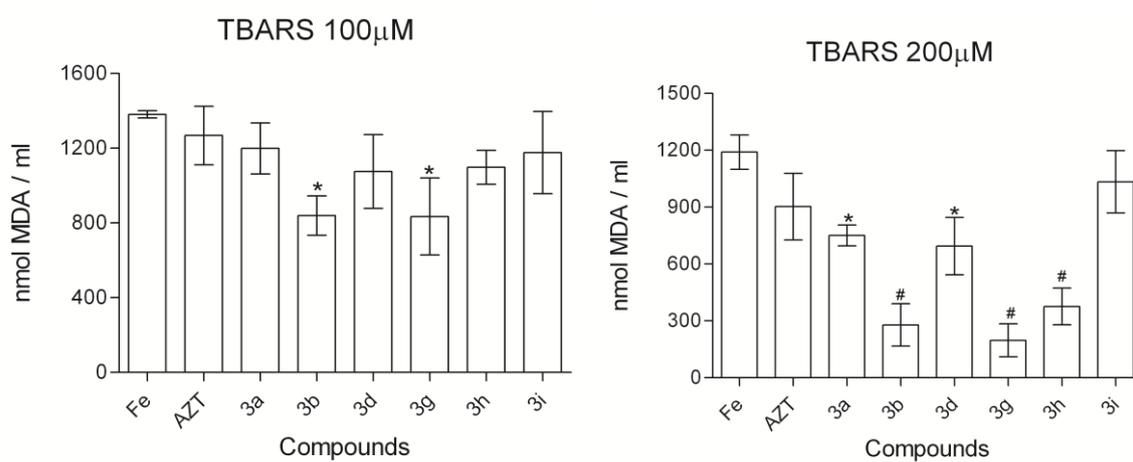
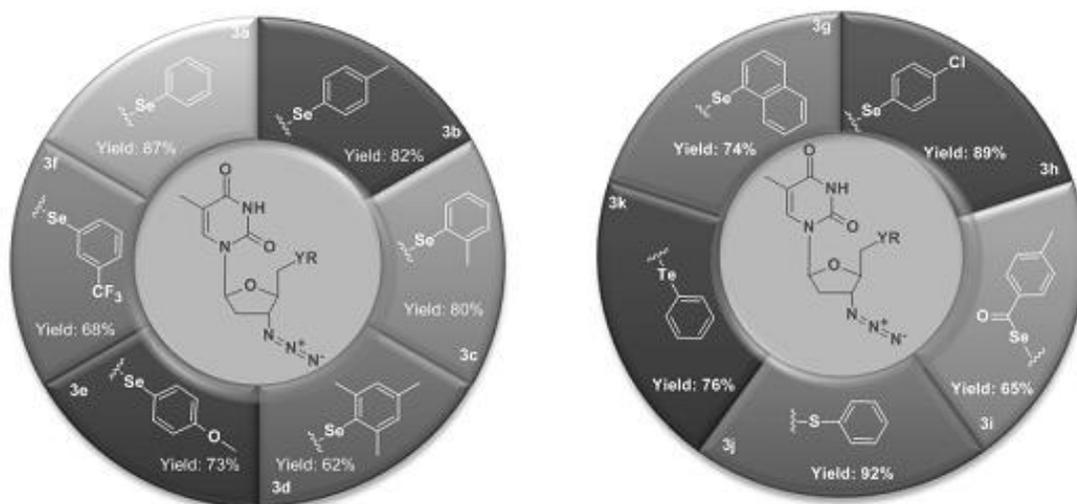


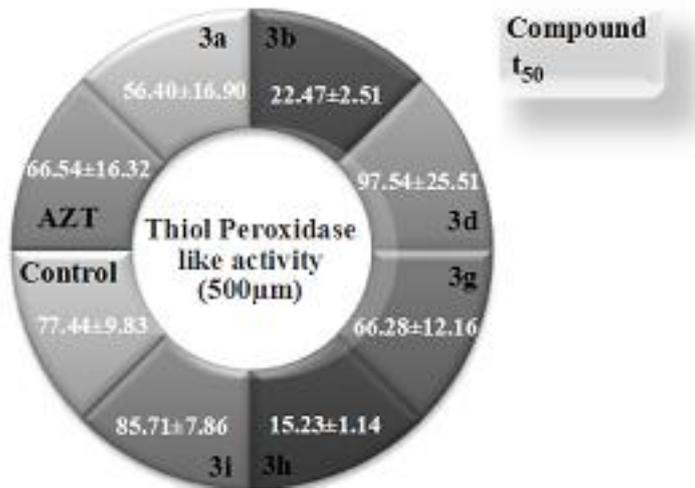
**Figure S28.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 31 ( $\text{CDCl}_3$ ).



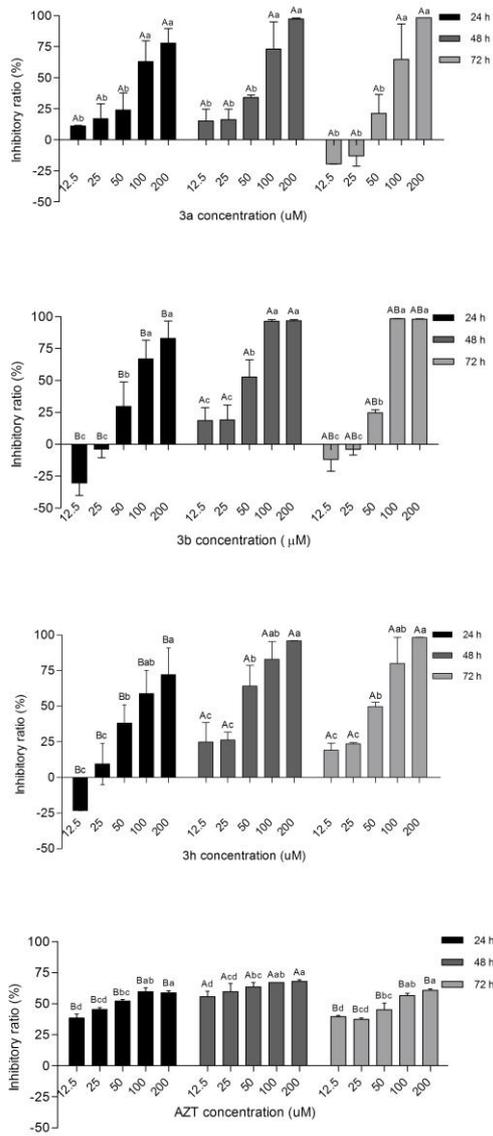
**Figure S28.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 31 ( $\text{CDCl}_3$ ).

## 6. Figures

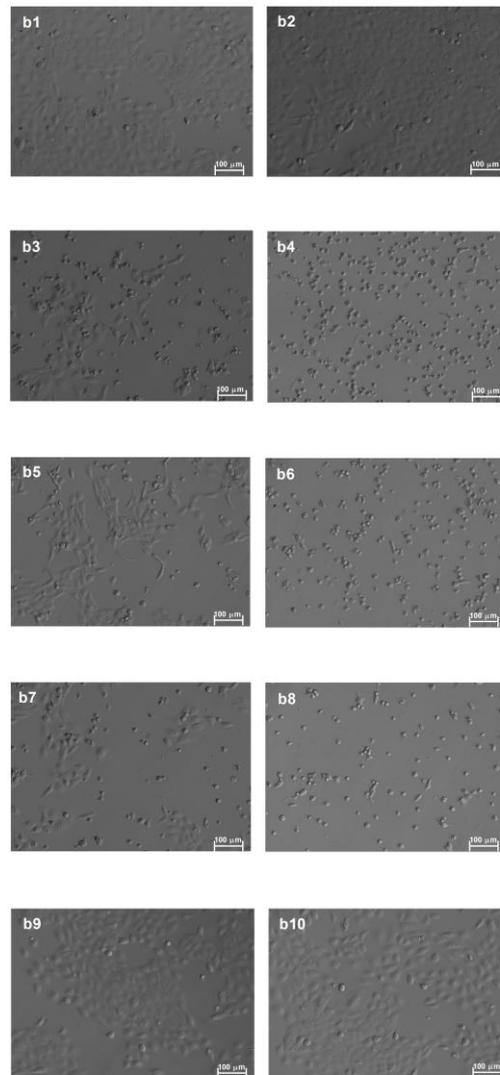


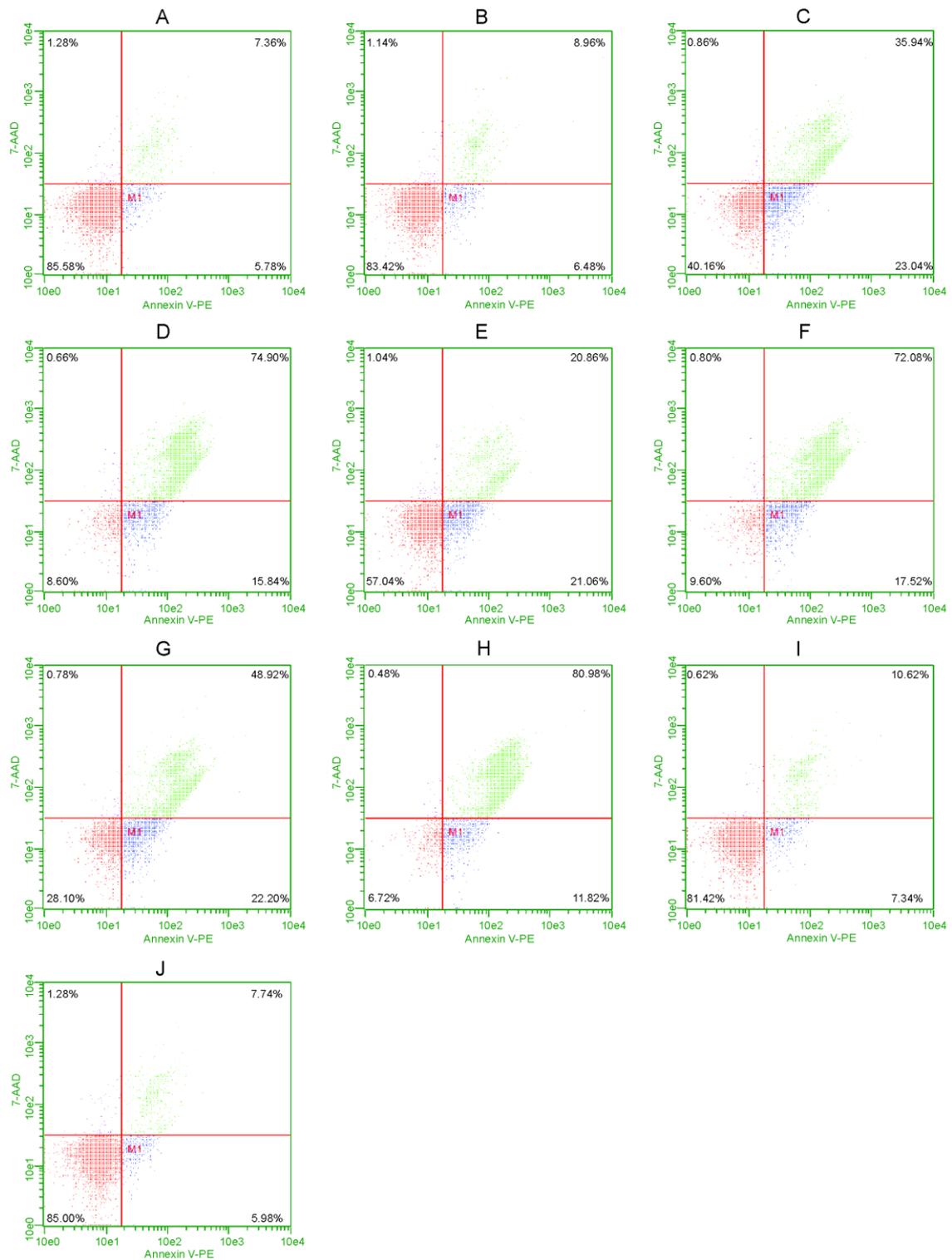


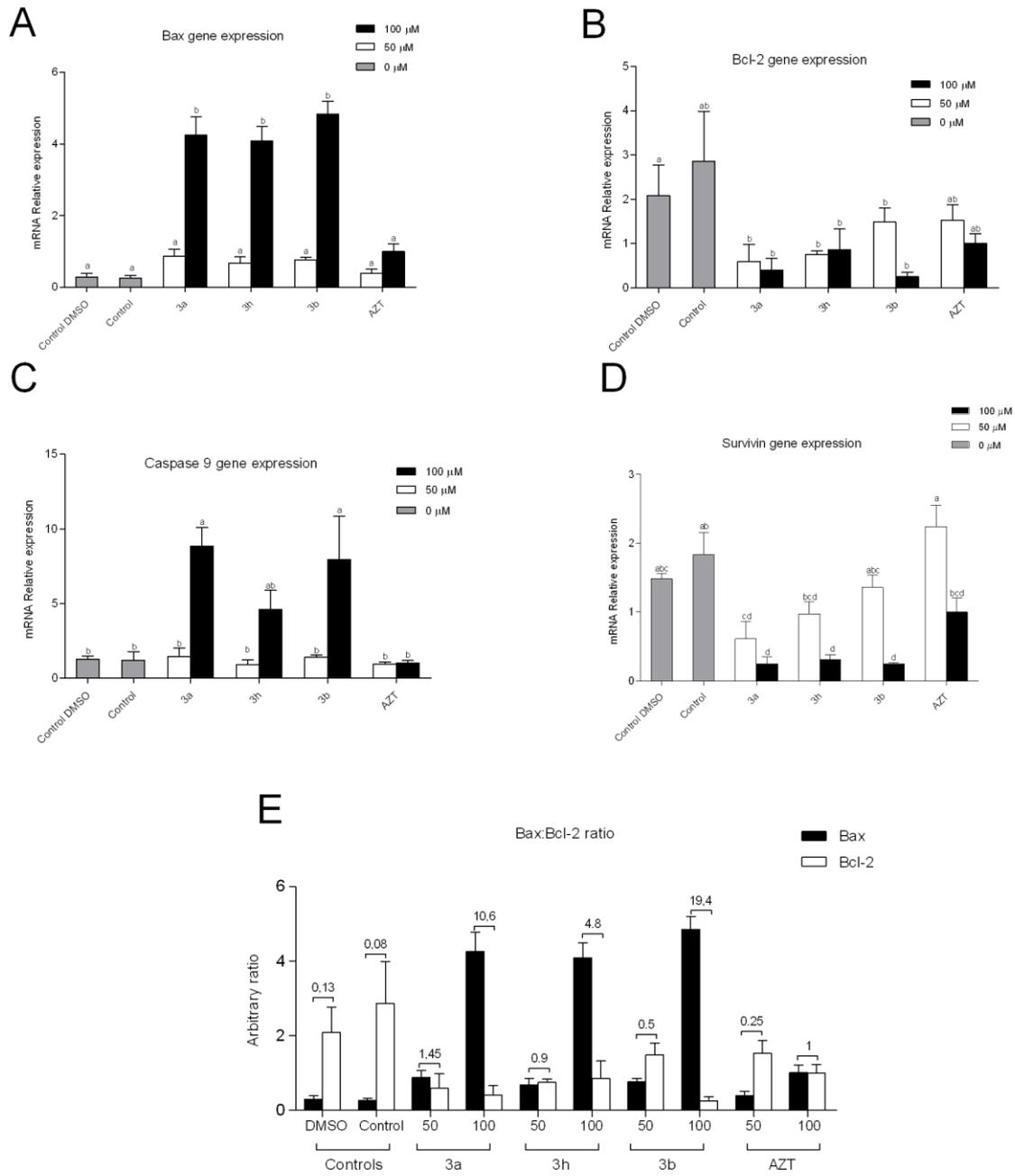
A



B







## 7. References

D. Ali, R.S. Ray, R.K. Hans, *Toxicol. Lett.* **2010**, 30, 199, 193-200.

V.F. Campos, T. Collares, J. Deschamps, F. Seixas, O. Dellagostin, C. Lanes, J. Sandrini, L. Marins, M. Okamoto, L. Sampaio, R. Robaldo, *J. Biosciences.* **2010**, 35, 405-413

V.F. Campos, E.R. Komninou, G. Urtiaga, P.M. de Leon, F.K. Seixas, O.A. Dellagostin, J.C. Deschamps, T. Collare, *Theriogenology.* **2011**, 75, 1476-1481.

B. Chen, X. Wang, W. Zhao, J. Wu. *J. Experimental & Clin. Cancer Res.* **2010**, 29, 99.

A. Gross, J. M. McDonnell, S. J. Korsmeyer. *Genes Dev.* **1999**, 13, 1899-1911

L. HU, Y. Sun, J. Hu, *Eur. J. Pharmacol.* **2010**, 628, 155-163.

T.C. Huang, H.-C. Huang, C.-C. Chang, H.-Y. Chang, C.-H. Ou, C.-H. Hsu, S.-T. Chen, H.-F. Juan. *FEBS Lett.* **2007**, 581, 3517-3522.

D. Zheng, Y. Wang, D. Zhang, Z. Liu, C. Duan, L. Jia, F. Wang, Y. Liu, G. Liu, L. Hao, Q. Zhang, *Cancer Lett.* **2011**, 28, 307, 158-64.

## 9.2 Artigo 2

### **“Genotoxic and antioxidant activities of new organoseleno compounds analogs of AZT”**

Mariano D. O. C.<sup>a</sup>, Souza D.<sup>a</sup>, Meinerz D. F.<sup>a</sup>, Allebrandt J.<sup>a</sup>, Rodrigues  
O. E. D.<sup>a</sup>, Rocha J. B. T.<sup>a\*</sup>

GENOTOXIC AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF NEW  
ORGANOSELENOCOMPOUNDS ANALOGS OF AZT

Mariano D. O. C.<sup>a</sup>, Souza D.<sup>a</sup>, Meinerz D. F.<sup>a</sup>, Allebrandt J.<sup>a</sup>,

Rodrigues O. E. D.<sup>a</sup>, Rocha J. B. T.<sup>a\*</sup>

***<sup>a</sup> Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas,  
Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, CEP 97105-900, Brazil***

\*Correspondence should be sent to:

João Batista Teixeira da Rocha

Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Química

Avenida Roraima, Prédio 18, Santa Maria, RS, Brazil

CEP 97105-900

Fone: 55-55 3220 8140

Fax: 55-55 3220 8978

E-mail: [jbtrocha@yahoo.com.br](mailto:jbtrocha@yahoo.com.br)

**Abstract:**

Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) is a worldwide disease characterized by impairments of immune function. AIDS is also associated with oxidative stress that can be linked to selenium (Se) deficiency. Se is fundamental for the synthesis of selenoproteins, such as Glutathione peroxidase (GPx) and Thioredoxin Reductase (TrxR). These enzymes catalyze the decomposition of ROS and contribute to maintain an equilibrium in cell redox status. Literature data indicate that organoselenium compounds, such as ebselen and diphenyl diselenide, have antioxidant properties *in vitro* and *in vivo* models associated with oxidative stress. Here we tested the potential antioxidant, cytotoxic and genotoxic properties of 7 selenium-containing analogs of Azidothymidine (AZT), a prototypal anti-HIV drug. Three compounds (C3, C5 and C6) exhibited antioxidant activities against Fe(II)-induced lipid peroxidation (as determined by thiobarbituric acid reactive substance; TBARS) in brain homogenates and glutathione peroxidase-like activity in a chemical model of the native enzyme. C6 increased the rate of dithiothreitol (DTT) oxidation (thiol oxidase activity) and C3 and C5 (at 100  $\mu$ M) increased DNA damage index in human leukocytes. Moreover, C6 (200  $\mu$ M) decreased human leukocyte viability to about 50%. Taken together, these results indicated the low *in vitro* toxicity and the pharmacological potential of some selenium-containing analogs of AZT as antioxidant agents. Consequently, the potential inhibitory effects of these compounds against HIV reverse transcriptase can be highly informative and can indicate whether or not the toxicity of these compounds should be investigated in rodents.

## Highlights

AIDS is associated with oxidative stress and may be linked to Se deficiency.

We studied the potential antioxidant and genotoxic properties of new Se-AZT analogs.

Se-AZT analogs exhibited antioxidant properties.

Se-AZT analogs had low toxicity to human leukocytes.

The study of inhibition of HIV reverse transcriptase by Se-AZT analogs is required.

**KeyWords:** AZT, DNA damage, GPx-like activity, Organoselenium compounds, selenium-containing-AZT analogs, Thioredoxin Reductase.

## 1. Introduction

Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) is a worldwide known disease characterized by progressive depletion of the CD4C helper/inducer subset of T lymphocytes, which leads to severe impairment of immune function (1, 2). In addition, AIDS can be associated with depletion of antioxidant system and an increase in the oxidative stress (OS) (3 - 7), which is defined as an imbalance of oxidants and antioxidants in favor of the oxidants (8 - 13).

Another factor that can contribute to the progression of OS is a decrease in total body content of Selenium (Se) in HIV patients (14 - 16). Se is involved in the synthesis of important organic molecules, including the rare amino acid selenocysteine (17-19). This amino acid is present in selenoproteins and selenoenzymes, such as Glutathione peroxidase (GPx) and Thioredoxin Reductase (TrxR), which are involved in the maintenance of equilibrium between the production and decomposition of reactive oxygen species (ROS) in the body (20 - 23).

In the last four decades, the synthesis and the search for new organoselenium compounds with potential antioxidant properties has been increased (for comprehensive reviews see 24-25 and 26-29). Ebselen and diphenyl diselenide, two organoselenium compounds that have been extensively studied in the literature (24, 25, 28) present antioxidant effects in different *in vitro* and *in vivo* models associated with oxidative stress. The mechanisms involved in their antioxidant activity are related to their transformation to selenol intermediates (see fig. 1) either via their direct reduction by endogenous reduced thiols (normally GSH, pathway 2 in fig. 1) or via a catalyzed reaction involving TrxR (pathway 1 in fig. 1) (28 - 32). The

selenol intermediates can then decompose potentially toxic peroxides (fig. 1). However, selenocompounds can react and oxidize a variety of thiols groups without a concomitant degradation of peroxides (33, 34) and can induce toxicity in mammals (24, 25, 35).

In this context, we have investigated the *in vitro* antioxidant potential of seven organoselenium compounds, which are analogs of 1-[(2*R*,4*S*,5*S*) – 4 – azido 5 -(hydroxymethyl) oxolan-2-yl]-5-methyl-1,2,3,4 tetrahydro pyrimidine - 2,4 -dione (AZT). This study is important because new AZT analogs can be of pharmacological significance for AIDS treatment. In fact, new AZT analogs containing Se could provide antioxidant protection either via decomposition of peroxides or via an increase in the body burden of Se, in addition to inhibiting the virus reproduction.

## 2. Material and methods

### 2.1. Chemicals

Dimethyl sulfoxide (DMSO), Thiobarbituric Acid (TBA), Malondialdehyde (MDA), Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH), Dithiothreitol (DTT), 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (Ellman's reagent or DTNB) were obtained from Sigma (St. Louis, MO). All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

### 2.2. Compounds

Compounds 1-7 were prepared according to Souza et al. (36).

- Compound 1: 1-((2*S*, 4*R*, 5*R*)-4-azido-5-(phenylselanyl)methyl) tetrahydrofuran-2-yl)-5-methylpyrimidine-2,4(1*H*, 3*H*)-dione;

- Compound 2: 1-((2S, 4R, 5R)-4-azido-5-(mesitylselanylmethyl) tetrahydrofuran-2-yl)-5-methylpyrimidine-2,4(1H, 3H)-dione;
- Compound 3: 1-((2S,4R,5R)-4-azido-5-(((4-methoxyphenyl) selanyl)methyl) tetrahydrofuran-2-yl)-5-methylpyrimidine-2,4(1H,3H)-dione;
- Compound 4: 1-((2S, 4R, 5R) – 4 - azido – 5 -((naphthalene-1-ylselanyl)methyl) tetrahydrofuran-2-yl)-5-methylpyrimidine-2,4(1H, 3H)-dione;
- Compound 5: 1-((2S, 4R, 5R)-4-azido-5-((4-chlorophenylselanyl) methyl) tetrahydrofuran-2-yl)-5 methylpyrimidine -2, 4 (1H, 3H) - dione;
- Compound 6: 1-((2S, 4R, 5R)-4-azido-5-(*p*-tolylselanylmethyl) tetrahydrofuran-2-yl)-5-methylpyrimidine-2,4(1H, 3H)-dione;
- Compound 7: 1- ((2R,3R,5R)3-azido-5 -(5methyl- 2,4 – dioxo - 3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)tetrahydrofuran-2-yl)methyl 4-methylbenzoselenoate;
- 1-[(2R,4S,5S) – 4 – azido 5 -(hydroxymethyl) oxolan-2-yl]-5-methyl-1,2,3,4 tetrahydro pyrimidine - 2,4 -dione (AZT) ® was used.

### 2.3. Blood Samples

Heparinized venous blood was obtained from healthy volunteer donors from the Hospital of Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil (age 30±12). The protocol of study was reviewed and approved by the appropriate institutional review board from Guidelines of the Committee of UFSM (0089.0.243.000-07).

### **2.3.1. Leukocyte Isolation**

Peripheral blood leukocytes were isolated and adjusted to  $2 \times 10^6$  leukocytes/mL with HBSS/heparin, according Santos et al. (37).

### **2.3.2. Comet assay**

Comet assay was performed according to Santos et al. (37). Leukocytes were incubated for 3 h, at 37°C, with AZT analogs (100  $\mu$ M) or DMSO (vehicle) (final concentration 0.05 %). One hundred randomly selected cells per sample were scored visually by 3 independent individuals, which were blind to the treatments. Cell damage was scored according to tail intensity into five classes (0 for undamaged and 4 for highly damaged cells). Index Damage (ID) was calculated using the formula:  $(n_1 \times 1 + 2n_2 \times 2 + 3 \times n_3 + 4n_4)$ , in arbitrary units (a.u.).

### **2.3.3. Cell viability assay**

The percentage of viable cells was measured according Santos et al. (34). Leukocytes were incubated for 3 h, at 37°C, with DMSO (vehicle) (final concentration 0.05 %) or AZT analogs (5, 25, 50, 75, 100 and 200  $\mu$ M). An aliquot of samples was added in a medium containing HBSS and 0.04% of trypan blue. Cell viability was calculated as the number of living cells divided by the total number of cells multiplied by 100.

## **2.4. Animals**

Adult male Wistar rats (250 – 350 g) from our own breeding colony (Animal House-holding, UFSM, Brazil) were maintained in room with controlled temperature (22-25°C), on a 12-h light/dark cycle, with water and food *ad*

*libitum*. Animals were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources from Federal University of Santa Maria (23081.002435/2007-16)

#### **2.4.1. Tissue preparation**

Animals were killed by decapitation. Brains were removed and homogenized in 10 mM Tris–HCl buffer, pH 7.4 (1/10, w/v), and centrifuged at 490 x g for 10 min. The low speed supernatant fraction (S1) was maintained in ice until the assay of TBARS.

Isolation of TrxR was made according Hill et al. (38). Livers were removed and homogenized with buffered saline (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), pH 7.3 (1/18, w/v) and centrifuged at 13000 x g for 30 min at 4°C. Supernatant fraction was dialyzed in 100 volumes of buffered saline for 24 h to remove endogenous low molecular weight thiols. The dialyzed mixture was heated at 55 °C for 10 min, cooled, and centrifuged again at 13000 x g for 30 min at 4°C to remove denatured protein. Finally, supernatant fraction was collect and kept frozen (for a maximum of one month).

#### **2.4.2. Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS assay)**

Thiobarbituric reactive substances were determined in brain homogenates as described by Ohkawa et al. (39) and Puntel et al. (40). Diphenyl diselenide (PhSe)<sub>2</sub> was used as a positive control. The amount of TBARS produced was measured at 532 nm, using MDA as a standard curve.

### **2.4.3. Thioredoxin reductase (TrxR) activity**

TrxR activity of AZT and selenium analogs was evaluated according to Zhao and Holmgren (30) as modified by Freitas et al. (41). TrxR activity was performed in a buffer containing 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5, 100  $\mu$ L of TrxR (10  $\mu$ g protein/mL of reaction medium) and 10  $\mu$ M of 10 mM NADPH. Enzyme reaction was started with the addition of 5  $\mu$ L DMSO (vehicle) or compounds (final concentration of 5 or 20  $\mu$ M). Diphenyl diselenide was used as a positive control and diphenyl diselenide plus gold chloride ( $\text{AuCl}_3$ ) as negative control. NADPH oxidation was monitored for 10 min at 340nm (decrease in NADPH absorbance via its oxidation).

### **2.5. Thiol Peroxidase-like activity assay**

The thiol peroxidase-like activity was evaluated according to the method of Iwaoka and Tomoda (42), using benzenethiol (PhSH) as a glutathione alternative. Benzenethiol (15 mM) was mixed with AZT or selenium-containing analogs (100-400  $\mu$ M) and the oxidation of benzenethiol was followed at 305nm for 3 min. The thiol-peroxidase like assay was started by adding hydrogen peroxide (final concentration of 20 mM) in methanol solution.

### **2.6. Thiol oxidase activity assay**

Oxidation of 1mM DTT was determined in a medium containing 30 mM Tris-HCl, pH 7.4, in the absence or in the presence of AZT or selenium-containing analogs (100  $\mu$ M). The oxidation of -SH groups of DTT as function of time was quantified using the Ellman's reagent as described in Rocha et al. (43).

## **2.7. Statistical analysis**

Statistical analysis was performed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Duncan's multiple range test when appropriate. All values were presented as Mean  $\pm$  S.E.M. (standard error of mean) and the differences were considered significant when  $p < 0.05$ .

## **3. Results**

### **3.1. DNA damage in blood leucocytes**

At a final concentration of 100  $\mu$ M, compounds 4, 5 and 7 caused a significantly decrease in the frequency of undamaged cells and an increase in the frequency of cells in the level 4 of DNA damage in human leukocytes when compared to control group ( $p < 0.01$ ; table 1). Compound 7 also caused an increase in the frequency of cells in the level 1 of DNA damage ( $p < 0.05$ ; table 1).

### **3.2. Cell viability assay**

Human leukocytes viability were decreased by compounds C1-C6 and AZT ( $p < 0.01$ ; table 2). However, compound 6 was more toxic to leukocytes than the other analogs; whereas compound 7 had no toxicity to leukocytes (table 2).

### **3.3. Lipid peroxidation assay**

At 100  $\mu$ M, compounds 4 and 6 significantly inhibited Fe (II)-induced TBARS production in brain homogenates ( $p < 0.05$ ; table 3). At 200  $\mu$ M, only compound 7 and AZT did not caused a significant decrease in Fe (II) -induced

TBARS production ( $p < 0.05$  or  $p < 0.01$ ) (table 3). However, the antioxidant potency was in the order compound 6 > 4 > 5 > 3 > 2 > 1. Diphenyl diselenide, which was used as positive control, significantly reduced TBARS production at both concentrations tested ( $p < 0.01$ ).

### **3.4. Thioredoxin Reductase assay**

In contrast to diphenyl diselenide ( $p < 0.01$ ), which is a good substrate of mammalian TrxR (43), seleno-AZT analogs at 5 (data not show) and 20  $\mu\text{M}$  were not reduced by rat hepatic TrxR (fig. 2). Gold chloride prevented the reduction of diphenyl diselenide by TrxR enzyme (fig. 2).

### **3.5. GPx mimetic properties of seleno –AZT analogs**

In the presence of thiophenol, Compound 5 and 6 (100 – 400  $\mu\text{M}$ ) and compounds 3 (300 - 400  $\mu\text{M}$ ) increased the rate of  $\text{H}_2\text{O}_2$  decomposition, when compared to the basal rate (i.e., in the absence of the catalyst) ( $p < 0.01$ ; table 4 and fig. 3 A-D). All the others seleno-AZT analogs did not exhibit thiol peroxidase-like activity.

### **3.6. Thiol Oxidase activity of seleno-AZT analogs**

From the tested compounds, C6 exhibited a high thiol oxidase activity; whereas compound 4 had a small but statistically significant thiol oxidase activity after 4 hours of reaction ( $p < 0.01$ ; table 5 and fig. 4).

## **4. Discussion**

AIDS infection can be associated with Oxidative Stress (3 - 7) and one of the most common drugs used against AIDS is AZT (44). However, AZT can present a pro-oxidant activity, increasing MDA formation and decreasing total

GSH in mouse cardiac mitochondria and bovine aortic endothelial cells (44 - 46). In this context we tested if new selenocompounds analogs to AZT could reveal an antioxidant activity, a phenomenon observed with diphenyl diselenide, ebselen and other synthetic organoselenium compounds (29 - 32). The results obtained here, summarized in table 6, indicated that AZT analogs containing selenium can be weak inhibitors of Fe(II)-induced TBARS and that some of them display relatively good GPx-like activity but were not substrate of TrxR.

Under our assay conditions, only compound 6 had a clear thiol oxidase activity. Of particular toxicological significance, compounds 2, 4, 5 and 7 had *in vitro* genotoxic properties in human leukocytes, when tested at a high concentration (100  $\mu$ M). Compounds 1 to 6 caused also a significant decrease in leukocytes viability, when they were tested at high concentrations (100 and 200  $\mu$ M). Furthermore, compound 6 decreased cell viability even when tested at a relatively low concentration (25  $\mu$ M).

Taken together, these results indicate that it is not possible to establish a link between thiol oxidase, thiol peroxidase-like activity, genotoxic, cytotoxic and antioxidant properties. Some compounds, for instance compound 7, exhibited only a modest genotoxic effect and had no additional activity. In contrast, compound 6 had both antioxidant and cytotoxic activities and had no genotoxic property. It is interesting to note that different organochalcogens compounds can exhibit antioxidant properties and can also be genotoxic to human and rodent cells, depending on the concentration and on the chemical structure (34, 37, 47). Here, we have observed that at relatively high concentrations compounds 4, 5 and 7 increased DNA damage. A question to be answer is how much this damage can be restored by related DNA repair enzymes (48).

In general, we can suppose that the endpoints used here to access antioxidant and toxic properties of new selenium compounds were not linked to each other and that subtle changes in the structure of selenium-containing AZT analogs can modify completely their biological and chemical properties (antioxidant, thiol oxidase and thiol peroxidase-like activities).

## **5. Conclusion**

The development and the pharmacological use of organoselenium compounds can be considered an additional tool in the combat of diseases associated with oxidative stress and with inflammation (49). Here we observed that three AZT analogs containing selenium (compounds 3, 5 and 6) have antioxidant activities. However, compounds 3 and 5 caused DNA damage and were cytotoxic and compound 6 exhibited a strong thiol oxidase activity and cytotoxicity; which may indicate potential pathways via which they can be toxic to mammal cells. Consequently, the potential inhibitory effects of these compounds against HIV reverse transcriptase can be highly informative and can indicate whether or not the toxicity of these compounds should be investigated in rodents.

## **Conflict of Interest Statement**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## **Acknowledgements**

We are thankful for the financial support from FAPERGS, CNPq, CAPES and UFSM.

## References

- [1] J. F. Hutchinson, The biology and evolution of HIV, *Annu. Rev. Anthropol.* 30 (2001) 85-108.
- [2] P. A. Volberding, S. G. Deeks, Antiretroviral therapy and management of HIV infection, *Lancet* 376 (2010) 49-62.
- [3] G. W. Pace, C. D. Leaf, The role of oxidative stress in HIV disease, *Free Radic. Biol. Med.* 19 (1995) 523-528.
- [4] C. B. Pocernich, R. Sultana, H. Mohmmad-abdul, A. Nath, D. A. Butterfield, HIV-dementia, tat-induced oxidative stress, and antioxidant therapeutic considerations, *Brain Res. Rev.* 50 (2005) 14-26.
- [5] L. Gil, G. Martinez, I. González, A. Tarinas, A. Alvarez, A. Giuliani, R. Molina, R. Tápanes, J. Pérez, O. S. León, Contribution to characterization of oxidative stress in HIV/AIDS patients, *Pharmacol. Res.* 47 (2003) 217-224.
- [6] W. E. Stehbens, Oxidative stress in viral hepatitis and AIDS, *Exp. Mol. Pathol.* 77 (2004) 121-132.
- [7] E. J. Jareño, F. Bosch–morell, R. Fernández–delgado, J. Donat, F. J. Romero, Serum malondialdehyde in HIV seropositive children, *Free Radic. Biol. Med.* 24 (1998) 503-506.
- [8] W. Dröge, Free Radicals in the physiological control of cell function, *Physiol. Rev.* 82 (2002) 47-95.

- [9] T. Finkel, N. J. Holbrook, Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing, *Nature* 408 (2000) 239-247.
- [10] K. Jomova, Z. Jenisova, M. Feszterova, S. Baros, J. Liska, D. Hudecova, C. J. Rhodes, M. Valko, Arsenic: Toxicity, oxidative stress and human disease, *J. Appl. Toxicol.* 31 (2011) 95-107.
- [11] A. H. K. Tsang, K. K. K. Chung, Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease, *Biochim. Biophys. Acta* 1792 (2009) 643-650.
- [12] M. Parnham, H. Sies, Ebselen: Prospective therapy for cerebral ischaemia, *Expert Opin. Invest. Drugs* 9 (2000) 607-619.
- [13] O. Altindag, M. Karakoc, A. Kocyigit, H. Celik, N. Soran, Increased DNA damage and oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis, *Clin. Biochem.* 40 (2007) 167-171.
- [14] M. K. Baum, G. Shor-Posner, S. Lai, G. Zhang, H. Lai, M. A. Fletcher, H. Sauberlich, J. B. Page, High risk of HIV-related mortality is associated with selenium deficiency, *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 15 (1997) 370-374.
- [15] B. M. Dworkin, Selenium deficiency in HIV infection and the Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS), *Chem. Biol. Interact.* 91 (1994) 181-186.
- [16] C. A. Stone, K. Kawai, R. Kupka, W. W. Fawzi, Role of selenium in HIV infection, *Nutr. Rev.* 68 (2010) 671-81.

- [17] R. C. McKenzie, T. S. Rafferty, G. J. Beckett, Selenium: an essential element for immune function, *Immunol. Today* 19 (1998) 342-345.
- [18] M. N. Alarcon, C. C. Vique, Selenium in food and the human body - A review, *Sci. Total Environ.* 400 (2008) 115-141.
- [19] C. Allmang, L. Wurth, A. Krol, The selenium to selenoprotein pathway in eukaryotes: More molecular partners than anticipated, *Biochim. Biophys. Acta* 1790 (2009) 1415-1423.
- [20] H. Steinbrenner, H. Sies, Protection against reactive oxygen species by selenoproteins, *Biochim. Biophys. Acta* 1790 (2009) 1478-1485.
- [21] H. Tapiero, D. M. Townsend, K. D. Tew, The antioxidant role of selenium and seleno-compounds, *Biomed. Pharmacother.* 57 (2003) 134-144.
- [22] G. E. Arteel, H. Sies, The biochemistry of selenium and the glutathione system, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 10 (2001) 153-158.
- [23] E. S. J. Arnér, Focus on mammalian thioredoxin reductases - Important selenoproteins with versatile functions, *Biochim. Biophys. Acta* 1790 (2009) 495-526.
- [24] C. W. Nogueira, J. B. T. Rocha, Diphenyl diselenide a janus-faced molecule, *J. Braz. Chem. Soc.* 21 (2010) 2055-2071.
- [25] C. W. Nogueira, J. B. T. Rocha, Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds, *Arch. Toxicol.* 85 (2011) 1313-1359.

- [26] D. Desai, N. Kaushal, U. H. Gandhi, R. J. Arner, C. D'Souza, G. Chen, H. Vunta, K. El-Bayoumy, S. Amin, K. S. Prabhu, Synthesis and evaluation of the anti-inflammatory properties of selenium-derivatives of celecoxib, *Chem. Biol. Interact.* 188 (2010) 446-456.
- [27] T. Ogunmoyole, J. B. T. Rocha, A. E. Okoronkwo, I. J. Kade, Altered pH homeostasis modulates the glutathione peroxidase mimics and other antioxidant properties of diphenyl diselenide, *Chem. Biol. Interact.* 182 (2009) 106-111.
- [28] A. S. De Freitas, J. B. T. Rocha, Diphenyl diselenide and analogs are substrates of cerebral rat thioredoxin reductase: A pathway for their neuroprotective effects, *Neurosci. Lett.* 503 (2011) 1-5.
- [29] M. A. Hort, M. R. Stralio, P. M. Netto, J. B. T. Da Rocha, A. F. De Bem, R. M. Ribeiro-Do-Valle, Diphenyl diselenide effectively reduces atherosclerotic lesions in LDLr <sup>-/-</sup> Mice by attenuation of oxidative stress and inflammation, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 58 (2011) 91-101.
- [30] R. Zhao, A. Holmgren, A novel antioxidant mechanism of ebselen involving ebselen diselenide, a substrate of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 39456-39462.
- [31] Z. Yin, E. Lee, M. Ni, H. Jiang, D. Milatovic, L. Rongzhu, M. Farina, J. B. T. Rocha, M. Aschner, Methylmercury-induced alterations in astrocyte functions are attenuated by ebselen, *NeuroToxicology* 32 (2011) 291-299.
- [32] A. F. D. Bem, M. Farina, R. D. L. Portella, C. W. Nogueira, T. C. P. Dinis, J. A. N. Laranjinha, L. M. Almeida, J. B. T. Rocha, Diphenyl diselenide, a

simple glutathione peroxidase mimetic, inhibits human LDL oxidation *in vitro*, *Atherosclerosis* 201 (2008) 92-100.

- [33] R. L. Puntel, D. H. Roos, V. Folmer, C. W. Nogueira, A. Galina, M. Aschner, J. B. T. Rocha, Mitochondrial dysfunction induced by different organochalcogens is mediated by thiol oxidation and is not dependent of the classical mitochondrial permeability transition pore opening, *Toxicol. Sci.* 117 (2010) 133-143.
- [34] D. B. Santos, V. P. P. Schiar, M. W. Paixao, D. F. Meinerz, C. N. Nogueira, M. Aschner, J. B. T. Rocha, N. B. V. Barbosa, Hemolytic and genotoxic evaluation of organochalcogens in human blood cells *in vitro*, *Toxicol. In Vitro* 23 (2009) 1195-1204.
- [35] M. R. Straliootto, G. Mancini, J. De Oliveira, E. M. Nazari, Y. M. R. Müller, A. Dafre, S. Ortiz, E. L. Silva, M. Farina, A. Latini, J. B. T. Rocha, A. F. de Bem, Acute exposure of rabbits to diphenyl diselenide: A toxicological evaluation, *J. Appl. Toxicol.* 30 (2010) 761-768.
- [36] Waiting a patent requirement number.
- [37] D. B. Santos, V. P. P. Schiar, M. C. P. Ribeiro, R. S. Schwab, D. F. Meinerz, J. Allebrandt, J. B. T. Rocha, C. W. Nogueira, M. Aschner, N. B. V. Barbosa, Genotoxicity of organoselenium compounds in human leukocytes *in vitro*, *Mutat. Res.* 676 (2009) 21-26.
- [38] K. E. Hill, G. W. McCollum, M. E. Boeglin, R. F. Burk, Thioredoxin reductase Activity is Decreased by Selenium Deficiency, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234 (1997) 293-295.

- [39] H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.* 95 (1979) 351-358.
- [40] R. L. Puntel, D. H. Roos, D. Grotto, S. C. Garcia, C. W. Nogueira, J. B. T. Rocha, Antioxidant properties of krebs cycle intermediates against malonate pro-oxidant activity in vitro: A comparative study using the colorimetric method and HPLC analysis to determine malondialdehyde in rat brain homogenates, *Life sci.* 81 (2007) 51-62.
- [41] A. S. Freitas, A. S. Prestes, C. Wagner, J. H. Sudati, D. Alves, L. O. Porciúncula, I. J. Kade, J. B. T. Rocha, Reduction of diphenyl diselenide and analogs by mammalian thioredoxin reductase is independent of their glutathione peroxidase-like activity: A possible novel pathway for their antioxidant activity, *Molecules* 15 (2010) 7699-771.
- [42] M. Iwaoka, S. Tomoda, A model study on the effect of an amino group on the antioxidant activity of glutathione peroxidase, *J. Am. Chem. Soc.* 116 (1994) 2557-2561.
- [43] J. B. T. Rocha, L. A. Lissner, R. L. Puntel, R. Fachinetto, T. Emanuelli, C. W. Nogueira, F. A. A. Soares, Oxidation of delta-ALA-D and DTT mediated by ascorbic acid: Modulation by buffers depends on free iron, *Biol. Pharm. Bull.* 28 (2005) 1485-1489.
- [44] F. E. Harlass, The pharmacology of zidovudine, *Prim. Care Update Ob/Gyns* 3 (1996) 58-62.

- [45] J. G. de la Asunción, M. L. del Olmo, L. G. G. Cambroner, J. Sastre, F. V. Pallardó, J. Viño, AZT induces oxidative damage to cardiac mitochondria: Protective effect of vitamins C and E, *Life Sci.* 76 (2004) 47-56.
- [46] I. T. Mak, L. F. Nedelec, W. B. Weglicki, Pro-oxidant properties and cytotoxicity of AZT-monophosphate and AZT, *Cardiovasc. Toxicol.* 4 (2004) 109-115.
- [47] D. F. Meinerz, J. H. Sudati, D. B. Santos, A. Frediani, E. E. Alberto, J. Allebrandt, J. L. Franco, N. B. V. Barbosa, M. Aschner, J. B. T. Rocha, Evaluation of the biological effects of (S)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl) propanamido) succinate, a new telluroamino acid derivative of aspartic acid, *Arch. Toxicol.* 85 (2011) 43-49.
- [48] D. Slamenová, E. Horváthová, M. Bartková, Nature of DNA lesions induced in human hepatoma cells, human colonic cells and human embryonic lung fibroblasts by the antiretroviral drug 3'-azido-3'-deoxythymidine, *Mutat. Res.* 593 (2006) 97-107.
- [49] M. J. Parnham, E. Graf, Pharmacology of synthetic organic selenium compounds, *Prog. Drug Res.* 36 (1991) 9-47.

## LEGEND TO FIGURES

Figure 1 - Formation of diphenyl diselenide selenol intermediate (selenophenol) after diphenyl diselenide reduction by NADPH-dependent TrxR catalyzed reaction (pathway 1) or via a direct chemical reduction of diphenyl diselenide by GSH (represented by RSH in pathway 2).

Figure 2 - Organoselenium compounds analogs to AZT are not substrate of mammalian TrxR.

Compounds were tested at 20  $\mu\text{M}$ .  $(\text{PhSe})_2$  was used as a positive control, and  $\text{AuCl}_3$  as a negative control.  $\Delta\text{H}$  represents consumption of NADPH at 340 nm, during 10 minutes.

Data are expressed as Mean  $\Delta\text{H} \pm \text{S.E.M.}$  for three independent experiments.

\* denote significantly difference ( $p < 0.01$ ) from control.

# denote significantly difference ( $p < 0.05$ ) from  $(\text{PhSe})_2$ .

$F(10, 22) = 3.95, p < 0.0034$ .

Figure 3 – Thiol Peroxidase-like activity of organoselenium compounds analogs of AZT.

Compounds C3, C5 and C6 were tested at 100  $\mu\text{M}$  (3A), 200  $\mu\text{M}$  (3B), 300  $\mu\text{M}$  (3C) and 400  $\mu\text{M}$  (3D), during 180 seconds.

# Denote significant difference ( $p < 0.05$ ) from control.

\* Denote significant difference ( $p < 0.01$ ) from control.

Figure 4 - Thiol oxidase activity of compound 4 and 6 during 4 hours, at 100  $\mu$ M.

Data are expressed as mean of DTT absorbance  $\pm$  S.E.M.

# Indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ) from control.

\* Denote significantly difference ( $p < 0.01$ ) from control.

Fig. 1

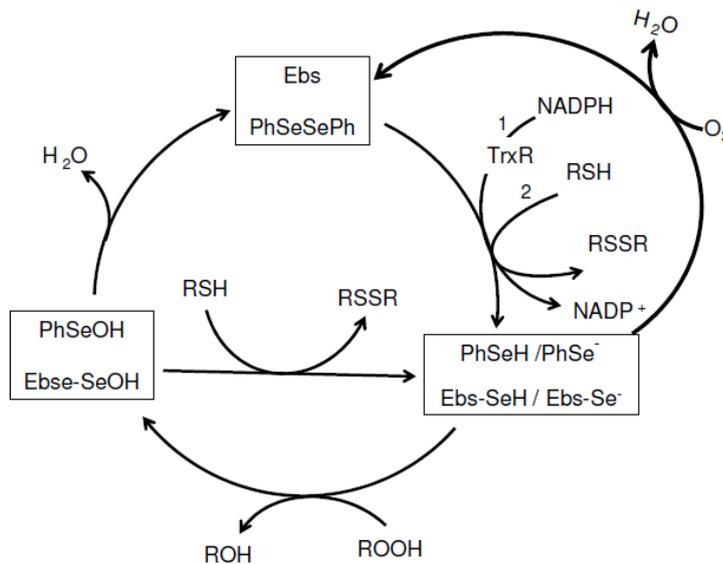


Fig. 2

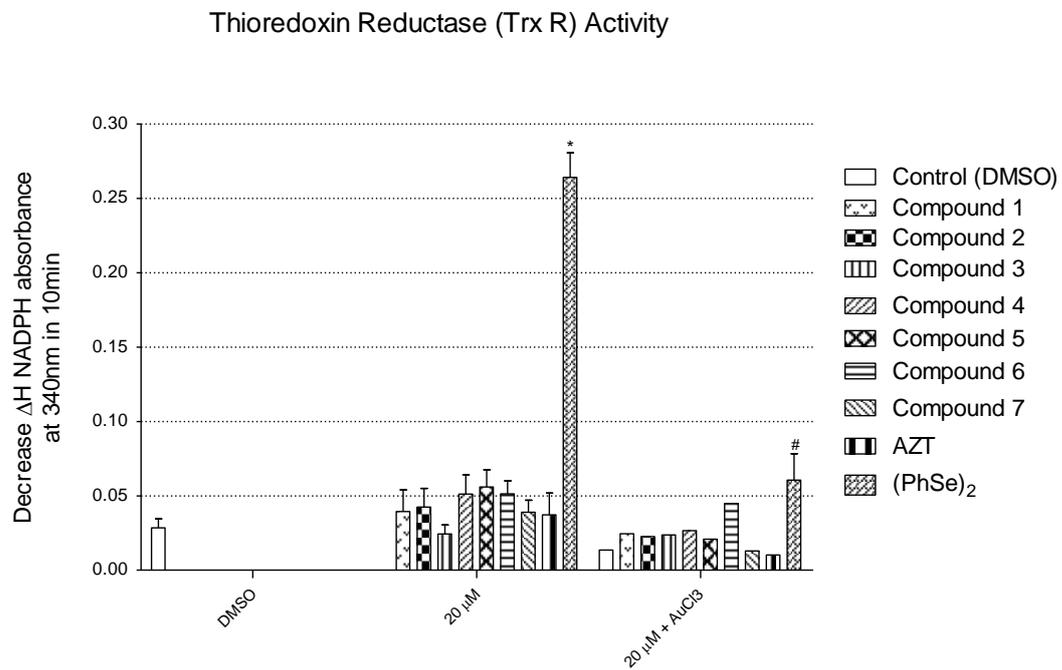


Fig. 3.A

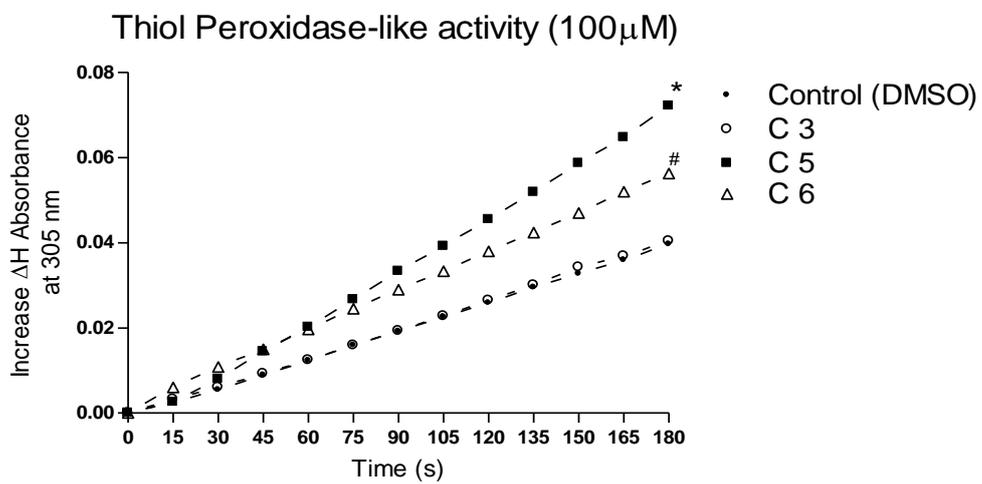


Fig. 3.B

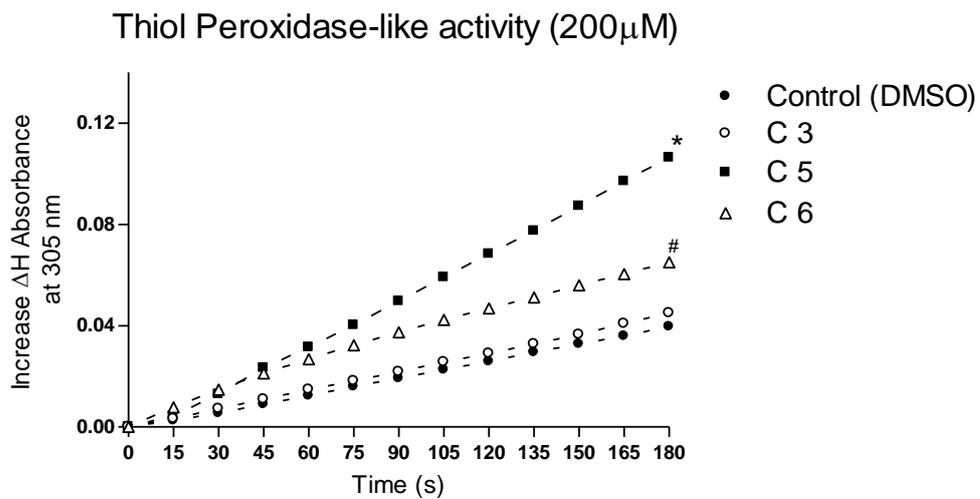


Fig. 3.C

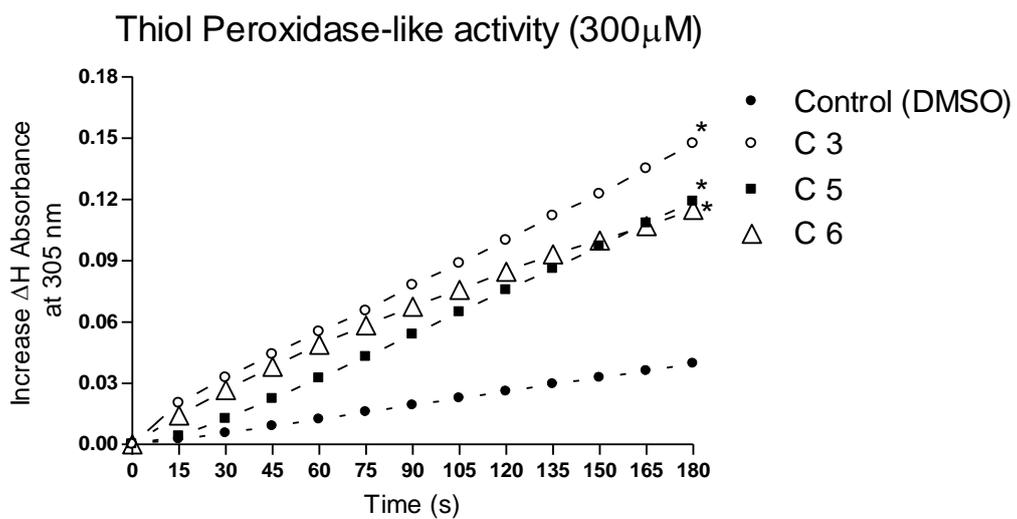


Fig. 3.D

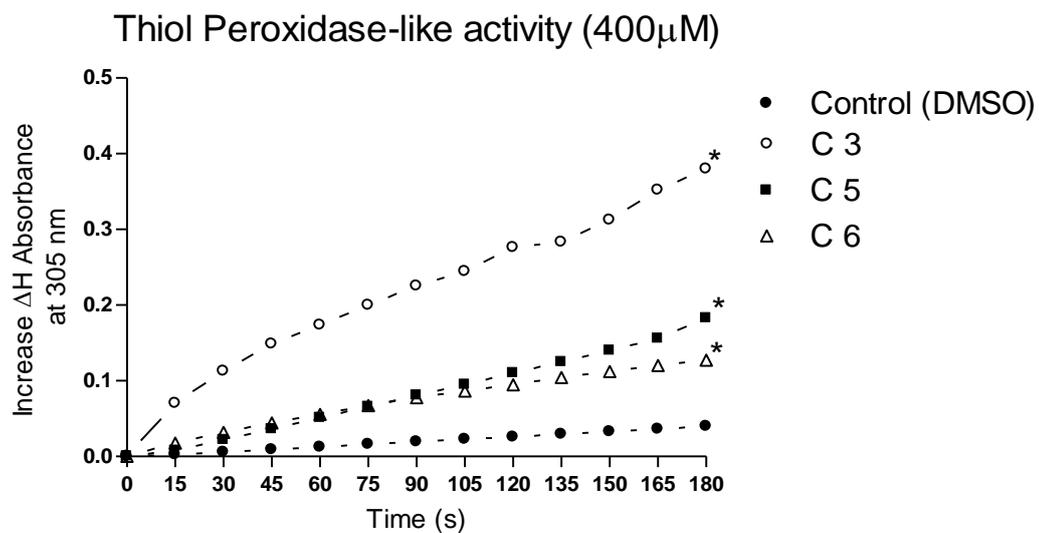


Fig. 4

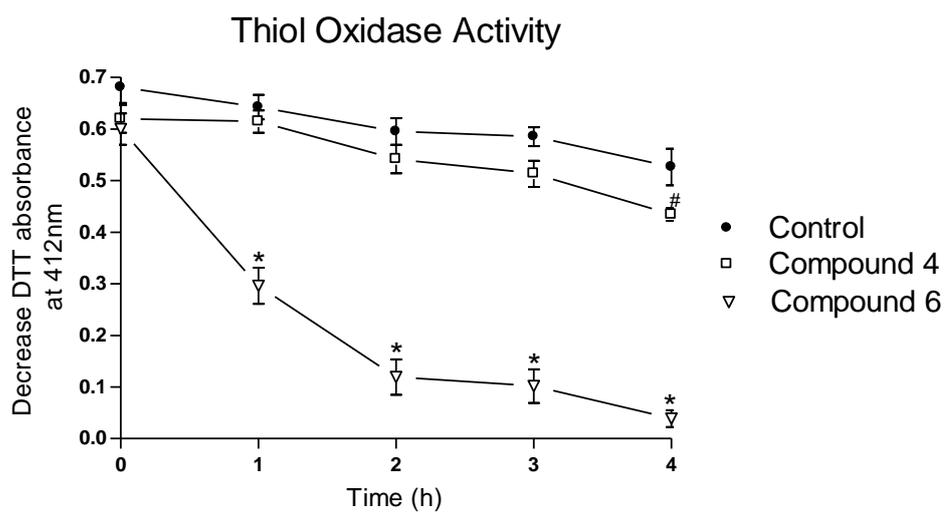


Table 1 - DNA damage is expressed as DNA damage levels of percentage of cells and DNA damage index (DI) as arbitrary units (a.u.).

Comet Assay						
Levels of DNA Damage (% of cells)						
	0	1	2	3	4	DI (au)
Control	79.78±2.58	7.78±1.68	4.33±0.80	2.67±0.60	5.44±0.75	46.22±4.90
Compound 1	74.20±3.07	8.20±1.07	4.00±1.52	3.20±0.37	10.20±2.82	66.60±10.52
Compound 2	64.62±3.94	9.25±3.64	5.25±1.75	3.25±1.11	17.62±3.75 *	100.00±11.80 *
Compound 3	67.40±10.20	10.20±3.69	5.20±3.51	4.70±0.62	12.10±2.04	83.10±7.49 #
Compound 4	48.75±7.67 *	13.25±4.82	10.75±2.46	10.00±1.08 *	16.00±2.68 *	128.75±12.04 *
Compound 5	52.75±6.94 *	14.50±2.18	9.75±2.17	5.75±1.65	17.25±2.39 *	120.25±18.18 *
Compound 6	70.00±4.32	8.87±2.54	4.37±0.94	5.75±2.25	11.00±3.19	78.87±16.02
Compound 7	53.00±7.15 *	19.75±5.36 #	7.00±1.22	5.25±1.03	15.00±2.20 #	109.50±13.94 *
AZT	69.75±3.35	11.25±1.93	5.50±2.36	4.25±0.85	9.25±1.89	72.00±7.47

Compounds were tested at 100 µM.

Data are expressed Mean (%) ± S.E.M.;  $n = 4$ .

# denote significant difference ( $p < 0.05$ ) from control.

\* denote significant difference ( $p < 0.01$ ) from control.

0:  $F(8, 34) = 5.2899$ ,  $p = 0.000239$ ;

1:  $F(8, 34) = 1.5762$ ,  $p = 0.168700$ ;

2:  $F(8, 34) = 1.5024$ ,  $p = 0.192983$ ;

3:  $F(8, 34) = 4.2419$ ,  $p = 0.001306$ ;

4:  $F(8, 34) = 3.9568$ ,  $p = 0.002125$ ;

ID:  $F(8, 34) = 7.3280$ ,  $p = 0.000013$ ;

Table 2 – Cell viability is expressed in percentage of viable cells.

Cell Viability							
Concentration ( $\mu\text{M}$ )							
	0	5	25	50	75	100	200
Control	96.20 $\pm$ 0.50						
C1		98.21 $\pm$ 0.40	96.06 $\pm$ 1.36	94.46 $\pm$ 2.14	93.76 $\pm$ 0.81	89.62 $\pm$ 2.17 *	82.44 $\pm$ 3.14 *
C2		92.52 $\pm$ 2.63	89.93 $\pm$ 4.68	90.55 $\pm$ 2.15	89.28 $\pm$ 4.09	77.40 $\pm$ 5.34 *	60.57 $\pm$ 8.33 *
C3		95.69 $\pm$ 0.58	92.33 $\pm$ 1.72	93.16 $\pm$ 1.06	92.29 $\pm$ 1.05	90.98 $\pm$ 2.81 #	75.21 $\pm$ 5.13 *
C4		92.42 $\pm$ 0.88	93.21 $\pm$ 1.29	91.16 $\pm$ 1.85#	83.5 $\pm$ 2.75 *	84.53 $\pm$ 1.28 *	74.30 $\pm$ 2.61 *
C5		95.55 $\pm$ 0.89	95.11 $\pm$ 0.51	93.10 $\pm$ 0.75	88.29 $\pm$ 2.89*	79.99 $\pm$ 4.42 *	70.19 $\pm$ 2.52 *
C6		87.42 $\pm$ 7.42#	87.36 $\pm$ 4.40#	78.07 $\pm$ 12.26*	68.62 $\pm$ 18.51*	61.85 $\pm$ 7.45 *	53.96 $\pm$ 6.54 *
C7		91.61 $\pm$ 4.80	93.84 $\pm$ 1.79	93.89 $\pm$ 1.36	93.42 $\pm$ 2.12	92.32 $\pm$ 2.55	94.28 $\pm$ 0.74
AZT		88.53 $\pm$ 2.62*	88.76 $\pm$ 2.78*	92.17 $\pm$ 2.43	88.57 $\pm$ 2.93 *	92.64 $\pm$ 1.83	90.07 $\pm$ 1.97 #

Compounds were tested at 5, 25, 50, 75, 100 and 200  $\mu\text{M}$ .

Data are expressed Mean (%)  $\pm$  S.E.M.;  $n = 4$ .

# denote significant difference ( $p < 0.05$ ) from control.

\* denote significant difference ( $p < 0.01$ ) from control.

Table 3 - Inhibition of brain lipid peroxidation (TBARS formation) by AZT analogs and diphenyl diselenide.

	TBARS production (nmol/ml)	
	Concentration ( $\mu\text{M}$ )	
	100	200
Control (Fe)	1432.23 $\pm$ 33.19	1151.59 $\pm$ 55.50
C 1	1230.34 $\pm$ 79.26	696.15 $\pm$ 91.39 <sup>#</sup>
C 2	1118.22 $\pm$ 117.34	495.48 $\pm$ 148.90 <sup>*</sup>
C 3	1192.18 $\pm$ 65.13	366.01 $\pm$ 154.45 <sup>*</sup>
C 4	962.59 $\pm$ 204.26 <sup>#</sup>	221.60 $\pm$ 85.27 <sup>*</sup>
C 5	1063.57 $\pm$ 60.03	267.95 $\pm$ 87.12 <sup>*</sup>
C 6	965.54 $\pm$ 150.55 <sup>#</sup>	211.53 $\pm$ 75.29 <sup>*</sup>
C 7	1315.90 $\pm$ 191.15	838.15 $\pm$ 205.06
AZT	1348.05 $\pm$ 98.83	838.49 $\pm$ 128.95
(PhSe) <sub>2</sub>	196.42 $\pm$ 67.74 <sup>*</sup>	111.79 $\pm$ 33.16 <sup>*</sup>

Data are expressed as Mean  $\pm$  S.E.M. for five different experiments.

<sup>#</sup> Indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ) from control.

<sup>\*</sup> Indicate a significant difference ( $p < 0.01$ ) from control.

100  $\mu\text{M}$ : F (9, 40) = 8.44,  $p = 0.000001$ ;

200  $\mu\text{M}$ : F (9, 40) = 8.64,  $p = 0.000000$ ;

Table 4 - Thiol Peroxidase-like activity of organoselenium compounds analogs to AZT.

Thiol Peroxidase-like Activity				
Concentration ( $\mu\text{M}$ )				
	100	200	300	400
Control	0.040 $\pm$ 0.005	0.040 $\pm$ 0.005	0.040 $\pm$ 0.005	0.040 $\pm$ 0.005
C 1	0.036 $\pm$ 0.005	0.038 $\pm$ 0.003	0.043 $\pm$ 0.001	0.043 $\pm$ 0.005
C 2	0.043 $\pm$ 0.007	0.036 $\pm$ 0.003	0.034 $\pm$ 0.004	0.035 $\pm$ 0.005
C 3	0.040 $\pm$ 0.002	0.045 $\pm$ 0.006	0.147 $\pm$ 0.012 *	0.380 $\pm$ 0.046 *
C 4	0.043 $\pm$ 0.003	0.041 $\pm$ 0.004	0.045 $\pm$ 0.006	0.046 $\pm$ 0.004
C 5	0.072 $\pm$ 0.007 *	0.106 $\pm$ 0.017 *	0.119 $\pm$ 0.022 *	0.183 $\pm$ 0.014 *
C 6	0.056 $\pm$ 0.007 <sup>#</sup>	0.065 $\pm$ 0.014 <sup>#</sup>	0.115 $\pm$ 0.008 *	0.127 $\pm$ 0.008 *
C 7	0.039 $\pm$ 0.001	0.041 $\pm$ 0.003	0.036 $\pm$ 0.004	0.045 $\pm$ 0.005
AZT	0.045 $\pm$ 0.001	0.045 $\pm$ 0.002	0.056 $\pm$ 0.019	0.060 $\pm$ 0.022

All compounds were tested at 100 - 400  $\mu\text{M}$ . Data are expressed as Mean of absorbance  $\pm$  S.E.M. (n=3 independent experiments done) and show the rate of  $\text{H}_2\text{O}_2$  decomposition.

<sup>#</sup> Indicates a significant difference ( $p < 0.05$ ) from control.

\* Indicates a significant difference ( $p < 0.01$ ) from control.

100  $\mu\text{M}$ :  $F(8, 18) = 4.90$ ,  $p < 0.0025$ ;

200  $\mu\text{M}$ :  $F(8, 18) = 7.54$ ,  $p < 0.0002$ ;

300  $\mu\text{M}$ :  $F(8, 18) = 14.91$ ,  $p < 0.000002$ ;

400  $\mu\text{M}$ :  $F(8, 18) = 38.93$ ,  $p = 0.000000$ ;

Table 5 - Thiol oxidase activity of selenium AZT analogs.

Thiol Oxidase Activity					
	Time (h)				
	0	1	2	3	4
Control	0.681±0.030	0.643±0.024	0.595±0.026	0.585±0.018	0.526±0.036
Compound 1		0.602±0.031	0.579±0.038	0.519±0.034	0.468±0.016
Compound 2		0.647±0.024	0.563±0.041	0.518±0.041	0.469±0.019
Compound 3		0.631±0.034	0.543±0.029	0.523±0.016	0.464±0.024
Compound 4		0.614±0.021	0.542±0.027	0.513±0.025	0.434±0.012 <sup>#</sup>
Compound 5		0.588±0.017	0.541±0.017	0.494±0.030	0.464±0.015
Compound 6		0.296±0.035 <sup>*</sup>	0.119±0.034 <sup>*</sup>	0.102±0.033 <sup>*</sup>	0.039±0.016 <sup>*</sup>
Compound 7		0.618±0.018	0.555±0.024	0.544±0.033	0.532±0.049
AZT		0.591±0.039	0.570±0.034	0.513±0.033	0.481±0.023

Compounds were tested at 100 µM. Data are expressed as mean of DTT absorbance ± S.E.M., for three different experiments.

<sup>#</sup> Indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ) from control

<sup>\*</sup> Denote significantly difference ( $p < 0.01$ ) from control

1h:  $F(8, 45) = 13.294$ ,  $p < 0.000000$ ;

2h:  $F(8, 45) = 21.667$ ,  $p < 0.000000$ ;

3h:  $F(8, 45) = 19.199$ ,  $p < 0.000000$ ;

4h:  $F(8, 45) = 49.310$ ,  $p < 0.000000$ ;

Table 6 – Qualitative summary of the effects of AZT and AZT compounds on different endpoints of antioxidant or toxic properties.

Summary of the effects of AZT and AZT analogs									
Comet Assay	TBARS		Thiol peroxidase like-activity		Thiol Oxidase activity		Cell viability	TrxR	
ID	100 $\mu$ m	200 $\mu$ m	100 $\mu$ m	400 $\mu$ m	1h	4h	200 $\mu$ m	20 $\mu$ m	
1	0	x	0	0	0	0	x	0	
2	xx	0	xx	0	0	0	xxx	0	
3	x	0	xx	0	xxx	0	xx	0	
4	xxx	x	xxx	0	0	0	x	xx	
5	xxx	0	xxx	xx	xx	0	0	xx	
6	0	x	xxx	x	xx	xxx	xxx	xxx	
7	xx	0	0	0	0	0	0	0	
AZT	0	0	0	0	0	0	x	0	

0 - Indicates no activity

x - Low activity

xx - Moderate activity

xxx – High activity