

Filipa Lemos Pereira

Citostáticos em Terapia Oncológica

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor Saúl Campos Pereira Costa e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Filipa Lemos Pereira

Citostáticos em Terapia Oncológica

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor Saúl Campos Pereira Costa e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

O Tutor

(Professor Doutor Saúl Campos Pereira Costa)

A Aluna

(Filipa Lemos Pereira)

Agradecimentos

A todos aqueles que tornaram estes cinco anos inesquecíveis:

À minha família, principalmente mãe e pai pela paciência e por serem o meu pilar.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, pela minha formação.

Ao Professor Doutor Saúl Campos Pereira Costa, pela ajuda.

Aos amigos especiais que tornaram tudo isto possível.

OBRIGADA!

Índice

Abreviaturas	3
Resumo	4
Abstract	5
Introdução	6-7
Cancro	8
Ciclo Celular	8
Citostáticos	9-13
Mecanismo de Ação	9-10
Classificação de Citostáticos	10
Agentes Alquilantes – Mostardas Azotadas	11-14
Pró-Fármacos	14
Espécies Reativas de Oxigénio	14-15
Indução de alquilação do ADN por ROS	15-22
Conclusão	23
Bibliografia	24-27

Índice de Figuras

Figura 1	6
Figura 2	16
Figura 3	17
Figura 4	18
Figura 5	20
Figura 6	20
Figura 7	21
Figura 8	22
Figura 9	22

Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
DDD	Dose Diária Definida
DGS	Direção Geral de Saúde
FDA	Food and Drug Administration
GI	Gastrointestinal
GI ₅₀	Concentração de citostático que provoca 50% de inibição máxima de proliferação celular
IC ₅₀	Concentração do fármaco que provoca 50% de citotoxicidade na cultura celular
INFARMED, I.P.	Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde
LLC	Leucemia Linfocítica Crónica
LPCC	Liga Portuguesa Contra o Cancro
MA	Mostardas Azotadas
NCI	National Cancer Institute
PNS	Plano Nacional de Saúde
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROS	Reactive Oxygen Species
TGT	Tumor Germinativo do Testículo

Resumo

O cancro é uma doença que afeta grande parte da população mundial. A investigação constante, numa área de intervenção tão importante como o cancro, é inquestionavelmente necessária. Cada vez se tem um maior conhecimento sobre as suas causas, a forma como se desenvolve e cresce, ou seja, a sua progressão. Estão também a ser estudadas novas formas de o prevenir, detetar e tratar, tendo sempre em atenção a melhoria da qualidade de vida dos doentes oncológicos, durante e após o tratamento.

Os citostáticos podem ser classificados de acordo com o seu mecanismo de ação, e independentemente disso, todos apresentam toxicidade e podem ser alvos de resistência das células neoplásicas. A investigação em terapia oncológica inclui passado, presente e futuro. Está ainda muito longe de ter resultados totalmente satisfatórios e conclusivos.

É essencial a aposta contínua na investigação em terapia oncológica direcionada, de modo a diminuir a toxicidade dos fármacos citostáticos, um dos principais obstáculos à quimioterapia. A ativação de pró-fármacos alquilantes, nomeadamente mostardas azotadas por espécies reativas de oxigénio é o resultado de uma, de entre as muitas investigações e estudos que se têm realizado.

Palavras-chave: cancro, investigação, citostáticos, toxicidade, terapia oncológica direcionada, pró-fármacos alquilantes, espécies reativas de oxigénio.

Abstract

Cancer is a disease that affects much of the world's population. The constant research in a target area as important as cancer is unquestionably necessary. Each time we have a better understanding of its causes, how it develops and grows and its progression. It is also being studied new ways of preventing, detecting and treating, always paying attention to improving the quality of life of cancer patients during and after treatment.

The chemotherapeutic agents can be classified according to their mechanism of action, independently of that they all present toxicity and many neoplastic cells can exhibit resistance to these drugs. Research in cancer therapy includes past, present and future. It is still very far from having fully satisfactory and conclusive results.

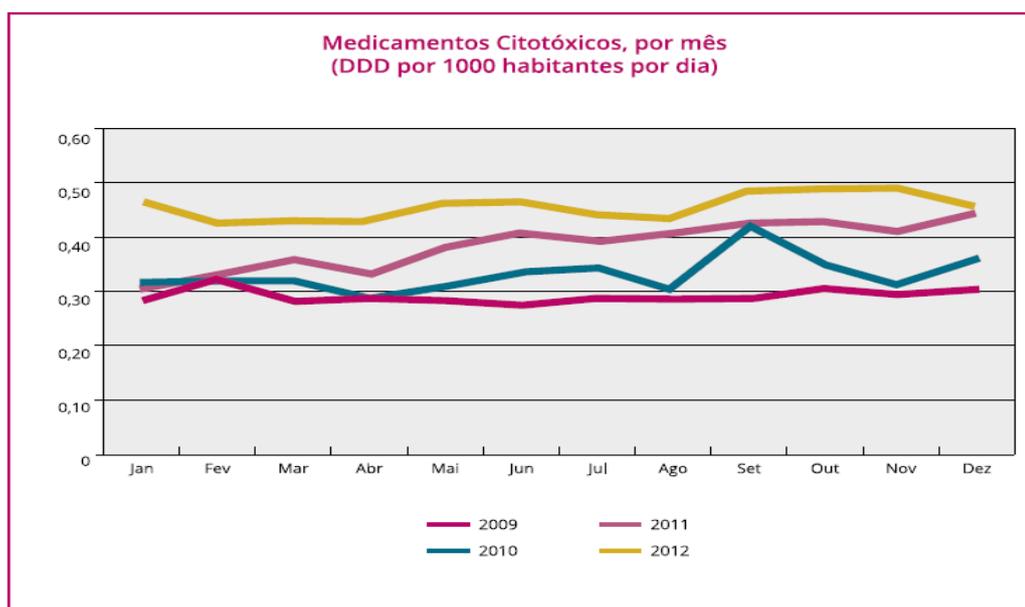
It is essential to the continuous focus on research directed cancer therapy in order to reduce the toxicity of cytostatic drugs, a major obstacle to chemotherapy. ROS-activated alkylating agents, particularly nitrogen mustards are the result of, among many, investigations and studies have been conducted.

Keywords: cancer, research, cytostatics, toxicity, targeted cancer therapy, alkylating prodrugs, reactive oxygen species.

Introdução

Segundo a Direção Geral de Saúde (DGS), de ano para ano tem havido um aumento da incidência do cancro, principalmente nos países em vias de desenvolvimento. Estima-se que pelo menos cerca de 7 milhões de pessoas morrem de cancro anualmente. Mais especificamente, em Portugal estima-se a morte anual de 25 mil pessoas. As doenças oncológicas constituem a segunda principal causa de morte (apenas as doenças cardiovasculares atingem valores superiores), incluindo Portugal, sendo uma das prioridades do Plano Nacional de Saúde (PNS). A promoção da saúde e do diagnóstico precoce, dando prioridade à prevenção primária através da promoção de estilos de vida saudáveis, são de extrema importância.^{[1][2]}

Como consequência do aumento da incidência de cancro, também o número de tratamentos utilizando citostáticos aumentou, como se pode verificar pela análise da Figura 1.^[1]



Fonte: SIM@SNS

Figura 1 Dose Diária Definida (DDD) por 1000 habitantes associada a medicamentos citotóxicos, por mês, em Portugal Continental (2009 a 2012)^[1]

Estes fármacos têm uma margem terapêutica estreita característica, uma vez que não são específicos para as células neoplásicas e, sendo assim, frequentemente lesam as células normais. Tentando encontrar alternativa a este problema, atualmente têm-se vindo a desenvolver terapêuticas direcionadas com o objetivo de diminuir a toxicidade dos citostáticos, como por exemplo pró-fármacos de mostardas azotadas.^{[3][4]} De modo a

aumentar a eficácia, fazem-se também associações de citotóxicos em ciclos repetidos e de frequência variável.^[5]

Outro grande problema é a falta de eficácia da quimioterapia, causada pelo desenvolvimento de mecanismos de resistência.^[6] Estes, na grande parte dos casos, envolvem alterações a nível genético nas células neoplásicas, o que pode originar resistência a um determinado ou a múltiplos fármacos.^[7]

Nas últimas décadas houve grandes desenvolvimentos na área da terapia oncológica e tem-se apostado continuamente na investigação de estratégias que ponham fim, ou pelo menos atenuem, a toxicidade e resistências. No entanto, há ainda um longo caminho a percorrer.

Esta monografia dedica-se à classificação dos citostáticos, ao seu mecanismo de ação e sua toxicidade, dando especial atenção às mostardas azotadas (MA), ao seu mecanismo de ação, toxicidade e à sua utilização como pró-fármacos. Proponho-me também, primando por um tema atual, abordar uma estratégia particular de terapia direcionada, baseada na presença de espécies reativas de oxigénio (ROS) e síntese de pró-fármacos de MA.

Cancro

O cancro é uma desordem genética provocada por mutações na molécula de ADN, sendo maioritariamente espontâneas ou induzidas por estímulos ambientais. Pode ocorrer em qualquer tecido do corpo e das mais variadas formas. Estas alterações genéticas poderão por sua vez afetar a expressão e função dos genes e consequentemente modificar os processos celulares, dando origem a um crescimento anormal de células que proliferam de forma descontrolada. A divisão celular permite a transmissão e acumulação destas mutações. Todo este processo poderá resultar em cancro, no caso de se formarem células neoplásicas malignas. O cancro torna-se clinicamente detetável quando há uma massa de 10^9 células neoplásicas.^[8] As células neoplásicas malignas são caracterizadas por autossuficiência de estímulos de crescimento, insensibilidade a sinais inibidores do crescimento, incapacidade de apoptose (morte celular programada), defeitos na reparação do ADN, potencial replicativo ilimitado, angiogénese sustentada, capacidade de invadir e metastizar outros tecidos e diminuição da imunidade.^{[9][10]}

Ciclo Celular

O Ciclo celular é dividido em duas partes básicas: mitose e interfase. A mitose (período em que ocorre a divisão do núcleo celular) corresponde à separação dos cromossomas e normalmente acaba com a divisão (citocinese). Aproximadamente cerca de 95% do ciclo corresponde à interfase (período compreendido entre mitoses). Durante a interfase há um crescimento celular constante e replicação do ADN, preparando a célula para a divisão. A síntese de ADN ocorre apenas num determinado período da interfase. Esta encontra-se dividida em 4 fases, a fase M correspondente à mitose que normalmente é seguida da citocinese; posteriormente vem a fase G_1 (gap) correspondente ao intervalo entre a mitose e o início da replicação do ADN. Durante esta fase, a célula está ativa metabolicamente e tem um crescimento contínuo. A fase seguinte é a S (synthesis), durante a qual ocorre replicação de ADN. Posteriormente ocorre a fase G_2 (gap 2), durante a qual o crescimento celular continua e as proteínas são sintetizadas. Algumas células, após a mitose, permanecem indeterminadamente na fase G_0 onde, apesar de metabolicamente ativas, não se dividem.^[11]

A cada transição de fase, certas proteínas como a p53, monitorizam a integridade do ADN, procedendo à sua reparação ou à apoptose celular, regulando desta maneira o ciclo celular.^[4]

Citostáticos

“Fármacos citostáticos ou citotóxicos, também conhecidos como antineoplásicos, são utilizados no tratamento de cancro quando a cirurgia ou a radioterapia não são possíveis, se mostraram ineficazes, ou ainda como adjuvantes da cirurgia ou da radioterapia como tratamento inicial.” Estes podem ser utilizados com sucesso no tratamento de alguns tipos de neoplasias, no entanto, noutros casos em que isso não se verifica possível, são utilizados como paliativo dos sintomas ou meio de prolongar a vida do doente.^[7]

Os citostáticos usados na quimioterapia são bastante distintos, tanto a nível de estrutura, como mecanismo de ação. Estes atuam através de uma cinética de primeira ordem, em que uma determinada dose danifica uma proporção constante da população celular e não um número fixo de células. Em parte, isto explica a dificuldade de se obter a remissão completa de um tumor através da quimioterapia.^{[4][7][12]}

Mecanismo de Ação

Os mecanismos de ação são diferentes entre citostáticos. Podem atuar ao nível da síntese de purinas, ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos e também na síntese de ADN. A replicação pode ser afetada através da inibição das topoisomerasas ou formação de ligações cruzadas com o ADN. Relativamente à tradução, pode ser afetada através da inibição da síntese de proteínas. Por fim podem ainda interferir com as proteínas, induzindo a sua diferenciação, bloqueando a atividade de enzimas e inibindo a função dos microtúbulos.^[4]

Há citostáticos específicos de fase S, citostáticos específicos de fase M e citostáticos sem qualquer tipo de especificidade. Os fármacos que atuam em fases específicas têm uma maior eficácia nas células que estão a iniciar o seu processo mitótico, uma vez que se trata da fase mais vulnerável. Consequentemente os resultados são também superiores nos casos em que há uma grande proliferação de células neoplásicas. Logicamente a eficácia é tanto maior, quanto maior o dano na molécula de ADN (ex.: alquilantes) e quanto maior o tempo de permanência de elevadas concentrações do citostático dentro da célula (ex.: fluoropirimidinas). Os fármacos que atuam em fases não específicas (ou seja, que podem atuar em todas as fases) têm uma maior toxicidade, uma vez que as células normais encontram-se em divisão menos frequentemente que as neoplásicas. São, portanto, mais utilizados em tumores de crescimento lento.^[4]

De modo a aumentar a eficácia, fazem-se associações de citotóxicos em ciclos repetidos e de frequência variável, que são designadas por siglas (primeira letra do seu nome genérico ou nome comercial). A posologia calcula-se em função da área de superfície

corporal, através de tabelas e réguas de cálculo para a sua obtenção, em função do peso e altura do doente.^[5]

Classificação dos Citostáticos

<u>Alquilantes</u>	<ul style="list-style-type: none"> ● Mostardas Azotadas (Mecloretamina, Ciclofosfamida, Ifosfamida, Melfalano e Clorambucil) ● Alquil sulfonatos (Bussulfano) ● Nitrosouréias (Carmustina e Estreptozocina) ● Triazenos (Dacarbazina e Temozolomida)
<u>Citotóxicos relacionados com alquilantes</u>	<ul style="list-style-type: none"> ● Complexos de Platina (Cisplatina, Carboplatina, Oxaliplatina)
<u>Antimetabolitos</u>	<ul style="list-style-type: none"> ● Análogos de Ácido Fólico (Metotrexato e Pemetrexed) ● Análogos de Pirimidina (Fluorouracilo, Citarabina e Gencitabina) ● Análogos de Purina (Mercaptopurina, Tioguanina, Pentostatina, Fludarabina e Cladribina)
<u>Inibidores da Topoisomerase I</u>	<ul style="list-style-type: none"> ● Irinotecano ● Topotecano
<u>Inibidores da Topoisomerase II</u>	<ul style="list-style-type: none"> ● Etoposido ● Teniposido
<u>Citotóxicos que se intercalam no ADN</u>	<ul style="list-style-type: none"> ● Antibióticos Antracíclicos (aclarrubicina, daunorrubicina e doxorrubicina)
<u>Inibidores das Tirosinacinasas</u>	<ul style="list-style-type: none"> ● Lapatinib
<u>Citotóxicos que interferem com a Tubulina</u>	<ul style="list-style-type: none"> ● Alcalóides da Vinca (vinblastina, vincristina e vindesina) ● Terpenóides (Paclitaxel)
<u>Outros citotóxicos</u>	<ul style="list-style-type: none"> ● Amsacrina ● Asparaginase ● Hidroxiureia ● Pentostatina

Tabela I Classificação de citostáticos baseada no mecanismo de ação^{[4][7]}

Agentes Alquilantes – Mostardas Azotadas

Mecanismo de Ação e Toxicidade

“O conhecimento da cinética individual dos citostáticos é indispensável, pois em situações clínicas de insuficiência hepática e renal é obrigatória a redução da posologia. (...) Na terapêutica citotóxica são de esperar, de um modo geral, reações adversas, tais como: náuseas e vômitos em grau variável, hiperuricemia (por lise tumoral), alopecia, alteração da resposta imunológica, depressão medular e efeitos teratogênicos.”^[5] O aparecimento de novos citostáticos e o aumento da sua utilização levam também ao aumento destas reações adversas e toxicidade. Portanto, é essencial um conhecimento detalhado da sua farmacologia (interações e farmacocinética) e também da pessoa (história clínica, idade e tolerância a reações adversas).^{[4][13]}

Com objetivo de diminuir os efeitos adversos realizam-se testes moleculares para identificar os pacientes mais suscetíveis a um determinado tratamento ou, pelo contrário, à toxicidade, permitindo assim melhorar os resultados. No entanto, há ainda um longo caminho a percorrer.^{[4][12]}

Com a aprovação do citostático mecloretamina em 1949 pela FDA, no tratamento de doenças hematológicas, os agentes alquilantes são a classe mais antiga de antineoplásicos. Apesar do seu uso clínico estar muito aquém das novas terapias direcionadas, estes continuam a ser a terapêutica de eleição no tratamento de doenças refratárias (resistentes ao tratamento).^[14]

Têm em comum a propriedade de formar iões de carbono reativos, estes por sua vez, ligam-se a locais de alta densidade eletrónica como grupos fosfato, aminas e hidroxilo. A sua capacidade citotóxica está assim relacionada com a alquilação das bases azotadas de ADN, oxigénios e fosfatos reativos do ADN, formando ligações covalentes com os ácidos nucleicos. A posição N7 de guanina é particularmente suscetível à ligação covalente.^[15] A alquilação leva a uma quebra na molécula de ADN impedindo assim a sua replicação e transcrição.^[4]

A toxicidade observada com o uso de agente alquilantes é atribuída à sua capacidade de danificar o ADN, tanto de células normais como de neoplásicas.^[16]

A maioria destes fármacos interfere com a medula óssea, originando mielossupressão (condição na qual a atividade da medula óssea diminui, resultante também numa diminuição dos glóbulos vermelhos, leucócitos e plaquetas)^[17]. Diminuem a imunidade adquirida^[18], celular (mediada por linfócitos T)^[19] e humoral (responsável pela defesa contra microrganismos do espaço extracelular, através de anticorpos produzidos por células B,

prevenindo infecções intracelulares).^[20] As células da mucosa em divisão e folículos capilares (alopecia) são também afetadas. A ocorrência de neurotoxicidade, como náuseas e alteração do estado mental são também frequentes.^{[13][4]}

Pertencente a estes, temos as MA que, tal como já referido acima, estabelecem ligações cruzadas com a molécula de ADN inibindo a sua replicação e transcrição.^[21]

Embora exista um elevado número de MA sintetizadas e testadas, atualmente apenas 5 são comuns na terapia oncológica. A sua característica química é o grupo bis (2-cloroetil), no qual a sua atividade farmacológica se baseia.

As MA mais comuns são a mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalano e clorambucil.^[22]

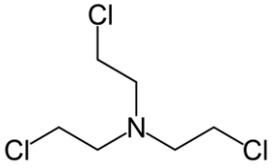
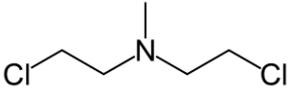
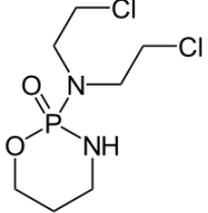
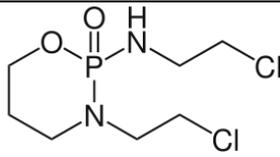
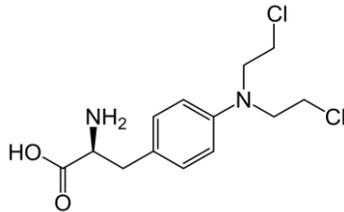
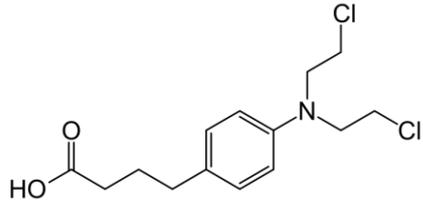
Mostardas Azotadas	
Mecloretamina	
Ciclofosfamida	
Ifosfamida	
Melfalano	
Clorambucil	

Tabela 2 Principais Mostardas Azotadas e sua estrutura química.[4]

A mecloretamina foi a primeira mostarda azotada a ser usada, sendo a mais reativa e portanto, atualmente pouco usada. O seu uso terapêutico mais comum é no tratamento do linfoma de Hodgkin (cancro que se desenvolve no sistema linfático)^[23]. As maiores manifestações adversas da mecloretamina são: náuseas, vômitos, lacrimação e mielossupressão.^[4] A leucopenia (redução anormal dos leucócitos na circulação sanguínea) e a trombocitopenia (número de plaquetas inferior a 150×10^3 por μL de sangue) limitam a quantidade de fármaco em cada administração.^{[24][25]}

A ciclofosfamida encontra-se na sua forma inativa até ser metabolizada no fígado.^[26] É normalmente usada em linfomas e Leucemia Linfocítica Crónica (LLC). A LLC é uma neoplasia hematológica linfoproliferativa que se caracteriza por uma acumulação progressiva de linfócitos B monoclonais funcionalmente incompetentes.^[27] O seu uso terapêutico é também aplicado no cancro da mama e ovário. Este cistostático pode causar principalmente náusea, mielossupressão e casos de hiponatremia (definida como o decréscimo da concentração de sódio para níveis inferiores a 136 mmol por litro).^{[15][16][30]} Pode ocorrer também cistite hemorrágica (definida como uma condição inflamatória difusa da bexiga, com uma etiologia infecciosa ou não infecciosa, resultando em sangramento a partir da mucosa da bexiga. A causa mais comum é a infeção bacteriana que geralmente responde prontamente ao tratamento. Mas uma hemorragia crónica muitas vezes surge a partir de quimioterapia).^[31] O uso de mesna é usado como agente profilático na redução da incidência de cistites hemorrágicas.^{[32][33]}

Relativamente à ifosfamida esta é principalmente usada nos tumores germinativos do testículo (TGT) (tumor sólido mais comum no homem dos 15 aos 35 anos)^[34] e sarcomas (cancro nas células derivadas da estrutura embrionária mesoderme)^[35]. A ifosfamida tem um perfil de toxicidade relativamente idêntico ao da ciclofosfamida. No entanto os casos de neurotoxicidade e nefrotoxicidade, muito provavelmente causadas pelo metabolito tóxico cloroacetaldéido são mais graves.^{[36][37]} Para atenuar estes efeitos é comum recorrer-se também ao mesna.

O melfalano é usado frequentemente no mieloma múltiplo (caracterizado pela acumulação de plasmócitos na medula óssea impedindo o desenvolvimento normal das células sanguíneas, havendo também produção de proteínas monoclonais, sem capacidade de anticorpo).^[38] No que se refere à toxicidade do melfalano, esta é maioritariamente hematológica e similar aos outros fármacos alquilantes. O vômito, náusea, alopecia e disfunção renal e hepática são menos frequentes.

O clorambucil é praticamente exclusivo para o tratamento da LLC. Este fármaco normalmente não provoca mielossupressão. Poderá ocorrer desconforto GI, azoospermia, amenorreia, convulsões, e hepatotoxicidade. [4]

Os citostáticos são frequentemente fármacos antiproliferativos não-seletivos, atuando a nível celular, durante o processo de divisão. Esta ausência de seletividade resulta numa elevada toxicidade para as células saudáveis, principalmente quando se trata de tumores sólidos, em que a divisão das células neoplásicas é lenta. Tanto a toxicidade como a resistência adquirida pelas células neoplásicas são o maior limite à terapia oncológica. São frequentes os casos de reaparecimento do tumor, sob forma resistente ao tratamento. [39] Com o intuito de melhorar a terapêutica oncológica e diminuir a toxicidade, tem-se apostado na síntese de pró-fármacos, como terapêutica direcionada. [40]

Pró-fármacos

Pró-fármacos são derivados biorreversíveis de fármacos que, depois de submetidos a um processo de transformação química ou enzimática “in vivo”, libertam o fármaco na sua forma ativa, podendo por fim realizar a sua ação farmacológica. [41] O uso de pró-fármacos envolve assim a síntese de derivados inativos do fármaco original, que irão posteriormente, já depois de administrados, sofrer ativação preferencialmente no local de ação, alcançando assim uma atividade terapêutica e seletiva. As estratégias de terapia direcionada beneficiam do baixo pH extracelular, número elevado de enzimas nos tecidos tumorais, ambiente hipóxico no interior do tumor e antigénios específicos expressos na superfície das células neoplásicas. O objetivo principal de um pró-fármaco é alterar temporariamente as propriedades físico-químicas do citostático, modificando conseqüentemente a sua farmacocinética (absorção, distribuição, metabolismo e excreção), prolongar a sua ação farmacológica, reduzir a toxicidade e efeitos adversos, aumentar a seletividade e superar os problemas de formulação. [39]

Há duas classes principais de pró-fármacos: pró-fármacos ligados covalentemente a transportadores e pró-fármacos biopercursos (modificados a nível molecular, tornando-se inativos). [42]

Espécies Reativas de Oxigénio

As espécies reativas de oxigénio (ROS) são moléculas reativas e radicais livres derivadas do oxigénio molecular. São originados no decorrer da cadeia respiratória que

ocorre a nível mitocondrial, durante a atividade de enzimas oxirredutoras e durante a oxidação catalítica de compostos metálicos. As ROS têm um papel preponderante na defesa do organismo, sinalização celular, incluindo apoptose celular, expressão génica e cascatas de sinalização celular.^[43]

As ROS podem ser categorizadas em dois grupos: radicais livres de oxigénio e ROS não radicalares. Os radicais livres de oxigénio incluem: superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxilo (HO^{\bullet}), óxido nítrico (NO), radicais orgânicos (R^{\bullet}), radicais peróxido (ROO^{\bullet}), radicais alcoxilo (RO^{\bullet}), radicais tiol (RS^{\bullet}), radicais sulfonilo (RSO_2^{\bullet}), radical tiol peróxido ($RSOO^{\bullet}$), e dissulfuretos (RSSR). As ROS não radicalares incluem peróxido de hidrogénio (H_2O_2), dioxigénio singlete (1O_2), ozono (O_3), hidroperóxidos orgânicos (ROOH), ácido hipocloroso (HOCl), peroxinitrito (ONO^-), anião nitrosoperoxicarbonato ($O=NOOCO_2^-$), anião nitrocarboneto ($O_2NOCO_2^-$), hiponitrito ($[ON=NO]^{2-}$) e ião nitrónio (NO_2^+). Entre eles, o superóxido, o peróxido de hidrogénio e os radicais hidroxilo são os mais estudados no que se refere ao cancro.^{[39][44]}

Um elevado número de células neoplásicas apresenta um alto stresse oxidativo, principalmente devido ao facto de não existir um equilíbrio no seu estado redox intracelular.^[45] O facto de as ROS estarem presentes num número tão elevado permitem uma superior transformação oncogénica, uma vez que há um maior dano na molécula de ADN e conseqüentemente um maior número de mutações. Tirar vantagens destas características únicas das células neoplásicas é um dos principais desafios na terapia oncológica direcionada. Têm-se realizado diversos estudos, relativamente à inibição da proliferação das células neoplásicas, através de antioxidantes químicos e enzimáticos.^[46]

Por outro lado, o nível elevado de ROS característico de células neoplásicas pode ser utilizado como ativador de pró-fármacos em terapia direcionada. Como já foi referido reduzir a toxicidade da terapia oncológica é um dos maiores desafios hoje em dia.

Indução de alquilação do ADN por ROS

Nas últimas décadas, vários investigadores desenvolveram novos fármacos alquilantes que por reações de oxidação, redução e fotólise, induzem a formação de ligações cruzadas com o ADN.^[47] Recentemente, vários pró-fármacos, cujo mecanismo de ativação é influenciado por ROS, têm sido desenvolvidos para atingir seletivamente as células neoplásicas. Certos pró-fármacos de MA podem ser ativados pelas ROS, libertando então o fármaco na sua forma ativa e conseqüentemente atuando seletivamente nas células neoplásicas da CLL, exercendo assim uma menor toxicidade nos linfócitos normais. Estes

fármacos, na presença de H_2O_2 , adquirem uma maior afinidade para efetuarem ligações cruzadas com a molécula de ADN, impedindo a sua replicação e transcrição, o que leva à morte celular; enquanto na sua ausência essa afinidade é mais restrita. As ligações cruzadas com a molécula de ADN definem o modo de atuação das já referidas MA (clorambucil, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalano e mecloretamina).^[45]

O H_2O_2 , uma ROS bastante comum, é produzido em larga escala em vários tipos de células neoplásicas apresentando níveis dez vezes superiores às células normais. As propriedades do H_2O_2 , designadamente: níveis elevados, concentrações estáveis “in vivo”, ausência de carga e o facto de praticamente todas as fontes de radicais de oxigénio lhe poderem dar origem, permitem que se difunda livremente através das membranas citoplasmáticas e entre nas células.^[48]

De referir portanto que, desenvolver pró-fármacos dependentes de H_2O_2 para a sua ativação, com o objetivo de atingir seletivamente células neoplásicas ricas em ROS, é uma estratégia extremamente eficaz na terapia oncológica.

Estes pró-fármacos consistem em dois domínios funcionais: um “trigger”, responsável por reagir na presença de H_2O_2 e um “effector”, grupo funcional que provoca o dano celular. A reação do “trigger” com o H_2O_2 deve aumentar o poder citotóxico do “effector”.^[45]

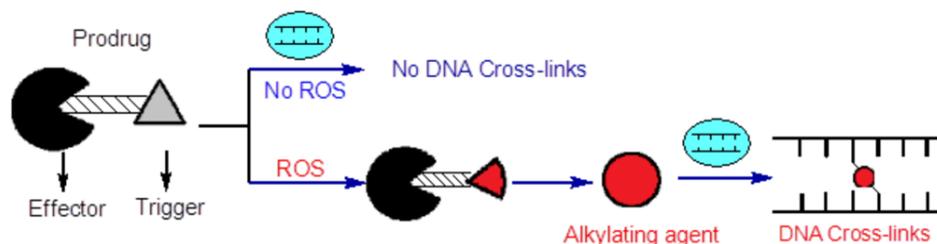


Figura 2 Alquilação seletiva do ADN por um pró-fármaco, induzida por ROS^[45]

A reação seletiva de um derivado aromático (arilo) do ácido bórico ou dos seus derivados de ésteres com H_2O_2 tem sido aplicada na deteção por fluorescência de H_2O_2 intracelular, expressão génica e desenvolvimento de pró-fármacos. Estes compostos não provocam normalmente qualquer tipo de toxicidade humana intrínseca, assim como o composto final resultante (ácido bórico). Estas características permitem a sua utilização como “trigger”, no desenvolvimento de pró-fármacos ativados por ROS. As MA são usadas como “effector”.^[39] Há ainda um outro tipo de pró-fármacos ativados por ROS, os quais depois de ativados originam metileno-quinonas (um dos grupos carbonilo das quinonas é substituído por um grupo metileno) alquilantes. No entanto, ambos iriam originar moléculas com carga, dificultando a sua entrada na célula e colocando todo o processo de terapia

oncológica em causa. A solução é sintetizar pró-fármacos que após a ativação não adquiram carga, podendo assim entrar no meio intracelular, e sejam igualmente citotóxicos e seletivos.^[45]

A ligação direta do elemento químico Boro a um anel aromático é suficiente para tornar as MA inertes. O seu potencial terapêutico foi demonstrado através da comparação da toxicidade e seletividade em linfócitos neoplásicos de doentes com LLC e linfócitos de dadores saudáveis.

Os compostos sintetizados apresentam dois sistemas de ligação e vários “leaving groups”.^[45]

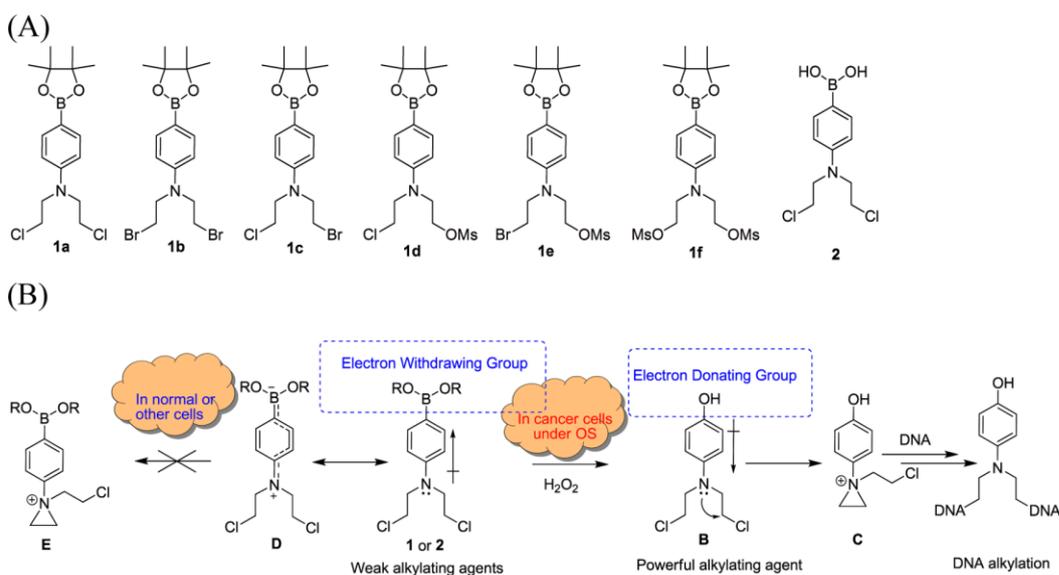


Figura 3 (A) Estruturas de pró-fármacos (B) Mecanismo de ação de pró-fármacos seletivos para células com ROS^[45]

Os compostos 1a-f e 2 apresentam o grupo de MA diretamente ligado ao anel aromático (Figura 3 A). Uma vez que o grupo boronato apresenta uma elevada eletronegatividade, provoca diminuição da densidade eletrónica no anel.^[45] Por outro lado, o Azoto é um forte ativador, doador de eletrões,^[49] originando um efeito de ressonância e, conseqüentemente, a formação de uma nuvem eletrónica uniformemente distribuída pela molécula (D). Sendo portanto estáveis, impedem a formação da aziridina (E) nos pró-fármacos na ausência de ROS, que tornaria o composto tóxico (Figura 3 B), uma vez que é esta que estabelece ligações cruzadas com o ADN. São assim considerados fracos agentes alquilantes. No entanto, na presença de ROS, ocorre a oxidação da ligação Boro-Carbono pelo H_2O_2 , ocorrendo a formação de um grupo hidroxilo (doador de eletrões). Conseqüentemente a molécula deixa de ser estável e há um movimento de eletrões do

átomo de azoto para o de cloro (B), permitindo a formação da aziridina (C), altamente eletrofílica, potente alquilante da molécula de ADN.

A síntese dos pró-fármacos 1a-f e 2 (Figura 4) iniciou-se a partir da *p*-bromoanilina (4). Seguidamente promove-se a reação do composto (4) com o 2-cloroetanol, usando carbonato de cálcio (6). Por uma reação catalizada por paládio obteve-se o intermediário de boro (8). Este por sua vez reage com o MsCl (cloreto de mesilo) originando a MA (1f) com um rendimento de 80%. Uma reação de substituição nucleofílica de 1f com cloreto de lítio ou brometo de lítio resultará respetivamente em 1a, 1d ou 1b e 1e. O composto 1d será convertido no 1c por adição de brometo de lítio.

Para a síntese do derivado aromático do ácido bórico (2) (Figura 4 B), o composto 6 foi inicialmente convertido numa mostarda com dois substituintes cloro (9), na presença de MsCl. O tratamento desta com *n*-butil-lítio (*n*-Bu-Li) e borato de triisopropilo e posterior hidrólise originou o composto 2.^[45]

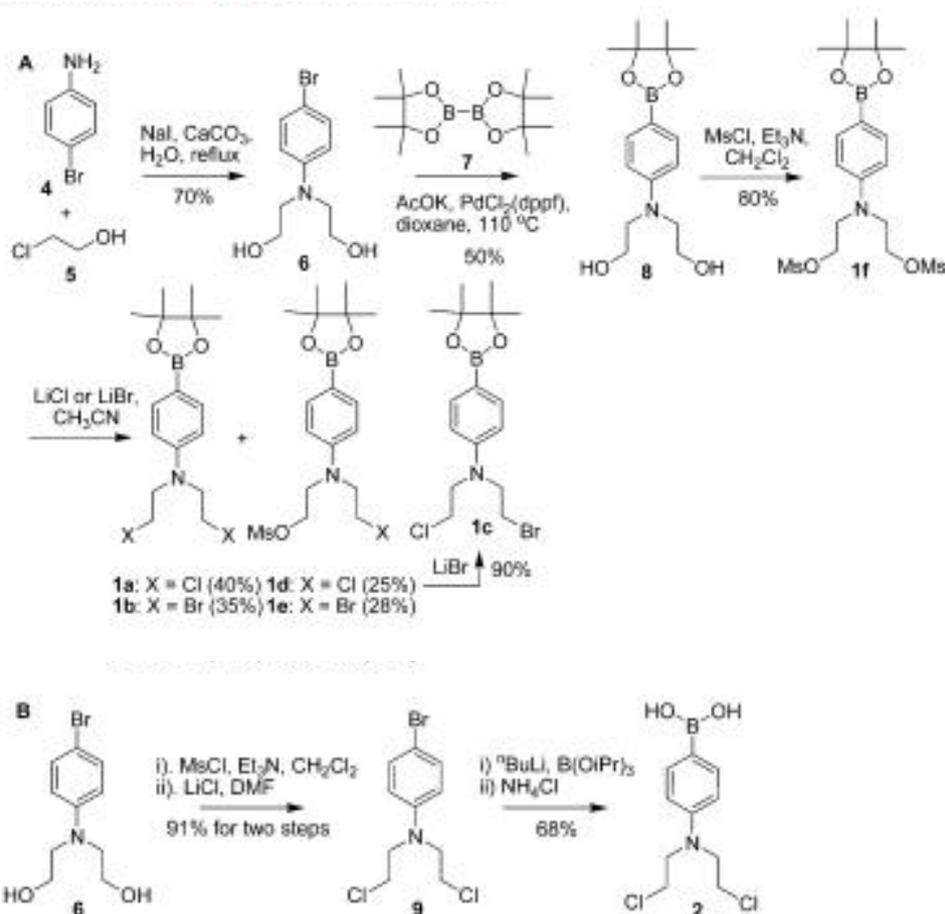


Figura 4 (A) Síntese dos pró-fármacos 1a-f (B) Síntese do pró-fármaco 2^[45]

A alquilação da molécula de ADN por MA envolve preferencialmente os nucleótidos de guanina de cadeias antiparalelas de sequências 5'-GNC (em que N é um qualquer nucleótido).^{[50], [51]}

A seletividade e capacidade destes compostos, 1a-f e 2, para exercerem reações de alquilação na molécula de ADN foi demonstrada utilizando uma sequência 5'-GNC terminal 12a e 12b (Fig. 5). No entanto, posteriormente sintetizou-se outra sequência com GNC no meio e comparou-se o rendimento das ligações cruzadas em ambas as moléculas. A sequência terminal de GNC obteve um maior rendimento, contudo estes registos mostram que a atividade e seletividade dos agentes alquilantes pode ser alcançada com uma variedade de sequências de ADN.

Na ausência de H_2O_2 não ocorreram ligações cruzadas de 1a-e e 2, com a molécula de ADN. 1f induziu 22% de LC ao ADN. O composto 1f contém dois grupos mesilato, enquanto os outros têm um ou nenhum. O facto de o mesilato ser um melhor “leaving group” poderá explicar a elevada reatividade de 1f na ausência de H_2O_2 , quando comparado com os restantes. Tais registos confirmam que o grupo borato é suficiente, para inativar as mostardas com dois substituintes halogéneos ou um substituinte mesilato e outro halogénio. No entanto, não inativam por completo as mostardas dimesilato.

A adição de H_2O_2 ativa os compostos 1a-e e 2, permitindo que estes estabeleçam ligações cruzadas eficientes com a molécula de ADN (37%-49%). Similarmente, a ocorrência das ligações cruzadas pelo composto 1f aumentou para o triplo. De referir também que as reações de alquilação não ocorreram na ausência dos pró-fármacos, independentemente da presença ou não de H_2O_2 .

Estes resultados são explicados, como já referido anteriormente, pela elevada eletronegatividade do grupo borato, que na presença de ROS, origina um grupo hidroxilo doador de eletrões. Consequentemente aumenta a densidade eletrónica da MA, facilitando a alquilação do ADN (Figura 3 B).

Mais especificamente, entre todos os pró-fármacos com diferentes “leaving groups”, aqueles que apresentavam mesilato na sua constituição sofriam de uma maior indução na reação de alquilação da molécula de ADN na presença de H_2O_2 , relativamente aos que apresentavam grupos de halogénios. A capacidade de indução foi a seguinte: 1f > 1d ~ 1e > 1a ~ 1b ~ 1c. 1f com dois grupos mesilato apresentou uma ocorrência de 66% de ligações cruzadas com o DNA, 1d e 1e com um grupo halogénio e um grupo mesilato apresentaram uma incidência de 47% e 48% de ligações cruzadas, respetivamente, por último apenas 35%-37% de incidência foi observado com 1a, 1b e 1c, com dois grupos halogénios cada. Não foi observada nenhuma diferença significativa, entre substituintes bromo ou cloro (Figura 5).

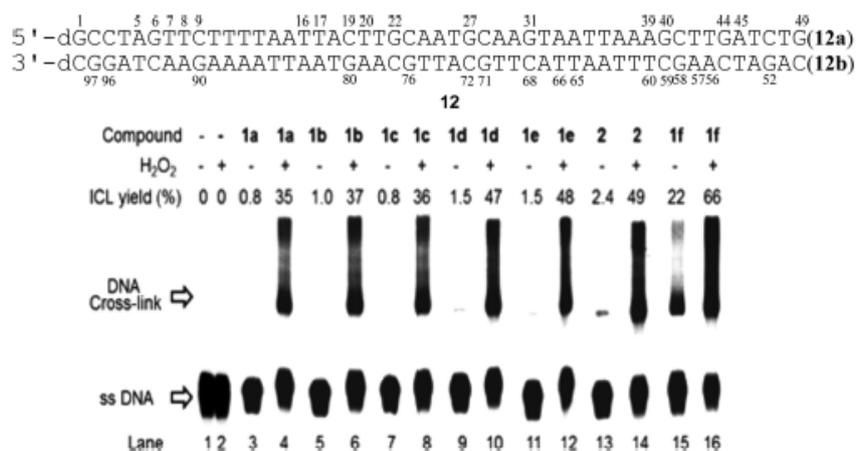


Figura 5 Comparação da indução de LC seletivas por 1a-f e 2 na presença de H₂O₂. Análise das LC de 1a-f e 2 com o ADN por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida^[45]

Foi ainda investigada a atividade dos pró-fármacos 1a, 1d e 2, na presença de outras ROS como Hidroperóxido de terc-butilo (TBHP), ião hipoclorito (OCl⁻), radical hidroxilo (OH[•]), radical t-butoxi (^tBuO[•]), ião óxido (O²⁻) e óxido nítrico (NO). Entre todas estas ROS, o H₂O₂ é o mais eficaz na ativação dos pró-fármacos, com rendimento de 30-47%. As ROS TBHP, OCl⁻ e O₂⁻ ativam levemente os pró-fármacos 1a, 1d e 2, com rendimentos de 1.0-3.6%, 0.9-6.6% e 5-15%, respetivamente. O ^tBuO[•], o NO e o HO[•] não têm qualquer efeito sobre os pró-fármacos (Figura 6). Estes dados são consistentes com os registos prévios de ativação seletiva dos pró-fármacos com H₂O₂.^[45]

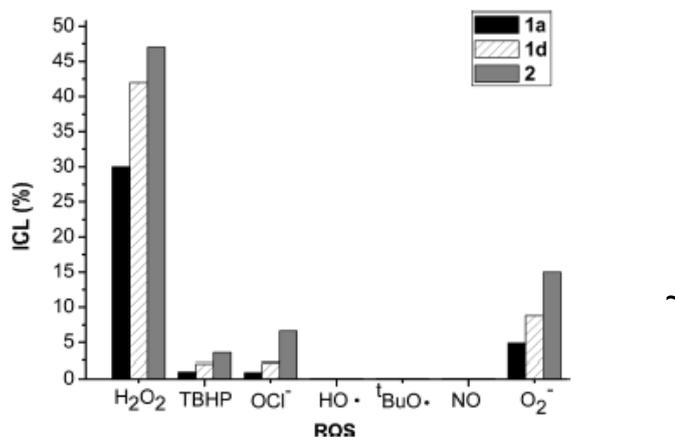


Figura 6 LC estabelecidas por 1a, 1d e 2 na presença de diferentes ROS^[45]

Para comprovar a síntese no análogo alquilante hidroxilo (13) (Figura 7) por ativação dos pró-fármacos 1a e 2 na presença de H₂O₂, fez-se reagir o composto 1a (20 μmol) ou 2 (20 μmol), com H₂O₂ (30 μmol), numa mistura de fosfato de potássio deuterado (pH 8) (50 μL) e sulfóxido de dimetilo-d₆ (DMSO-d₆) (450 μL).

Na presença de H_2O_2 ocorreu a reação de oxidação de 1a formando o composto 13 e ácido borónico (1C) (Figura 7). O composto 1C foi ainda hidrolisado a 2,3-dimetil-2,3-butanodiol (1D). O intermediário 1B tem uma reatividade bastante elevada. Consequentemente a conversão de 1a para 13 é extremamente rápida, sendo de 80% em apenas 30 minutos, e superior a 95% em

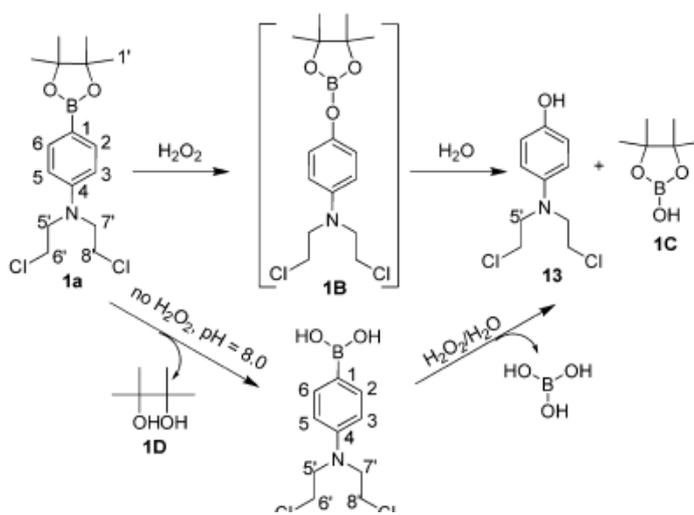


Figura 7 Ativação de 1a e 2 por H_2O_2 [45]

duas horas. Todos estes dados revelam que os pró-fármacos utilizados neste estudo são de fato eficazes. Foi realizado ainda um controlo, na ausência de H_2O_2 , permitindo assegurar a sua importância na ativação de pró-fármacos. Como esperado, não ocorreu formação do composto 13, resultando somente em 1D e 2 (referido anteriormente), compostos que não têm qualquer efeito sobre a molécula de ADN. No que se refere ao composto 2, este pode ser convertido também no 13, na presença de H_2O_2 , em cerca de 93% em duas horas. [45]

A seletividade e a citotoxicidade foram posteriormente avaliadas em sistemas biológicos. Todos mostraram uma inibição do crescimento das linhas celulares testadas. A percentagem de crescimento da maioria das linhas celulares foi inferior a 50, com uma dose única de $10 \mu M$. Comparando a inibição de crescimento celular das MA aromáticas, com a mecloretamina, conclui-se que o poder de inibição das primeiras é bastante superior. Apesar das razões não serem ainda bem claras, isto poderá ser explicado pelo facto da mecloretamina ser carregada positivamente e, portanto, difundir-se com mais dificuldade para o interior da célula.

Uma vez que não houve uma diferença significativa, entre os compostos que diferiam apenas no tipo de halogénios, usou-se como representativos os compostos 1a, 1c, 1d e 2 para avaliar a inibição do crescimento celular. [45] Os resultados foram expressos em valores de GI_{50} , que correspondem à concentração de amostra correspondente a 50% de inibição máxima de proliferação celular. [52] Todos os 4 pró-fármacos, depois de ativados, exibiam um elevado nível de toxicidade nas linhas celulares testadas. Recorreram-se a células de vários doentes com vários tipos de cancro, entre eles leucemia, cancro do cólon, melanoma,

cancro do ovário e cancro da mama. O GI_{50} variou entre 0.23 e 31.4 μM , não tendo no entanto na maior parte dos casos atingido os 5 μM .

No que se refere especificamente a células neoplásicas em doentes com LLC, os pró-fármacos 1a, 1c e 2 induziram apoptose num elevado número de amostras celulares, sendo o composto 2, o que obteve o menor IC_{50} (concentração do fármaco que provoca 50% de citotoxicidade na cultura celular), entre 5 e 6 μM .^[52] Foi também avaliada a toxicidade dos pró-fármacos em linfócitos saudáveis. O resultado foi um decréscimo da apoptose celular relativamente às células neoplásicas. Isto, porque como já referido anteriormente, estas últimas apresentam elevado stress oxidativo e, conseqüentemente, elevada quantidade de ROS, que são as responsáveis pela ativação dos pró-fármacos.^[45]

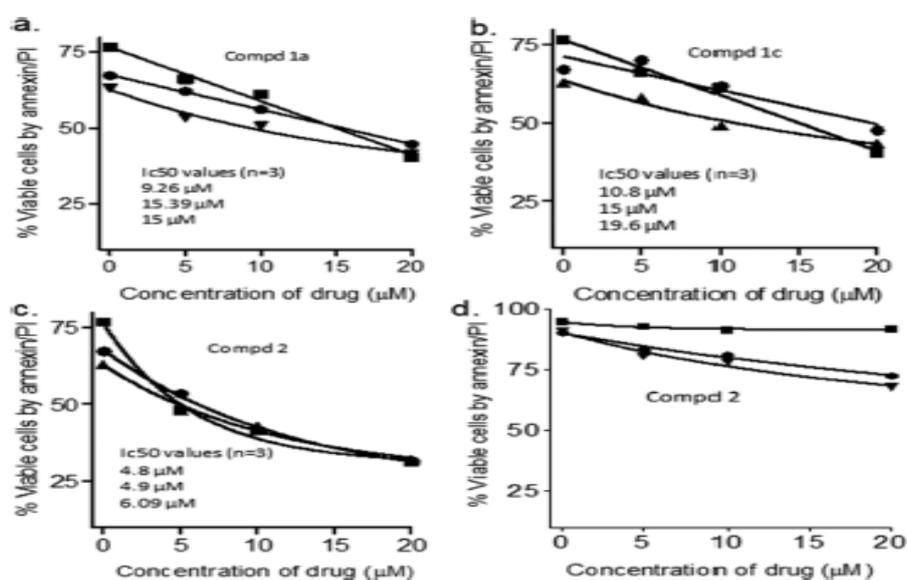


Figura 8 Apoptose dose-dependente das células neoplásicas de doentes com LLC e células saudáveis com 1a, 1c e 2 durante 24h. (A) células de LLC com 1a (B) célula de LLC com 1c (C) células de LLC com 2 (D) linfócitos normais com 2^[45]

Outro estudo realizado para comprovar a ativação dos pró-fármacos por ROS, foi a inibição da formação de ROS pelas células neoplásicas, através do uso de N-acetilcisteína (NAC). Esta inibição irá impedir a ativação dos pró-fármacos e conseqüentemente a sua toxicidade. Os resultados mostraram que na presença de NAC (100 mM) a apoptose induzida pelo composto 1c (10 μM) foi nula.^[45]

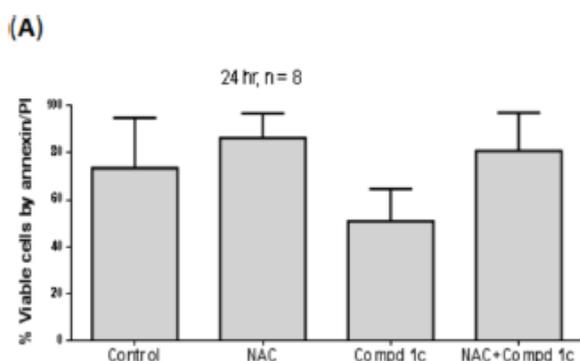


Figura 9 Comparação da apoptose induzida pelo pró-fármaco 1c ativado por H_2O_2 , na presença e na ausência de (NAC) ^[45]

Conclusão

O uso de citostáticos em terapia oncológica é bastante elevado e, com o aumento do número de casos de cancro, irá ser ainda superior. Não só por este motivo, mas também em consequência da sua elevada toxicidade e resistência por parte das células neoplásicas, é fundamental que se encontrem alternativas com resultados mais favoráveis e satisfatórios para as células neoplásicas, e menos agressivos para as células saudáveis.

Os alquilantes são dos citostáticos a que mais se recorre, apresentando no entanto graves efeitos adversos e elevada toxicidade. O uso de pró-fármacos não se restringe apenas a otimizar a formulação de um fármaco para que este tenha uma absorção, distribuição, metabolismo e excreção melhoradas. São também indispensáveis na terapia oncológica direcionada e na redução da toxicidade das células saudáveis.

Na presente monografia relataram-se estudos realizados com pró-fármacos de mostardas azotadas, sendo estas responsáveis pela alquilação da molécula de ADN e consequentemente impedir a sua replicação. Estes são apenas ativados na presença de H_2O_2 presente nas células neoplásicas. Os resultados obtidos revelam que é possível encontrar estratégias de melhoramento da terapia oncológica.

No estudo relatado, o uso do Boro na formação de pró-fármacos com mostardas azotadas revelou-se eficaz. Estes compostos, apresentam uma grande seletividade para as células neoplásicas, uma vez que se encontram em stresse oxidativo e contêm espécies reativas de oxigénio, nomeadamente H_2O_2 .

Recorrendo a propriedades características de células neoplásicas é possível encontrar estratégias terapêuticas, utilizando citostáticos que permitam ao doente ter uma melhor qualidade de vida e uma maior esperança de vida, sendo este um dos principais objetivos das investigações efetuadas nesta área.

Nas últimas décadas observou-se um grande avanço na terapia oncológica, atingindo-se novas descobertas e novas estratégias, já postas em prática hoje em dia.

Bibliografia

- [1] A. S. Nuno Miranda, Paulo Nogueira, “Direção Geral de Saúde,” *Direção geral da Saúde*, 2013.
- [2] “Liga Contra o Cancro.”
- [3] G. C. Winkler, E. L. Barle, G. Galati, and W. M. Kluwe, “Functional differentiation of cytotoxic cancer drugs and targeted cancer therapeutics,” *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 70, no. 1, pp. 46–53, 2014.
- [4] T. P. Basis, *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 12E*. .
- [5] “Infarmed.”
- [6] K. Johansson, M. Ito, C. M. S. Schophuizen, S. M. T, J. Zhang, M. Shimoji, M. E. Vahter, W. H. Ang, P. Joseph, A. Shibata, S. Shuto, Y. Ito, H. Abe, and R. Morgenstern, “Characterization of new potential anti-cancer drugs designed to overcome glutathione transferase mediated resistance Characterization of new potential anti-cancer drugs designed to overcome glutathione transferase mediated resistance,” *Mol. Pharm.*, pp. 1698–1708, 2011.
- [7] Infarmed, *Prontuário Terapêutico-11*. 2012.
- [8] R. W. Ruddon, *Cancer Biology*. 2007.
- [9] *Robbins Basic Pathology*, 9^a ed. 2013.
- [10] R. Henrique, “Biologia da célula neoplásica e interação com o hospedeiro,” *Neoplasia*.
- [11] G. M. Cooper., “The Cell, 2nd edition,” 2000.
- [12] J. Blakeley and S. a. Grossman, *Chemotherapy with cytotoxic and cytostatic agents in brain cancer*, 1st ed., vol. 104. Elsevier B.V., 2012.
- [13] M. Hallek and W. Dc, “Signaling the end of chronic lymphocytic leukemia : new frontline treatment strategies Signaling the end of chronic lymphocytic leukemia : new frontline treatment strategies,” vol. 122, no. 23, pp. 3723–3734, 2013.
- [14] F. Université de Bordeaux, Institut Bergonié, “Alkylating agents,” 2011.
- [15] B. T. Oronsky, T. Reid, S. J. Knox, and J. J. Scicinski, “The scarlet letter of alkylation: a mini review of selective alkylating agents,” *Transl. Oncol.*, vol. 5, no. 4, pp. 226–9, 2012.
- [16] J. B. A. G. P. MARGISONt, “Reduction of the toxicity and mutagenicity of alkylating agents in mammalian cells harboring the Escherichia coli alkyltransferase gene.” 1986.
- [17] “National Cancer Institute.”

- [18] and K. Y. Editors: Ann Arvin, Gabriella Campadelli-Fiume, Edward Mocarski, Patrick S. Moore, Bernard Roizman, Richard Whitley, *Human Herpesviruses Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. 2007.
- [19] E. S. Baron., “Medical Microbiology, 4th edition,” 1996.
- [20] and M. J. S. Charles A Janeway, Jr, Paul Travers, Mark Walport, “Immunobiology, 5th edition The Immune System in Health and Disease,” 2001.
- [21] S. Inturi, N. Tewari-singh, C. Agarwal, and C. W. White, “HHS Public Access,” pp. 53–63, 2015.
- [22] M. Editors: Donald W Kufe, MD, Raphael E Pollock, MD, PhD, Ralph R Weichselbaum, MD, Robert C Bast, Jr, MD, Ted S Gansler, MD, MBA, James F Holland, MD, ScD (hc), and Emil Frei, III, “Holland-Frei Cancer Medicine, 6th edition,” 2003.
- [23] P. health Glossary, “NIH - National Library of Medicine.”
- [24] V. W. Ing, “The etiology and management of leukopenia.,” *Can. Fam. Physician*, vol. 30, pp. 1835–1839, 1984.
- [25] M. M. Braun and R. L. Gauer, “Thrombocytopenia,” *Am. Fam. Physician*, vol. 85, no. 6, pp. 612–622, 2012.
- [26] I. W. G. on the E. of C. R. to Humans, “Pharmaceuticals IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, No. 100A,” 2012.
- [27] “Associação Portuguesa Contra a Leucemia.”
- [28] 2 and Amaal Gulied I Shereen Elazzazy, I Asmaa Elhassan Mohamed, “Cyclophosphamide-induced symptomatic hyponatremia, a rare but severe side effect: a case report,” 2014.
- [29] M. D. Horacio J. Adrogué, M.D., and Nicolaos E. Madias, “Hyponatremia,” 2000.
- [30] K. W. Omdal RI, Husby G, “Intravenous and oral cyclophosphamide pulse therapy in rheumatic diseases: side effects and complications,” 1993.
- [31] and L. N. D. R. Manikandan, Santosh Kumar, “Hemorrhagic cystitis: A challenge to the urologist,” 2010.
- [32] Infarmed, “Uromitexan, Folheto Informativo,” vol. 8, 2014.
- [33] H. J. Laberke SI, Zenker I, “Mesna and furosemide for prevention of cyclophosphamide-induced sterile haemorrhagic cystitis in dogs--a retrospective study.,” 2014.
- [34] S. Meireles, I. Augusto, D. Almeida, A. Carneiro, U. Ribau, and M. Damasceno, “Quimioterapia de altas doses com transplante autólogo de células progenitoras hematopoiéticas nos tumores germinativos do testículo,” pp. 68–70, 2014.

- [35] U. Department of Surgical Oncology and Biostatistics, University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, "Soft tissue sarcomas.," 2004.
- [36] A. Benesic, G. Schwerdt, I. Hennemeier, C. Sauvart, S. Mildenberger, and M. Gekle, "The nephrotoxic ifosfamide-metabolite chloroacetaldehyde interferes with renal extracellular matrix homeostasis," *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 33, no. 4, pp. 1106–1116, 2014.
- [37] T. Storme, A. Deroussent, L. Mercier, E. Prost, M. Re, F. Munier, T. Martens, P. Bourget, G. Vassal, J. Royer, and A. Paci, "New ifosfamide analogs designed for lower associated neurotoxicity and nephrotoxicity with modified alkylating kinetics leading to enhanced in vitro anticancer activity.," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 328, no. 2, pp. 598–609, 2009.
- [38] A. Manuscript, "NIH Public Access," *Changes*, vol. 29, no. 6, pp. 997–1003, 2012.
- [39] A. Manuscript, *NIH Public Access*, vol. 29, no. 6. 2012.
- [40] S. H. Groot FMI, Damen EW, "Anticancer prodrugs for application in monotherapy: targeting hypoxia, tumor-associated enzymes, and receptors.," 2001.
- [41] S. J. Rautio JI, Kumpulainen H, Heimbach T, Oliyai R, Oh D, Järvinen T, "Prodrugs: design and clinical applications," 2008.
- [42] J. B. Zawilska, J. Wojcieszak, and A. B. Olejniczak, "Prodrugs: A challenge for the drug development," *Pharmacol. Reports*, vol. 65, no. 1, pp. 1–14, 2013.
- [43] P. Held, "An Introduction to Reactive Oxygen Species Measurement of ROS in Cells," *BioTek Instruments*, pp. 1–14, 2012.
- [44] A. H.-Y. and F. L.-S. H.-U. Simon, "Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction," 2000.
- [45] W. Chen, K. Balakrishnan, Y. Kuang, Y. Han, M. Fu, V. Gandhi, and X. Peng, "Reactive oxygen species (ROS) inducible DNA cross-linking agents and their effect on cancer cells and normal lymphocytes," *J. Med. Chem.*, vol. 57, no. 11, pp. 4498–4510, 2014.
- [46] L. Behrend, G. Henderson, and R. Zwacka, "Reactive oxygen species in oncogenic transformation.," *Biochem. Soc. ...*, vol. 31, no. Pt 6, pp. 1441–4, 2003.
- [47] A. Manuscript and T. A. Prodrugs, "NIH Public Access," vol. 133, no. 48, pp. 19278–19281, 2012.
- [48] A. Manuscript and P. B. Block, "NIH Public Access," vol. 18, no. 13, pp. 3850–3854, 2013.
- [49] E. Powell, Y. H. Lee, R. Partch, D. Dennis, T. Morey, and M. Varshney, "Pi-Pi complexation of bupivacaine and analogues with aromatic receptors: implications for overdose remediation.," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 2, no. 3, pp. 449–459, 2007.

- [50] T. N. Balcome S, Park S, Quirk Dorr DR, Hafner L, Phillips L, “Adenine-containing DNA-DNA cross-links of antitumor nitrogen mustards,” 2004.
- [51] and N. T. J. T. M. † T. C. H. Kris Murphy‡, “The 5'-GNC Site for DNA Interstrand Cross-Linking is Conserved for Diepoxybutane Stereoisomers,” 2006.
- [52] D. T. P. Trafalis, D. Tsavdaridis, C. Camoutsis, V. Karayiani, D. Mourelatos, E. Chrysogelou, P. Dalezis, A. Athanassiou, G. a. Pangalis, and A. Papageorgiou, “Preclinical studies on NSC290205 aza-steroid alkylator activity in combination with adriamycin against lymphoid leukaemia,” *Br. J. Haematol.*, vol. 128, no. 3, pp. 343–350, 2005.