

Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

**THIAGO ANDRÉ RAMOS DOS SANTOS**

**Avaliação da atividade anticâncer e imunomoduladora de derivados  
de ftalimidas, hidrazonas e tiazóis**

Recife  
2014

**THIAGO ANDRÉ RAMOS DOS SANTOS**

**Avaliação da atividade antitumoral e imunomoduladora de derivados de  
ftalimidas, hidrazonas e tiazóis**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do Título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Orientadora: Profa. Dr<sup>a</sup>. Valéria Rego Alves Pereira.

Co-orientadora: Profa. Dr<sup>a</sup>. Ana Cristina Lima Leite.

Recife

2014

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Santos, Thiago André Ramos dos

Avaliação da atividade anticâncer e imunomoduladora de derivados de ftalimidas, hidrazonas e tiazóis / Thiago André Ramos dos Santos. – Recife: O Autor, 2014.

115 folhas: il.

Orientadores: Valéria Rego Alves Pereira, Ana Cristina Lima Leite  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Inovação Terapêutica, 2014.

Inclui bibliografia e apêndices

1. Câncer - Quimioterapia 2. Câncer – Tratamento I. Pereira, Valéria Rego Alves (orient.) II. Leite, Ana Cristina Lima (coorient.) III. Título.

**616.994**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB-2014-121**

**THIAGO ANDRÉ RAMOS DOS SANTOS**

**Avaliação da atividade anticâncer e imunomoduladora de derivados de ftalimidas, hidrazonas e tiazóis**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do Título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Orientadora: Profa. Dr<sup>a</sup>. Valéria Rego Alves Pereira.

Co-orientadora: Profa. Dr<sup>a</sup>. Ana Cristina Lima Leite.

Aprovada em: 19 / 02 / 2014

**Banca Examinadora**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Teresinha Gonçalves da Silva / UFPE

---

Dr<sup>a</sup>. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro / UFPE

---

Prof<sup>a</sup>. Dr. Valéria Rêgo Alves Pereira / CPqAM - FIOCRUZ

Dedico o presente trabalho à Aline, a meus pais e a meu irmão, sem os quais não seria possível seu desenvolvimento e conclusão.

## AGRADECIMENTOS

Ao Senhor, digno de toda a honra e louvor, pois sei que sem Ele nada do que foi feito se faria;

À minha orientadora Dr<sup>a</sup> Valéria Pereira, pela oportunidade que me concedeu de fazer parte de seu grupo de pesquisa, e pela amizade que vai além da academia;

À minha noiva Aline que foi uma excelente companheira no desenvolvimento deste trabalho;

A meu Pai Heleno, minha mãe Nair e meu irmão Lucas, pois sem eles não teria concluído esse trabalho;

À professora Dr<sup>a</sup> Ana Cristina Lima Leite (LABSINFA/UFPE), pela orientação e colaboração na síntese dos compostos testados, bem como a Paulo André, Diogo Moreira, Elany Silva e aos demais membros do laboratório de síntese de fármacos.

À professora Dr<sup>a</sup> Terezinha Gonçalves da Silva, que gentilmente nos cedeu a linhagem tumoral K562, além de fazer parte da banca examinadora deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Imunogenética: Amanda Ferreira, Andresa Oliveira (e Adam), Beatriz Coutinho, Marina Assis, Thays Almeida, Lucas Rocha, Maria Carolina (Carol) e ao Prof<sup>o</sup> Rafael Freitas.

Aos amigos do mestrado do PPGIT, que tornaram tudo mais especial;

Ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica (PPGIT), na pessoa de seu coordenador, prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> César Andrade, pela oportunidade e apoio em tudo. Ao secretário do PPGIT, Paulo Germano, pela ajuda e presteza sempre que houve necessidade. À prof<sup>a</sup> Suely Galdino (*in memoriam*), pelo atenção e dedicação que lhe eram peculiares;

A CAPES, pela bolsa de mestrado concedida;

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, meus agradecimentos.

## RESUMO

O câncer continua sendo uma das principais causas de morte em todo o mundo, tendo causado 8,2 milhões de mortes em 2012. A química medicinal contribuiu na descoberta dos primeiros medicamentos desenvolvidos para o câncer, e continua uma abordagem atual no desenvolvimento de novas alternativas e potenciais candidatos a fármacos antitumorais. O desenvolvimento de pequenas moléculas com atividade biológica é importante, pois proporciona novas alternativas ao tratamento do câncer. Neste trabalho, foram avaliadas quatro séries de compostos quanto a sua ação citotóxica, anticâncer e imunomodulatória. Esses compostos, contendo os grupamentos ftalimida, hidrazona e tiazol em sua estrutura foram codificados como AT, EP, PM e PA/PT. Uma triagem inicial foi feita com esplenócitos murinos, avaliando o efeito dos compostos sobre a proliferação celular, utilizando timidina tritiada. Também foi avaliado o efeito citotóxico sobre a linhagem de macrófago J774A.1 e a atividade anticâncer sobre as linhagens HT-29, B16F10, Jurkat e K562, pela técnica do MTT. Avaliou-se, com as linhagens HT-29 e Jurkat, a indução de apoptose/necrose por citometria de fluxo, após incubação com os compostos testados. O efeito da incubação com os compostos na produção das citocinas TNF, IL-10 e IL-12 foi investigado por ELISA, utilizando sobrenadantes de cultura de macrófagos da linhagem J774A.1. Os resultados obtidos demonstraram que as moléculas testadas apresentaram comportamento variado, de acordo com a classe e substituintes. Em relação à atividade sobre esplenócitos, os compostos demonstraram, de maneira geral, baixa influência sobre a proliferação dessas células. Também foram observadas variações nos valores de  $CC_{50}$  sobre a linhagem de macrófagos J774 A.1. Sobre a linhagem tumoral HT-29, os compostos PM, EP2, PT01.14 e AT9 apresentaram maior efeito citotóxico, com menores valores de  $CC_{50}$ , sendo o composto PM o mais efetivo. Já sobre a linhagem B16F10 os compostos mais efetivos, com menores valores de  $CC_{50}$ , foram: EP3, PA04, AT2 e PM08. Com relação à linhagem tumoral Jurkat, os compostos PT01.6, PM08, EP1 e AT1 apresentaram os menores valores de  $CC_{50}$ , sendo o composto PT01.6 o mais efetivo. Já os ensaios com a linhagem K562 revelaram os compostos PM06, EP3, PT01.9 e AT6 com os menores valores de  $CC_{50}$  para cada série, sendo o composto PM06 o que apresentou a menor  $CC_{50}$  entre todos os compostos. Muitas das moléculas avaliadas induziram necrose e/ou apoptose nas linhagens tumorais utilizadas, tendo a série AT induzido apoptose e necrose e a série PM induzido apoptose (PM05) ou necrose (PM01) na linhagem HT-29. Já sobre a linhagem Jurkat a série AT e os compostos PA04 e EP2 induziram fortemente a necrose. Com relação à produção de citocinas alguns compostos induziram diminuição da produção de IL-10, aumento na produção de IL-12 e interferiram de diversas maneiras na produção de TNF. A atividade citotóxica sobre linhagens tumorais, com a indução de morte celular por necrose/apoptose, a influência sobre a produção de citocinas importantes no câncer por macrófagos, associados a uma baixa toxicidade para células saudáveis, tornam alguns dos compostos avaliados bons protótipos para testes *in vivo*, onde suas atividades poderão ser corroboradas.

**Palavras-chave:** Quimioterapia. Câncer. Compostos sintéticos.

## ABSTRACT

Cancer remains a major cause of death worldwide, and was the cause of 8.2 million deaths in 2012. The medicinal chemistry has contributed for the discovery of the first drugs developed for cancer, and continues a current approach for developing of new alternatives and potential antitumor drug candidates. The development of small molecules with biological activity is important because it provides new alternatives for the treatment of cancer. In this study, we evaluated four series of compounds, containing the phthalimide, hydrazone and thiazole groups; coded as AT, EP, PM and PA/PT, aiming to assess their cytotoxic, antitumor and immunomodulatory activities. An initial screening was performed with murine splenocytes, evaluating the effect of compounds on cell proliferation using tritiated thymidine. We also assessed the cytotoxic effect on J774A.1 macrophage lineage and anticancer activity on the HT-29, B16F10, K562 and Jurkat lineages, using MTT assay. The induction of apoptosis/necrosis after incubation with the compounds was evaluated with the HT-29 and Jurkat cell lines by flow cytometry. The effect of incubation with compounds in the production of the cytokines TNF, IL-10 and IL-12 was investigated by ELISA using J774A.1 macrophage lineage culture supernatants. The results demonstrated that the molecules tested showed varying behavior according to the class and substituents. Regarding the activity on splenocytes, compounds showed, in general, low effect on the proliferation of these cells. Differences were observed in  $CC_{50}$  values on the J774 A.1 macrophage lineage. On the tumor cell line HT-29, the compounds PM, EP2, PT01.14 and AT9 showed higher cytotoxic effect, with lower  $CC_{50}$  values, and PM was the most effective. About the B16F10 lineage the more effective compounds, with lower  $CC_{50}$  values were: EP3, PA04, AT2 and PM08. With Jurkat cell line, compounds PT01.6, PM08, EP1 and AT1 showed the lowest  $CC_{50}$  values, and the compound PT01.6 was the most effective. Assays with K562 cells revealed that the compounds PM06, EP3, PT01.9 and AT6 had the lowest  $CC_{50}$  values for each series, and the compound PM06 had the lowest  $CC_{50}$  among all compounds. Many of the molecules evaluated induced necrosis and/or apoptosis within the evaluated tumor cell lines, with AT series inducing apoptosis and necrosis and PM series inducing apoptosis (PM05) or necrosis (PM01) in the HT-29 lineage. On the Jurkat cell line, the compounds of the AT series and the compounds PA04 and EP2 strongly induced necrosis. With respect to cytokine production, some compounds induced a decrease in IL-10 production, increased production of IL-12 and interfered in several ways on the production of TNF. The cytotoxic activity on tumor cell lines, with the induction of cell death by necrosis/apoptose, the influence on important cytokine production by macrophages, associated with a low toxicity to healthy cells make some of the compounds evaluated good prototypes to *in vivo* assays, where their activities can be corroborated.

**Keywords:** Chemotherapy. Cancer. Synthetic compounds.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 - As características ou marcos ( <i>Hallmarks</i> ) do câncer. Esta ilustração engloba as seis capacidades característica do câncer. ....  | 18 |
| Figura 2- Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens e mulheres estimadas para os anos 2012/2013, segundo a Unidade da Federação para todas as neoplasias. .... | 19 |
| Figura 3 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, exceto pele não melanoma. ....   | 20 |
| Figura 4 - Tumores como tecidos complexos. A– Visão reducionista. B–Concepção atual, considerando tanto as células tumorais como seu microambiente.....                                       | 21 |
| Figura 6–Dot-plots obtidos do controle e após incubação com saponina e cisplatina, com a linhagem HT-29, após incubação por 72h. ....   | 39 |
| Figura 7- Dot-plots obtidos após incubação com os compostos AT1, AT2, AT3 e AT4, com a linhagem HT-29, após incubação por 72h.....  | 40 |
| Figura 8- Dot-plots obtidos após incubação com os compostos AT6 e AT9, com a linhagem HT-29, após incubação por 72h.....  | 40 |
| Figura 9- Dot-plots obtidos após incubação com compostos PM, PM01, PM02 e PM03, com a linhagem HT-29, após incubação por 72h.....   | 41 |
| Figura 10- Dot-plots obtidos após incubação com os compostos PM04 e PM05, com a linhagem HT-29, após incubação por 72h.....   | 42 |
| Figura 11- Porcentagem de células da linhagem HT-29 com marcação para necrose e apoptose após incubação por 72 horas com compostos da série AT, saponina e cisplatina. ....                   | 42 |
| Figura 12- Porcentagem de células da linhagem HT-29 com marcação para necrose e apoptose após incubação por 72 horas com compostos da série PM.....   | 43 |
| Figura 13- Dot-plots obtidos do controle e após incubação com cisplatina, com a linhagem Jurkat, após incubação por 72h. ....   | 44 |
| Figura 14- Dot-plots obtidos após incubação com os compostos PA04, EP2, PM02 e PM04, com a linhagem Jurkat, após incubação por 72h. ....  | 45 |
| Figura 15- Dot-plots obtidos após incubação com os compostos AT1, AT2, AT3, AT4 e AT6, com a linhagem Jurkat, após incubação por 72h.....   | 46 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 16- Porcentagem de células da linhagem Jurkat com marcação para necrose e apoptose após incubação com compostos da série PA/PT e EP. .... | 47 |
| Figura 17- Porcentagem de células da linhagem Jurkat com marcação para necrose e apoptose após incubação com compostos da série AT e PM. ....    | 47 |
| Figura 18- Produção de TNF, após 48 horas de incubação, nos controles.....   | 48 |
| Figura 19- Produção de TNF, após 48 horas de incubação, no grupo tratado com os compostos da série PA/PT. ....                                   | 49 |
| Figura 20- Produção de TNF, após 48 horas de incubação, no grupo tratado com os compostos da série AT.....                                       | 49 |
| Figura 21- Produção de TNF, após 48 horas de incubação, no grupo tratado com os compostos da série EP.....                                       | 50 |
| Figura 22- Produção de TNF, após 48 horas de incubação, no grupo tratado com os compostos da série PM. ....                                      | 50 |
| Figura 23- Produção de TNF, após 72 horas de incubação, nos controles.....   | 51 |
| Figura 24- Produção de TNF, após 72 horas de incubação, no grupo tratado com os compostos da série PA/PT. ....                                   | 51 |
| Figura 25- Produção de TNF, após 72 horas de incubação, no grupo tratado com os compostos da série AT.....                                       | 52 |
| Figura 26- Produção de TNF, após 72 horas de incubação, no grupo tratado com os compostos da série EP.....                                       | 52 |
| Figura 27- Produção de TNF, após 72 horas de incubação, no grupo tratado com os compostos da série PM. ....                                      | 53 |
| Figura 28- Produção de IL-10, após 24 horas de incubação, nos controles.....   | 54 |
| Figura 29- Produção de IL-10, após 24 horas de incubação, no grupo tratado com os compostos da série PA/PT. ....                                 | 54 |
| Figura 30- Produção de IL-10, após 24 horas de incubação, no grupo tratado com os compostos da série AT.....                                     | 55 |
| Figura 31- Produção de IL-10, após 24 horas de incubação, no grupo tratado com os compostos da série PM. ....                                    | 55 |
| Figura 32- Produção de IL-10, após 48 horas de incubação, nos controles.....   | 56 |
| Figura 33- Produção de IL-10, após 48 horas de incubação, para compostos de todas as séries testadas.....  | 57 |
| Figura 34- Produção de IL-12, após 24 horas de incubação.....  | 58 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 35- Produção de IL-12, após 48 horas de incubação, no grupo tratado com os compostos da série PA/PT. .... | 59 |
| Figura 36- Produção de IL-12, após 48 horas de incubação, no grupo tratado com os compostos da série EP. ....    | 59 |
| Figura 37- Produção de IL-12, após 72 horas de incubação, no grupo tratado com os compostos da série PA/PT. .... | 60 |
| Figura 38- Produção de IL-12, após 72 horas de incubação, no grupo tratado com os compostos da série AT. ....    | 61 |
| Figura 39- Produção de IL-12, após 72 horas de incubação, no grupo tratado com os compostos da série PM. ....    | 61 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1- Composto das séries PA/PT e EP e seus respectivos pesos moleculares (g/mol). .....   | 28 |
| Tabela 2- Compostos das séries PM e AT e seus respectivos pesos moleculares (g/mol). .....   | 29 |
| Tabela 3 - Valores de $CC_{50}$ , em $\mu\text{M}$ , para todas as séries testadas com esplenócitos, macrófagos e linhagens tumorais. .... | 36 |
| Tabela 4 - Compostos e respectivas concentrações utilizadas nos ensaios de Anexina V-FITC/PI, para a linhagem HT-29. ....                  | 38 |
| Tabela 5 - Compostos e respectivas concentrações utilizadas nos ensaios de Anexina V-FITC/PI, para a linhagem Jurkat. ....                 | 43 |

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

|                  |   |
|------------------|---|
| ABNT             | Associação Brasileira de Normas Técnicas                                  |
| CC <sub>50</sub> | Concentração citotóxica para 50% da população celular                     |
| CNPq             | Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico             |
| DMEM             | Meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco                           |
| EGFR             | Receptor do fator de crescimento epidérmico                               |
| ELISA            | Ensaio Imunoenzimático (enzyme-linked immunosorbent assay)                |
| FasL             | Fas Ligante   |
| FIOCRUZ          | Fundação Oswaldo Cruz   |
| FITC             | Isotiocianato de fluoresceína   |
| IL               | Interleucina  |
| INCA             | Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva                  |
| LPS              | Lipopolissacarídeo  |
| MHC              | Complexo maior de histocompatibilidade (Major Histocompatibility Complex) |
| NK               | Células matadoras naturais (Natural Killer)                               |
| NO               | xido Ntrico, do inglês Nitric Oxid                                      |
| OMS              | Organização Mundial da Saúde  |
| OMS              | Organização Mundial da Saúde  |
| PI               | Iodeto de propdeo  |
| PPGIT            | Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica                         |
| SBF              | Soro Bovino Fetal   |
| TAM              | Macrófago associado ao tumor (Tumor-associated Macrophage)                |
| TNF              | Fator de necrose tumoral  |
| TRAIL            | Ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral       |
| UFPE             | Universidade Federal de Pernambuco  |
| VEGF             | Fator de crescimento vascular endotelial                                  |

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | 14 |
| <b>2 OBJETIVOS</b> .....  | 16 |
| 2.1 Objetivo geral.....   | 16 |
| 2.2 Objetivos específicos .....   | 16 |
| <b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....  | 17 |
| 3.1 Patologia alvo – Câncer.....  | 17 |
| 3.2 Epidemiologia .....   | 18 |
| 3.3 Microambiente tumoral e imunobiologia .....                                 | 20 |
| 3.4 Tratamento .....  | 23 |
| 3.5 Potenciais candidatos: Tiazóis, Ftalimidas e Hidrazonas .....               | 26 |
| <b>4 METODOLOGIA</b> .....  | 28 |
| 4.1 Compostos Sintéticos .....  | 28 |
| 4.2 Linhagens Celulares .....   | 29 |
| 4.2.1 <i>Jurkat</i> .....   | 30 |
| 4.2.2 <i>HT-29</i> .....  | 30 |
| 4.2.3 <i>K562</i> .....   | 30 |
| 4.2.4 <i>B16F10</i> .....   | 30 |
| 4.2.5 <i>J774A.1</i> .....  | 30 |
| 4.3 Obtenção de células esplênicas de camundongos BALB/c .....                  | 31 |
| 4.4 Avaliação da proliferação celular por timidina tritiada .....               | 31 |
| 4.5 Avaliação da citotoxicidade e atividade anticâncer pelo ensaio de MTT ..... | 32 |
| 4.6 Ensaio de citometria com Anexina V-FITC e PI .....                          | 32 |
| 4.7 Dosagem de citocinas no sobrenadante de células.....                        | 33 |
| <b>5 RESULTADOS</b> .....   | 35 |
| 5.1 Avaliação da proliferação celular por timidina tritiada.....                | 35 |
| 5.2 Avaliação da citotoxicidade em linhagem de macrófagos.....                  | 35 |

|  |            |
|--|------------|
| 5.3 Avaliação da atividade anticâncer pelo ensaio de MTT ..... | 37         |
| 5.4 Ensaio de citometria com Anexina V-FITC e PI .....         | 37         |
| 5.4.1 HT-29 .....  | 37         |
| 5.4.2 Jurkat .....   | 43         |
| 5.5 Dosagem de citocinas em sobrenadante de cultura .....      | 48         |
| 5.5.1 TNF .....  | 48         |
| 5.5.2 IL-10 .....  | 53         |
| 5.5.3 IL-12 .....  | 57         |
| <b>6 DISCUSSÃO .....</b>                                       | <b>62</b>  |
| <b>7 CONCLUSÕES .....</b>                                      | <b>72</b>  |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                       | <b>73</b>  |
| <b>ANEXO 1 .....</b>   | <b>79</b>  |
| <b>APÊNDICE A .....</b>  | <b>102</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer continua sendo uma das principais causas de morte em todo o mundo, tendo sido a causa de 8,2 milhões de mortes em 2012 (Ferlay *et al.*, 2013). Essa patologia surge de um processo mutagênico que ocorre em múltiplas etapas, no qual as células cancerosas adquirem um conjunto comum de propriedades incluindo potencial de proliferação ilimitado, auto-suficiência em sinais de crescimento, e resistência a sinais anti-proliferativos e de apoptose (LUO *et al.*, 2009).

Particularmente no Brasil, o câncer tem contribuído para um fenômeno denominado transição epidemiológica ou mudança do perfil epidemiológico. As estimativas para o ano de 2013 apontaram para a ocorrência de aproximadamente 518.510 novos casos de câncer no Brasil, havendo uma divergência nas incidências de casos de câncer entre as diferentes regiões demográficas. Entre os tipos mais incidentes estão os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, mama, colo do útero, cólon e reto, estômago e glândula tireoide. Mesmo com grandes esforços por parte de órgãos públicos e privados, o caráter generalizado, severo e muitas vezes letal do câncer persiste, com apenas melhorias elementares no tratamento (KAMB *et al.*, 2007).

A química medicinal contribuiu na descoberta dos primeiros medicamentos desenvolvidos para o câncer, e continua uma abordagem atual no desenvolvimento de novas alternativas e potenciais candidatos a fármacos antitumorais. Dentro dessa perspectiva, diversos grupamentos químicos chamam a atenção pelo amplo espectro de atividades biológicas associados, além da verificação de efeitos imunomodulatórios.

Diversos compostos contendo o grupamento ftalimídico tiveram suas atividades biológicas relatadas, tendo esse grupamento despertado o interesse como um potencial arquétipo para compostos biologicamente ativos. Os efeitos farmacológicos incluem a inibição de diversos micro-organismos, como bactérias e protozoários, além de ação antitumoral (Assis *et al.*, 2012; Pessoa *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2010a). Outro grupamento químico que tem demonstrado uma gama de efeitos farmacológicos benéficos é o das hidrazonas. As hidrazonas representam um grupamento versátil, que exhibe uma ampla variedade de efeitos biológicos (BALA *et al.*, 2013). Tiazóis são frequentemente encontrados em vários compostos com

potente atividade biológica, como sulfatiazol (antimicrobiano), Ritonavir (antiviral), além de ser um motivo estrutural comumente encontrado em agentes anticâncer, como bleomicina, tiazofurina e desatinib (KASHYAP et al.,2011; SCHADE et al., 2008; ZHENG et al., 2013).

Ftalimidas, hidrazonas e tiazóis são potenciais compostos base para a criação de novas moléculas biologicamente ativas, mesmo que suas atividades biológicas incluam efeitos favoráveis e desfavoráveis (HASHIMOTO, 2008). O desenvolvimento de pequenas moléculas com atividade biológica, além do aprimoramento de outros meios de tratamento, é importante, pois proporciona novas alternativas ao tratamento do câncer.

Neste trabalho, 31 compostos contendo em sua estrutura os grupamentos hidrazona, tiazol e/ou ftalimida, foram avaliados quanto a sua atividade citotóxica sobre células saudáveis (esplenócitos e macrófagos); quanto a sua ação anticancer sobre as células de linhagem HT-29, B16F10, Jurkat e K562; além de ter sido avaliada a indução de apoptose/necrose e a influência sobre a produção das citocinas TNF, IL-10 e IL-12, em sobrenadante de cultura de macrófagos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar *in vitro* a atividade citotóxica, anticâncer e imunomodulatória de compostos derivados de ftalimidas, hidrazonas e tiazóis.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade dos compostos na proliferação de esplenócitos murinos, determinando a concentração citotóxica para 50% das células (CC<sub>50</sub>);
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos sobre células macrofágicas da linhagem J774A.1, determinando a CC<sub>50</sub>;
- Avaliar a atividade anticâncer *in vitro* dos compostos sobre as linhagens HT-29, B16F10, Jurkat e K562, determinando a CC<sub>50</sub>;
- Investigar a indução de apoptose e necrose nas células das linhagens HT-29 e Jurkat, tratadas com os compostos;
- Avaliar a atividade dos compostos na produção das citocinas TNF, IL-10 e IL-12, em células J774A.1.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

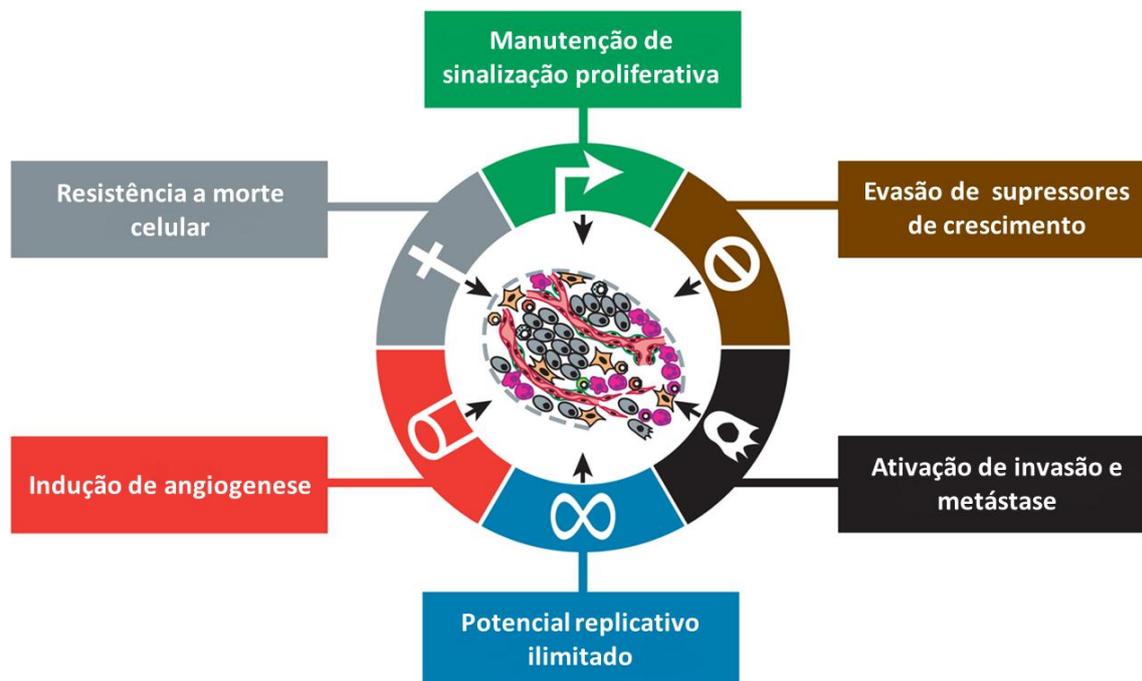
#### 3.1 Patologia alvo – Câncer

O termo “câncer” é uma expressão genérica para um amplo número de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo (OMS, 2013). O câncer surge de um processo mutagênico que ocorre em múltiplas etapas, no qual as células cancerosas adquirem um conjunto comum de propriedades incluindo potencial de proliferação ilimitado, auto-suficiência em sinais de crescimento, e resistência a sinais anti-proliferativos e de apoptose (LUO et al., 2009). Estas características são o resultado de alterações em oncogenes, genes supressores de tumor e genes estabilizadores do genoma (ZITVOGEL et al., 2008). Como resultado, podem ocorrer o crescimento desordenado e o espalhamento das células tumorais.

Hanahan e Weinberg (2000) descreveram em sua revisão seis capacidades características, ou marcos (Hallmarks) do câncer, que em conjunto constituem o alicerce lógico para o entendimento dessa patologia. Sugere-se, na verdade, que o amplo espectro de manifestações, bem como a variedade de genótipos encontrados nas células tumorais são a manifestação dessas seis alterações essenciais na fisiologia celular, que de maneira coletiva levam a um crescimento aberrante.

Mais recentemente, com o marcante progresso nas pesquisas envolvendo a biologia tumoral, esse conceito foi solidificado e estendido, tendo sido revisado em 2011 (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Os marcos do câncer incluem: 1) manutenção de sinalização proliferativa, 2) evasão de supressores de crescimento, 3) ativação de invasão e metástase, 4) potencial replicativo ilimitado, 5) indução de angiogênese e 6) resistência à morte celular (Figura 1). Adicionalmente, duas características cruciais que permitem a aquisição dos seis marcos iniciais foram descritas. São essas: Instabilidade genômica e mutação, e inflamação promotora de tumor. Outros marcos, ditos emergentes, também foram descritos, incluindo: reprogramação do metabolismo energético e evasão da destruição pelo sistema imune.

**Figura 1** - As características ou marcos (*Hallmarks*) do câncer. Esta ilustração engloba as seis capacidades característica do câncer.



Fonte: Adaptado de Hanahan; Weinberg, 2011.

As mutações na sequência de bases do DNA que levam ao surgimento de tumores podem ocorrer em células da linhagem germinativa ou em células somáticas. De fato, apenas uma minoria de todos os casos de câncer é causada por mutações na linhagem germinativa, enquanto a vasta maioria está ligada a mutações somáticas e fatores ambientais. Muitos fatores de risco e causas ambientais de câncer estão associados com alguma forma de inflamação crônica (GRIVENNIKOV et al., 2010).

### 3.2 Epidemiologia

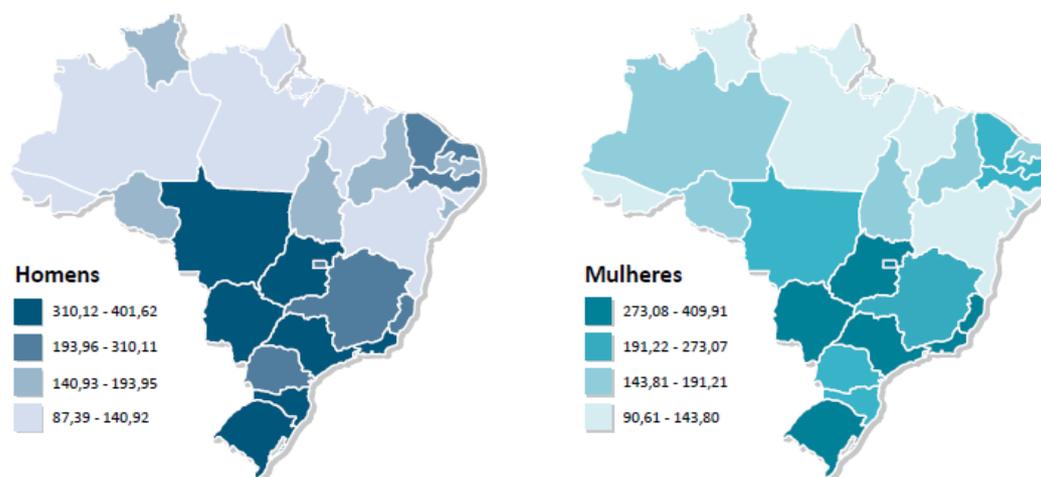
O câncer continua sendo uma das principais causas de morte em todo o mundo, tendo sido a causa de 8,2 milhões de mortes em 2012 (Ferlay *et al.*, 2013). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a projeção é de que as mortes por câncer em todo o mundo continuem a crescer, com uma estimativa de 13,1 milhões de mortes em 2030 (OMS, 2013).

Particularmente no Brasil, tem ocorrido nas últimas décadas um fenômeno chamado transição epidemiológica ou mudança do perfil epidemiológico. Esse

fenômeno ocorre devido a mudanças nas causas de mortalidade e morbidade, juntamente com outras transformações demográficas, sociais e econômicas. O câncer está entre as doenças não transmissíveis responsáveis por esse fenômeno. Vários fatores estão envolvidos nessa mudança, como: maior exposição a agentes cancerígenos, o prolongamento da expectativa de vida e o envelhecimento populacional, o aprimoramento dos métodos diagnósticos e a melhoria da qualidade e do registro da informação (INCA, 2012).

Por se tratar de um país com dimensões continentais, o Brasil apresenta diferenças regionais marcantes quanto à incidência de casos de câncer (Figura 2). Essas diferenças são o reflexo dos variados aspectos sociais, culturais e econômicos de cada região (INCA, 2011).

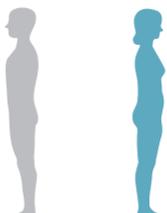
**Figura 2-** Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens e mulheres estimadas para os anos 2012/2013, segundo a Unidade da Federação para todas as neoplasias.



Fonte: INCA, 2011.

As estimativas para o Brasil para o ano de 2012, válidas também para o ano de 2013, apontam para a ocorrência de aproximadamente 518.510 novos casos de câncer. Os tipos mais incidentes são os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon e reto, e estômago para o sexo masculino; e os cânceres de pele não melanoma, mama, colo do útero, cólon e reto e glândula tireoide para o sexo feminino (Figura 3) (INCA, 2011).

**Figura 3** - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para

| Localização primária        | casos novos | percentual |  |                 | Localização primária        | casos novos | percentual |
|-----------------------------|-------------|------------|--|-----------------|-----------------------------|-------------|------------|
| Próstata                    | 60.180      | 30,8%      | <b>Homens</b><br> | <b>Mulheres</b> | Mama Feminina               | 52.680      | 27,9%      |
| Traqueia, Brônquio e Pulmão | 17.210      | 8,8%       |  |                 | Colo do Útero               | 17.540      | 9,3%       |
| Cólon e Reto                | 14.180      | 7,3%       |  |                 | Cólon e Reto                | 15.960      | 8,4%       |
| Estômago                    | 12.670      | 6,5%       |  |                 | Glândula Tireoide           | 10.590      | 5,6%       |
| Cavidade Oral               | 9.990       | 5,1%       |  |                 | Traqueia, Brônquio e Pulmão | 10.110      | 5,3%       |
| Esôfago                     | 7.770       | 4,0%       |  |                 | Estômago                    | 7.420       | 3,9%       |
| Bexiga                      | 6.210       | 3,2%       |  |                 | Ovário                      | 6.190       | 3,3%       |
| Laringe                     | 6.110       | 3,1%       |  |                 | Corpo do Útero              | 4.520       | 2,4%       |
| Linfoma não Hodgkin         | 5.190       | 2,7%       |  |                 | Linfoma não Hodgkin         | 4.450       | 2,4%       |
| Sistema Nervoso Central     | 4.820       | 2,5%       |  |                 | Sistema Nervoso Central     | 4.450       | 2,4%       |

2012 por sexo, exceto pele não melanoma.

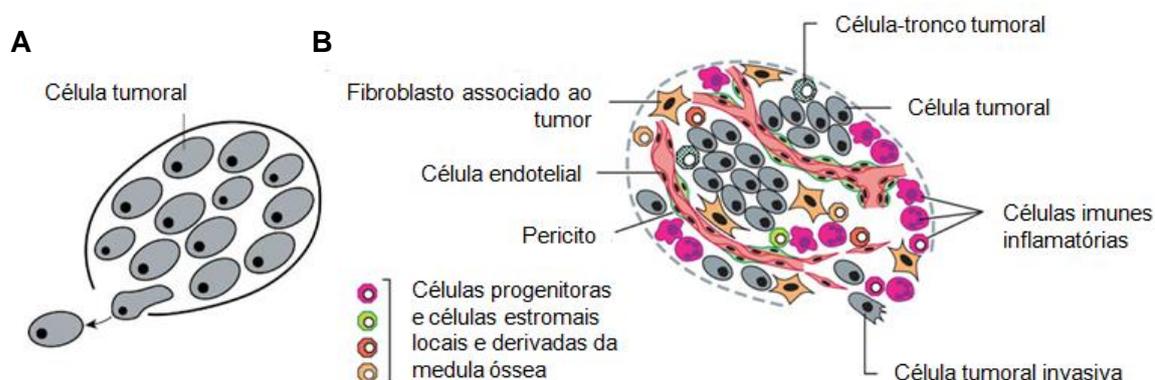
Fonte: INCA, 2011. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2012>.

Nota: Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

### 3.3 Microambiente tumoral e imunobiologia

O campo de pesquisa em câncer foi largamente guiado por um foco reducionista nas células cancerosas e nos seus genes. A visão mais atual, entretanto, aborda os tumores como tecidos complexos, no qual células tumorais recrutam e subvertem tipos celulares normais, que servem como colaboradores na pauta neoplásica. Sabe-se, atualmente, que as características fenotípicas do câncer não dependem unicamente das células tumorais. A importância do microambiente tumoral, cada vez mais aceita, é fundamentada no conceito de que o câncer não é resultado da manifestação unicamente das células tumorais, como observado numa visão reducionista (Figura 4) (HANAHAN; COUSSENS, 2012). O microambiente em que tais células estão presentes, incluindo os sinais regulatórios e as demais células recrutadas, apresenta um papel fundamental no desenvolvimento da doença (SWARTZ et al., 2012). De fato, células inflamatórias e mediadores estão presentes no microambiente da maioria, se não de todos os tumores, independente da causa (GERMANO et al, 2008; SWARTZ et al., 2012).

**Figura 4** - Tumores como tecidos complexos. A– Visão reducionista. B–Concepção atual, considerando tanto as células tumorais como seu microambiente.



Fonte: Adaptado de Hanahan; Weinberg, 2000, 2011.

O microambiente tumoral pode apresentar células do sistema imune inato, incluindo macrófagos, neutrófilos, mastócitos, células supressoras de origem mieloide (*Myeloid derived suppressor cells*), células dendríticas e células Natural Killer (NK); e células do sistema imune adaptativo (linfócitos T e B) além das células tumorais e seu estroma circundante (que consiste em fibroblastos, células endoteliais, pericitos e células mesenquimais) (GRIVENNIKOV et al., 2010; HANAHAN; WEINBERG, 2011). A intercomunicação entre as células neoplásicas e células recrutadas apresenta profundos efeitos na progressão tumoral (SICA et al., 2008).

Dentre as moléculas sinalizadoras, as citocinas apresentam um papel fundamental na patogênese do câncer. Citocinas são mensageiros moleculares que permitem que células do sistema imune se comuniquem entre si, a fim de gerar uma resposta coordenada, robusta, mas autolimitada a um antígeno alvo (LEE; MARGOLIN, 2011). De modo geral, a produção de citocinas por células imunes e inflamatórias pode constituir um importante mecanismo promotor do tumor. Esse mecanismo confere às células tumorais um suprimento contínuo de sinais de sobrevivência e crescimento, em um microambiente inicialmente hostil (GRIVENNIKOV et al., 2010). As alterações celulares que dão origem ao câncer provocam mudanças na expressão local de citocinas (DRANOFF, 2004).

O perfil de expressão de citocinas e quimiocinas no microambiente tumoral pode ser mais relevante do que seu conteúdo específico de células imunes. Através da ativação de diferentes efetores intracelulares, citocinas podem controlar o meio

imunológico e inflamatório tanto a favor de uma imunidade anticâncer (IL-12, TRAIL, IFN- $\gamma$ ) como aumentar a progressão do tumor (IL-6, IL-17, IL-23) e também tem efeitos diretos no crescimento e sobrevivência das células cancerosas (TRAIL, FasL, TNF, ligantes de EGFR, TGF- $\beta$ , IL-6) (GRIVENNIKOV et al., 2010). Subpopulações distintas de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (por exemplo, células T auxiliar Th1 ou Th2) secretam um repertório peculiar de citocinas que medeiam suas respostas. Estudos demonstram que citocinas associadas ao padrão Th1 e Th2 atuam antagonicamente em diferentes microambientes tumorais e, em geral, um perfil de citocinas direcionado para uma resposta Th2 se correlaciona com acentuada promoção e progressão do tumor (TAN; COUSSENS, 2007).

O infiltrado leucocítico presente no microambiente tumoral é principalmente composto por macrófagos associados ao tumor (TAM, do inglês tumor-associated macrophages). Os macrófagos são considerados um paradigma na inflamação associada ao tumor, por apresentarem potencial para expressar atividade pro e anti-tumoral (GRIVENNIKOV et al., 2010; MANTOVANI; SICA, 2010). Os fagócitos mononucleares são células que apresentam acentuada plasticidade. Em resposta a diversos sinais, os macrófagos podem ser ativados de maneira polarizada. Essa ativação pode ser dividida esquematicamente em duas classes, M1 e M2, em analogia a dicotomia Th1/Th2 (MURRAY; WYNN, 2011; SOLINAS et al., 2009). Ao contrário dos perfis Th1/Th2, entretanto, macrófagos M1/M2 são maleáveis e a polarização é determinada pelo perfil de expressão gênica, e não por vias de diferenciação determinadas (GRIVENNIKOV et al., 2010).

Macrófagos classicamente ativados (M1) são originados após estímulo com IFN- $\gamma$  ou estímulo microbiano como LPS, e são caracterizados pela alta produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1, IL-6, IL-12 e IL-23), moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC), e óxido nítrico sintase induzível, e são capazes de matar patógenos e iniciar respostas imunes antitumorais (GRIVENNIKOV et al., 2010; MANTOVANI; SICA, 2010; MURRAY; WYNN, 2011). Em contraste, macrófagos M2 ou “alternativamente ativados”, que podem ser induzidos *in vitro* por IL-4, IL-10 e IL-13, regulam negativamente a expressão de moléculas do MHC de classe II e IL-12, além de mostrar expressão aumentada da citocina anti-inflamatória IL-10, do receptor “scavenger” A, e de arginase (GRIVENNIKOV et al., 2010; MANTOVANI; SICA, 2010; SOLINAS et al., 2009).

Na maioria, mas não em todos os tumores, TAMs apresentam um fenótipo semelhante a M2. As atividades pro-tumorais dos TAMs incluem vários aspectos cruciais para a progressão tumoral. Muitos produtos liberados pelo macrófago no estroma tumoral podem estimular diretamente o crescimento das células tumorais e/ou promover a migração e metástase. Estes produtos incluem o fator de crescimento epidermal (EGF, do inglês epidermal growth factor), TGF- $\beta$ , VEGF, quimiocinas e citocinas. Além disso, os macrófagos podem contribuir para a progressão tumoral pela estimulação da neo-angiogenese e pela dissolução e remodelamento da matriz intersticial. Também podem produzir enzimas e inibidores que regulam a digestão da matriz extracelular, favorecendo assim a invasão tumoral. A supressão da resposta imune adaptativa, através de mecanismos que incluem baixa apresentação antigênica e inibição da proliferação de células T, observada nos macrófagos M2, também é observada em TAMs. Parte da atividade imunossupressora é exercida indiretamente pela liberação de quimiocinas (CCL17, CCL18 e CCL22) que atraem preferencialmente subpopulações de células T desprovidas de função citotóxica. (GRIVENNIKOV et al., 2010; SICA, 2008; SOLINAS et al., 2009).

O microambiente tumoral geralmente é caracterizado por uma alta concentração das citocinas imunossupressoras IL-10 e TGF- $\beta$  e em neoplasias avançadas, usualmente, há baixos níveis de IL-12 e ativação defeituosa da imunidade Th1 convencional (GERMANO et al., 2008).

O estudo da resposta imune gerada após esses tratamentos constitui uma importante abordagem uma vez que o tratamento com compostos anticâncer pode funcionar como um adjuvante a imunidade anticâncer (LESTERHUIS; HAANEN; PUNT, 2011; MÉNARD *et al.*, 2008)

### 3.4 Tratamento

Mesmo com grandes esforços por parte de órgãos públicos e privados, e a despeito de bilhões de dólares de investimentos, o caráter generalizado, severo e muitas vezes letal do câncer tem persistido (KAMB et al., 2007).

O tratamento com drogas anticâncer é comumente categorizado em quatro diferentes classes: quimioterapia, terapia hormonal, terapia alvo-específica, e imunoterapia (LESTERHUIS et al., 2011).

A primeira geração de drogas anticâncer eficazes foi a dos quimioterápicos. Essa classe envolve drogas citotóxicas e constitui, juntamente com o uso de agentes hormonais, a base da maioria dos esquemas de tratamento de rotina (DRANITSARIS et al., 2011; HAMBLEY, 2009; WORKMAN, 2005). A morte celular tumoral induzida pela quimioterapia ocorre frequentemente, mas não exclusivamente, por meio de apoptose, uma modalidade supostamente não imunogênica ou tolerogênica (ZITVOGEL et al., 2008). Nos vertebrados, a apoptose pode ser desencadeada tanto com o engajamento de “receptores de morte” da família do receptor do fator de necrose tumoral na superfície celular. Também pode haver ativação por diversos sinais intracelulares que atuam sobre a família de proteínas Bcl-2, que controla a integridade da membrana externa mitocondrial através de interações complexas entre os membros desta família. Ambas as vias levam a destruição celular por proteases específicas chamadas caspases (STRASSER et al., 2011). Outro importante fator envolvido na apoptose é a proteína p53, que atua como um fator de transcrição, controlando a expressão de membros da família Bcl-2, além de outras proteínas reguladoras do apoptose (COTTER, 2009). Outros tipos de morte celular induzida por drogas também podem ocorrer, como necrose e autofagia (ZITVOGEL et al., 2008).

A necrose é sempre um tipo de morte celular inflamatória, em contraste com apoptose e autofagia, nos quais o balanço entre sinais pro e anti-inflamatórios determina o efeito imunológico (AMARAVADI; THOMPSON, 2007). No contexto da terapia anticâncer em tumores estabelecidos, sinais de dano associados à necrose podem ser capazes de iniciar uma resposta imune anticâncer, muito embora alguns autores têm sugerido que a inflamação promovida pela necrose de células tumorais possa acelerar a tumorigênese (AMARAVADI; THOMPSON, 2007).

Várias evidências demonstram que as inter-relações entre diversas vias de transdução de sinal e vias de receptores endócrinos são importantes para o crescimento e desenvolvimento tumoral (PRITCHARD, 2013). Dessa forma, abordagens envolvendo o uso de hormônios podem apresentar grande potencial terapêutico. De fato, a terapia hormonal tem sido utilizada com sucesso para certos tipos de câncer, como o câncer de mama (PRITCHARD, 2013).

Até a década de 1990, o desenvolvimento de drogas anticâncer foi largamente baseado no teste de compostos derivados de uma variedade de fontes, incluindo análogos de substratos, produtos naturais e síntese combinatória,

tipicamente usando ensaios de citotoxicidade *in vitro* seguidos de avaliação de toxicidade e eficácia *in vivo* (HAMBLEY, 2009).

Durante os últimos dez anos houve avanços importantes na terapêutica, sendo caracterizada pela utilização de agentes antitumorais projetados para interferir com um alvo molecular específico, tipicamente uma proteína, que se acredita ter um papel crítico no crescimento ou progressão tumoral (DRANITSARIS et al., 2011; SAWYERS, 2004). O direcionamento molecular no tratamento do câncer é baseado na premissa de que as bases moleculares do câncer são associadas a uma ou mais anormalidades que dão origem a produção aumentada ou ativação de algumas moléculas e/ou produção diminuída ou inativação de outras (COLLINS; WORKMAN, 2006; WORKMAN, 2005). Tem sido relatado algum sucesso na utilização desta estratégia, mas os casos são de pequeno número e também apresentam limitações significantes, tais como o rápido surgimento de resistência ao tratamento (HAMBLEY, 2009). Além disso, o custo de todas essas novas terapias alvo-específicas tem sido fixado a níveis que são várias vezes maiores do que quimioterapia tradicional (DRANITSARIS et al., 2011).

A imunoterapia já está estabelecida como um componente importante no esquema de tratamento de alguns tipos de câncer. Entre os tipos de imunoterapia estão a imunização parcial com anticorpos monoclonais, a introdução de adjuvantes no microambiente tumoral e a distribuição sistemática de citocinas (DOUGAN; DRANOFF, 2009; LESTERHUIS; HAANEN; PUNT, 2011).

A vacinação e o tratamento contra infecções por patógenos promotores do câncer podem atuar como uma profilaxia, tendo como exemplo a vacina contra o Vírus da Hepatite B (HBV) que foi a primeira a ser disponibilizada, oferecendo proteção contra uma infecção com potencial oncogênico conhecido. Uma vacina contra os sorotipos 16 e 18 do Papiloma Vírus Humano (HPV) foi desenvolvida especificamente para prevenir o câncer cervical (DOUGAN; DRANOFF, 2009). A vacinação contra o câncer representa uma abordagem alternativa ao uso das demais terapêuticas (REICHERT; WENGER, 2008).

A geração de uma imunidade anticâncer potente, específica e duradoura também requer uma variedade de citocinas, que regulam importantes funções relacionadas ao balanço entre a rejeição do tumor por células efetoras antígeno-específicas e mecanismos de supressão que permitem que o tumor escape da detecção pelo sistema imunológico (LEE; MARGOLIN, 2011). Estas citocinas são

produzidas tanto por células tumorais, como por células ativadas do estroma e células do sistema imune inato e adaptativo, em resposta a uma diversa gama de estresses celulares, incluindo danos induzidos por carcinógenos, infecção e inflamação (DRANOFF, 2004). Sendo assim, o uso de estratégias para modular o microambiente tumoral no hospedeiro constitui uma abordagem adicional interessante (GERMANO et al., 2008).

A complexidade das alterações presentes no câncer constitui uma grande barreira com relação ao tratamento. As células tumorais apresentam extensivas rotas de crescimento e sobrevivência, muitas vezes interligadas e redundantes, que fundamentam seu fenótipo (LUO et al., 2009). Desta forma, uma abordagem fundamental para uma terapia de sucesso é a identificação de pontos funcionais críticos na rede oncogênica, cuja inibição resultaria numa falha do sistema. Ou seja, na cessação do estado tumorigênico por apoptose, necrose, senescência ou diferenciação celular (LUO et al., 2009).

### 3.5 Potenciais candidatos: Tiazóis, Ftalimidas e Hidrazonas

Moléculas com amplo espectro de atividades biológicas são potenciais compostos base para a criação de novas moléculas biologicamente ativas, mesmo que suas atividades biológicas incluam efeitos favoráveis e desfavoráveis (HASHIMOTO, 2008).

Um bom exemplo desse tipo de molécula é a talidomida. A talidomida consiste em uma bisimida, contendo um anel ftalimídico ligado à subunidade glutarimídica quiral. Apesar de seu severo efeito teratogênico, descoberto acidentalmente, sua utilidade no tratamento da hanseníase e no mieloma múltiplo foi estabelecida (MELCHERT; LIST, 2007). Outros efeitos farmacológicos foram amplamente investigados, como atividade anti-inflamatória, antitumoral, antiangiogênica e antiviral (HASHIMOTO, 2008; SOUZA *et al.*, 2012). Dessa maneira, a talidomida é uma droga com diversos alvos, sendo assim um possível modelo útil no desenvolvimento de vários tipos de medicamentos (HASHIMOTO, 2008).

Diversos compostos contendo o grupamento ftalimídico tiveram suas atividades biológicas relatadas, tendo esse grupamento despertado o interesse como um potencial arquétipo para compostos biologicamente ativos. Os efeitos

farmacológicos desses compostos incluem a inibição de diversos microorganismos, como bactérias e protozoários, além de ação antitumoral. A atividade de inibição da produção de TNF apresentada por várias ftalimidas, por exemplo, demonstrou-se bastante efetiva no tratamento de várias condições imuno-inflamatórias (PESSOA *et al.*, 2010; SHARMA *et al.*, 2010b). Esses achados com relação às ftalimidas proveem uma plataforma para o desenvolvimento de novos agentes farmacológicos (SHARMA *et al.*, 2010).

Os tiazóis são compostos orgânicos heterocíclicos apresentando um anel de cinco membros que contém três carbonos, um átomo de enxofre e um átomo de nitrogênio (KASHYAP *et al.*, 2011). Tiazóis são frequentemente encontrados em vários compostos com potente atividade biológica, como sulfatiazol (antimicrobiano), Ritonavir (antiviral), além de ser um motivo estrutural comumente encontrado em agentes anticâncer, como bleomicina e tiazofurina (antitumorais) (KASHYAP *et al.*, 2011; ZHENG *et al.*, 2013). Tem sido reportado que esses derivados tiazólicos podem promover inibição do crescimento e proliferação de células tumorais (GHORAB; AL-SAID, 2012; LIMA LEITE *et al.*, 2006) e efeitos na vascularização, através de uma variedade de mecanismos e alvos terapêuticos (GHORAB; AL-SAID, 2012; KASHYAP *et al.*, 2011; ZHENG *et al.*, 2013). Uma molécula já usada na clínica, chamada Dasatinib, inibidor da proteína BCR/ABL na leucemia mieloide crônica, apresenta o motivo tiazol em sua estrutura (SCHADE *et al.*, 2008; ZHENG *et al.*, 2013).

Outro grupamento químico que tem demonstrado uma gama de efeitos farmacológicos benéficos é o das hidrazonas. As hidrazonas representam um grupamento versátil, que exhibe uma ampla variedade de efeitos biológicos (BALA *et al.*, 2013). As hidrazonas apresentam um importante papel na química inorgânica, por formarem facilmente complexos estáveis com a maioria dos íons de metais de transição (SUVARAPU *et al.*, 2012). O interesse por esses complexos tem aumentado, uma vez que foi reconhecido que esses complexos podem servir como modelo para derivados com importância biológica. Entre os efeitos estão a atividade anticonvulsivante, antimicrobiana, antiinflamatória, analgésica e antitumoral (ROLLAS; KÜÇÜKGÜZEL, 2007). Esses achados têm guiado o desenvolvimento de hidrazonas, que podem ser o núcleo protótipo de novos derivados, visando compostos mais seguros e eficazes (BALA *et al.*, 2013).

O desenvolvimento de pequenas moléculas com atividade biológica, além do aprimoramento de outros meios de tratamento, é importante, pois proporciona novas alternativas ao tratamento do câncer.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Compostos Sintéticos

Os compostos avaliados no presente estudo foram obtidos através de colaboração com o Laboratório de Síntese de Fármacos (LABSINFA) do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Foi realizada a caracterização estrutural por análise espectroscópica na região do infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Os detalhes metodológicos da síntese e caracterização estrutural dos compostos estão apresentados no Anexo 1.

Foram testados 31 compostos, agrupados em diferentes séries, sendo elas: hidrazonas piridínicas, codificadas como EP, tiazóis acetilpiridínicos, codificados como AT, 3-Bromo-Fenil-propil-Hidrazona-Tiazóis, codificada como PA/PT e híbridos Ftalil-Hidrazona-Tiazol, codificados como PM. A tabela 1 relaciona os compostos pertencentes à série PA/PT e EP, e a tabela 2 relaciona os compostos das séries PM e AT, incluindo os respectivos valores de peso molecular.

**Tabela 1-** Composto das séries PA/PT e EP e seus respectivos pesos moleculares (g/mol).

| Série                                  | Composto               | PM (g/mol) |        |
|--|------------------------|------------|--------|
| 3-Bromo-Fenil-propil-Hidrazona-Tiazóis | PA04                   | 334,78     |        |
|  | PT01                   | 286,19     |        |
|  | PT01.2                 | 386,31     |        |
|  | PT01.3                 | 399,04     |        |
|  | PT01.4                 | 416,33     |        |
|  | PT01.5                 | 479,23     |        |
|  | PT01.6                 | 431,31     |        |
|  | PT01.7                 | 431,31     |        |
|  | PT01.8                 | 404,30     |        |
|  | PT01.9                 | 420,75     |        |
|  | PT01.13                | 455,20     |        |
|  | PT01.14                | 455,20     |        |
|  | Hidrazonas piridínicas | EP1        | 208,08 |
|  |                        | EP2        | 194,06 |
| EP3                                    |                        | 256,08     |        |

Fonte: Elaborado pelo autor.

**Tabela 2-** Compostos das séries PM e AT e seus respectivos pesos moleculares (g/mol).

| Série                     | Composto | PM (g/mol) |
|---------------------------|----------|------------|
| Ftalil-Hidrazona-Tiazol   | PM       | 338,38     |
|                           | PM01     | 438,50     |
|                           | PM02     | 452,13     |
|                           | PM03     | 468,53     |
|                           | PM04     | 483,50     |
|                           | PM05     | 483,50     |
|                           | PM06     | 472,95     |
|                           | PM07     | 517,40     |
|                           | PM08     | 456,49     |
|                           | PM10     | 507,39     |
| Tiazóis acetilpiridínicos | AT1      | 358,13     |
|                           | AT2      | 353,09     |
|                           | AT3      | 338,12     |
|                           | AT4      | 342,07     |
|                           | AT6      | 386,02     |
|                           | AT9      | 326,10     |

Fonte: Elaborado pelo autor.

Após seu recebimento, os compostos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) e estocados a -20°C. Para a realização dos ensaios, cada composto foi diluído na concentração requerida utilizando-se o meio de cultura apropriado para cada célula, contendo 10% de soro bovino fetal (SBF). A concentração final de DMSO foi de 1%.

#### 4.2 Linhagens Celulares

Foram utilizadas cinco linhagens de células, sendo Jurkat, HT-29, B16F10 e J774A.1 provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), e a linhagem K562 gentilmente cedida pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Teresinha Gonçalves da Silva, do Dept<sup>o</sup> de Antibióticos da UFPE. Todas as linhagens celulares foram conservadas em nitrogênio líquido, a -196 °C. Inicialmente, as células foram expandidas e cultivadas em garrafas de cultura contendo o meio de cultura apropriado para cada linhagem (DMEM, RPMI 1640), enriquecido com 10% de soro bovino fetal (SBF), e 1% de solução de antibióticos (estreptomicina – 100 µg/ml e penicilina – 100 U/ml).

#### 4.2.1 Jurkat

Esta linhagem é derivada de sangue periférico de um homem portador de leucemia aguda de células T (LLA). As células foram cultivadas em suspensão, em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal, em garrafas de cultura T25. A cultura foi mantida a 37 °C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 4.2.2 HT-29

HT-29 foi isolada de um adenocarcinoma colorretal. As células foram cultivadas e aderidas em garrafas T25 contendo meio DMEM, suplementado com 10% de soro bovino fetal. A cultura foi mantida a 37 °C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 4.2.3 K562

A linhagem K562 tem origem da medula óssea e foi isolada de um indivíduo portador de leucemia mielóide crônica. As células foram cultivadas em suspensão, em meio DMEM, suplementado com 10% de soro bovino fetal, em garrafa para cultura T25. A cultura foi mantida a 37 °C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 4.2.4 B16F10

Esta linhagem é derivada de um melanoma de *Mus musculus*, cepa C57BL6/6J. As células foram cultivadas aderidas em garrafas T25 contendo meio DMEM, suplementado com 10% de soro bovino fetal. A cultura foi mantida a 37 °C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 4.2.5 J774A.1

Esta linhagem de macrófagos é derivada de *Mus musculus*, linhagem BALB/c tendo como origem líquido ascítico. As células foram cultivadas aderidas em garrafas T25 contendo meio DMEM, suplementado com 10% de soro bovino fetal. A cultura foi mantida a 37 °C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 4.3 Obtenção de células esplênicas de camundongos BALB/c

Foram utilizados camundongos *Mus musculus* das linhagens isogênicas BALB/c, machos, com 6 a 8 semanas de idade, pesando  $20 \pm 2$  g, provenientes do biotério da Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro. O protocolo de experimentação animal utilizado no presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ com registro 26/2011.

Os animais foram eutanasiados por asfixia em câmara de CO<sub>2</sub>, sendo realizada assepsia com álcool a 70%. Na cabine de fluxo laminar cada animal foi fixado à prancha de dissecação pelas patas com auxílio de agulha. Foi realizada incisão xifo-pubiana sob condições assépticas, retirando-se o baço, que foi imediatamente imergido em tubos cônicos contendo 40 mL de meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. Cada baço foi transferido para placas de petri sendo macerado, com o auxílio de laminas de vidro. A suspensão celular obtida foi transferida para tubos cônicos contendo 10 mL de meio RPMI e centrifugada a 4 °C, 200 x g durante 5 minutos. Após o descarte do sobrenadante, o sedimento, contendo as células, foi ressuspensionado em meio RPMI completo. Uma alíquota de cada suspensão celular foi diluída em azul de tripan para quantificação e verificação da viabilidade celular, em câmara de Neubauer. Em seguida, foi realizada a diluição das células em meio de cultura, para o número de  $6 \times 10^5$ /mL, para a avaliação da citotoxicidade dos compostos por timidina tritiada.

#### 4.4 Avaliação da proliferação celular por timidina tritiada

Células esplênicas ( $6 \times 10^5$  células/poço), obtidas como descrito no tópico 4.3, foram cultivadas em placas de 96 poços de fundo plano, contendo meio de cultura RPMI completo. Para o ensaio de proliferação celular, as células foram incubadas com os compostos em seis diferentes concentrações (100, 50, 25, 10, 5 e 1 µg/ml) e com timidina tritiada (<sup>3</sup>H-timidina / Amersham International, USA) (1 µCi/poço) durante 24 h em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C. Como controle foram utilizadas células tratadas com saponina (0,05%), células tratadas com DMSO (1%), e sem tratamento, todos com timidina tritiada (1 µCi/poço) associada em paralelo. Cada composto foi testado em triplicata. Após 24 h de incubação, as células foram

coletadas através do coletor automático de células (Scatron) em papel de fibra de vidro (Whatman, AH). Após secagem do papel de fibra de vidro, o material foi transferido para frascos, acrescidos de 2 ml do líquido de cintilação (Fisher Scientific Company, USA). Posteriormente, a incorporação de timidina tritiada pelas células foi determinada através de contador beta de cintilação (LKB-Wallace Rack beta). O percentual de citotoxicidade foi determinado comparando-se a percentagem de incorporação de timidina tritiada nos poços com as drogas em relação aos poços não tratados. A concentração citotóxica que inibe 50% do crescimento ( $CC_{50}$ ) foi determinada utilizando-se o software Graph Pad Prism.

#### 4.5 Avaliação da citotoxicidade e atividade anticâncer pelo ensaio de MTT

Para a avaliação da citotoxicidade, em células J774A.1, e da atividade anticâncer,  $1 \times 10^5$  células por poço foram adicionadas em placas de cultura de 96 poços sendo incubadas em atmosfera úmida com 5% de  $CO_2$  a  $37^\circ C$  por 24 horas. Em seguida, diferentes concentrações dos compostos (100, 50, 25, 10, 5 e 1  $\mu g/ml$ ) foram adicionadas, sendo incubadas durante 72 horas. A cisplatina foi utilizada como controle positivo. O controle negativo recebeu somente veículo. Após esse período, 25  $\mu L$  de MTT - brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] em PBS (5 mg/mL, p/v) foram acrescentados a cada poço, incubando-se por 2 horas. Após esse período, retirou-se o meio de cultura e adicionou-se 100 $\mu L$  de DMSO para a dissolução dos cristais de formazan. Procede-se a leitura da densidade ótica em espectrofotômetro (THERMO SCIENTIFIC Multiskan FC) em absorvância de 540 nm. A média da densidade ótica dos poços teste foi comparada com a média da densidade ótica do grupo controle para a determinação da concentração citotóxica para 50% da cultura ( $CC_{50}$ ) utilizando o software Graph Pad Prism.

#### 4.6 Ensaio de citometria com Anexina V-FITC e PI

Para a avaliação do tipo de morte celular induzida pelos compostos, foi realizada marcação com Anexina V-FITC (AN) e Iodeto de Propídio (PI).

Para a realização dos experimentos, foram adicionados  $1 \times 10^5$  células de linhagem tumoral por poço, em placas de cultura de 24 poços, sendo incubadas por 24 horas. Após o período de incubação, o valor da  $CC_{50}$  (obtido nos ensaios de MTT)

de cada composto a ser testado foi adicionado em duplicata. Como controles, utilizou-se cisplatina (no valor de  $CC_{50}$  para cada linhagem), saponina (0,05%) e um basal não tratado.

Para a compensação do citômetro de fluxo (Facs Calibur, BD), alguns poços foram reservados para posterior marcação apenas com Anexina V-FITC (BDPharmingen), apenas com PI e duplo marcado (Anexina V-FITC e PI), todos em duplicata. Após testes, com incubações no período de 24, 48 e 72 horas, foi verificado que o período de 72 horas foi mais favorável a verificação da indução de morte celular. Após esse período de incubação, o conteúdo de cada duplicata na placa de cultura foi transferido para um microtubo. Esse microtubo foi centrifugado a 1480xg por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, e o pellet foi ressuscitado em 1 mL de PBS estéril e novamente centrifugado a 1480xg, por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuscitado em 200  $\mu$ L de tampão de apoptose (Annexin V Binding Buffer- BDPharmingen). O conteúdo de cada tubo foi transferido para tubos de citometria. Adicionou-se, em seguida, 5  $\mu$ L de Anexina V-FITC e 10  $\mu$ L de PI. A leitura, no citometro de fluxo, foi realizada após 15 minutos, adquirindo-se 20.000 células. A aquisição dos dados foi feita com o software Cell Quest Pro e a análise foi feita utilizando o software FlowJo 7.6. A análise estatística foi realizada utilizando-se o software Graph Pad Prism 5. O teste estatístico utilizado foi ANOVA, seguido do teste de Dunnett.

#### 4.7 Dosagem de citocinas no sobrenadante de células

Células da linhagem J774A.1 foram cultivadas em placas de cultura de 24 poços por 24 horas. Após esse período, foi feito o tratamento com os compostos, durante os períodos de 24, 48 e 72 horas de incubação, com o propósito de dosar em seus sobrenadantes a produção das citocinas IL-10, IL-12 e TNF, utilizando-se a técnica de ELISA de captura. As células em questão foram cultivadas na razão de  $1 \times 10^5$  células/mL por poço em placas de 24 poços, e os compostos foram adicionados nas suas respectivas concentrações de  $CC_{50}$ . Além disso, foram utilizados como controles células sem tratamento (Basal), tratadas com Concanavalina A (ConA) (2,5  $\mu$ g/mL), com Lipopolissacarídeo (LPS) (50 ng/mL) e com cisplatina (58,98  $\mu$ M). A coleta dos sobrenadantes se deu em três tempos

distintos: 24, 48 e 72 horas de incubação. Os sobrenadantes foram armazenados a -20°C até o momento da realização dos ensaios.

Para a realização do ensaio de ELISA, com os sobrenadantes obtidos, foram utilizados anticorpos monoclonais do Kit OptEIA (BD Biosciences). Inicialmente, microplacas de ELISA (Costar-96 poços) foram sensibilizadas com 25 µL dos anticorpos anti-citocinas específicos (de acordo com o fabricante), diluídos em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 e incubadas por 18h a 4°C. Após este período, as placas foram lavadas três vezes com 150 µL /poço de PBS pH 7,2-Tween-20 - 0,05% (PBS-Tw), e incubadas com 100 µL da solução bloqueadora contendo soro fetal bovino (PBS pH 7,2 + 10% SFB) por 1h, a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tw. Os padrões de cada citocina (disponibilizados no Kit) foram diluídos em PBS pH 7,2 + 10% SFB a partir da concentração inicial de cada kit em diluição seriada com fator 2. Em seguida, 25 µL da amostra e dos padrões foram adicionados em duplicata e a placa incubada por 2h a TA. As placas foram lavadas 6 vezes com PBS-Tw e 25 µl dos anticorpos biotinilados específicos (de acordo com o fabricante), diluídos em PBS pH 7,2 + 10% SFB, foram adicionados, seguido de incubação por 1h30 min, a TA. Após 9 lavagens com PBS-Tw, foi adicionado 50 µL da solução reveladora contendo ABTS - 2,2-azino-de [sulfato(6)de 3-etil benzitiazolina] (KPL). A reação foi bloqueada com 25 µL de ácido sulfúrico 1M e a leitura realizada a 405 nm no espectrofotômetro (Multiskan FC THERMO SCIENTIFIC).

As concentrações das amostras foram calculadas na região linear da curva de titulação dos padrões de citocinas e as concentrações finais expressas em pg/ml. Os ensaios foram realizados em duplicata.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação da proliferação celular por timidina tritiada

Com o objetivo de avaliar a atividade dos compostos em estudo sobre a proliferação de células do sistema imunológico foram realizados experimentos com o emprego da timidina tritiada. A população celular utilizada, esplenócitos, é composta de uma variedade de células, como linfócitos T e B, macrófagos e células dendríticas, apresentando diversas funções no sistema imune. Neste experimento, a incorporação do precursor radiomarcado, <sup>3</sup>H-timidina, durante a replicação da dupla fita do DNA na replicação, é mensurada.

A cisplatina apresentou valor de CC<sub>50</sub> de 171,71 µM. Os maiores valores de CC<sub>50</sub> em esplenócitos dentre todas as séries foram observados com a série PA/PT (3-Bromo-Fenil-propil-Hidrazona-Tiazóis). Destacaram-se entre esses os compostos PT01.3, PT01.4, PT01.14, PT01.8 e PT01.5, como os menos tóxicos para esplenócitos. Na série de Ftalil-Hidrazona-Tiazóis, os compostos PM08 e PM05 apresentaram os maiores valores de CC<sub>50</sub>.

Na série de tiazóis acetilpiridinicos, os compostos AT2 e AT6 apresentaram os maiores valores de CC<sub>50</sub> em esplenócitos dentre os compostos desta série. Já na série de hidrazonas piridinicas, o composto EP3 destacou-se com o maior valor de CC<sub>50</sub>. Os valores de CC<sub>50</sub>, em esplenócitos, calculados para todos os compostos podem ser observados na tabela 3.

### 5.2 Avaliação da citotoxicidade em linhagem de macrófagos

Com o objetivo de avaliar o efeito citotóxico dos compostos sobre outra importante célula na resposta imunológica aos tumores foram realizados ensaios de MTT com a linhagem de macrófago J774A.1. Nesse experimento, as células foram incubadas com os compostos testados por um período de 72 horas.

A cisplatina apresentou um valor de CC<sub>50</sub> de 58,98 µM. Entre os compostos da série PA/PT o maior valor de CC<sub>50</sub> para a linhagem J774A.1 foi observado para o composto PT01.13. Na série PM, o maior valor de CC<sub>50</sub> foi observado para o composto PM04.

**Tabela 3** - Valores de  $CC_{50}$ , em  $\mu\text{M}$ , para todas as séries testadas com esplenócitos, macrófagos e linhagens tumorais.

| Composto   | Esplenócitos | J774A.1 | HT-29  | B16F10 | Jurkat | K562   |
|------------|--------------|---------|--------|--------|--------|--------|
| PA04       | 100,36       | 69,33   | 172,53 | 18,64  | 17,48  | 70,82  |
| PT01       | 43,12        | 51,05   | 153,67 | 103,39 | 67,82  | 210,45 |
| PT01.2     | 85,60        | 75,90   | 57,49  | 69,30  | 74,37  | 137,89 |
| PT01.3     | 148,58       | 113,60  | 24,13  | 102,10 | 116,63 | 70,87  |
| PT01.4     | 129,42       | 114,96  | 61,97  | 38,55  | 113,83 | 72,35  |
| PT01.5     | 81,90        | 21,95   | 58,34  | 27,84  | 110,66 | 94,07  |
| PT01.6     | 43,77        | 40,13   | 21,02  | 53,35  | 2,79   | 71,04  |
| PT01.7     | 32,95        | 67,47   | ND     | 96,26  | 125,69 | 100,39 |
| PT01.8     | 92,41        | 6,50    | 79,62  | 71,01  | 117,88 | 102,62 |
| PT01.9     | 44,87        | ND      | 126,75 | 67,00  | 406,65 | 40,26  |
| PT01.13    | 77,92        | 124,76  | 127,59 | 62,06  | 271,53 | 93,72  |
| PT01.14    | 90,77        | 75,37   | 18,29  | 131,44 | 25,13  | 133,74 |
| EP1        | 19,45        | 21,77   | 83,09  | 24,35  | 14,91  | 264,85 |
| EP2        | 56,68        | 182,57  | 17,18  | 15,46  | 32,80  | 263,37 |
| EP3        | 126,75       | 21,36   | 29,46  | 14,16  | ND     | 10,58  |
| PM         | 17,21        | 28,66   | 13,44  | 82,66  | 88,81  | ND     |
| PM01       | ND           | 37,01   | 21,05  | 35,17  | 83,60  | 12,09  |
| PM02       | 0,91         | 41,03   | 17,84  | 62,97  | 23,42  | ND     |
| PM03       | 49,28        | 40,51   | 22,09  | 85,05  | 114,49 | 6,21   |
| PM04       | 9,72         | 47,38   | 21,28  | 116,17 | 21,22  | 4,61   |
| PM05       | 63,21        | 26,47   | 273,22 | 90,05  | 21,53  | 777,87 |
| PM06       | 48,50        | 30,07   | 114,45 | 72,93  | 11,54  | 4,10   |
| PM07       | 18,72        | 21,20   | 95,77  | 89,51  | ND     | 83,44  |
| PM08       | 100,07       | 26,57   | 129,71 | 34,94  | 8,54   | ND     |
| PM10       | 8,67         | ND      | 0,00   | 55,01  | 23,99  | 36,15  |
| AT1        | 19,21        | 30,35   | 57,83  | 19,94  | 16,23  | 199,90 |
| AT2        | 51,77        | 36,05   | 65,62  | 18,55  | 21,30  | 64,97  |
| AT3        | 21,33        | 19,99   | 108,25 | 49,54  | 19,59  | 70,09  |
| AT4        | 28,29        | 20,32   | 78,87  | 25,73  | 28,18  | 62,68  |
| AT6        | 37,54        | 33,60   | 51,29  | 52,74  | 21,54  | 51,99  |
| AT9        | 34,87        | 11,65   | 25,22  | 19,03  | ND     | 154,46 |
| Cisplatina | 171,71       | 58,98   | 179,07 | 116,72 | 89,47  | 179,07 |

Fonte: Elaborado pelo autor. Nota: ND corresponde a Não Determinado. Maior valor da série em amarelo. Menor valor da série em azul.

Na série EP, o maior valor foi observado no composto EP2. Por fim, na série AT, o maior valor de  $CC_{50}$  foi observado com AT2. Os valores de  $CC_{50}$  para todos os compostos encontram-se expostos na tabela 3.

### 5.3 Avaliação da atividade anticâncer pelo ensaio de MTT

Com os ensaios de MTT foi avaliada a citotoxicidade sobre linhagens tumorais após o período de 72 horas de incubação com os compostos. Os resultados para as linhagens HT-29, B16F10, Jurkat e K562 estão apresentados na tabela 3. O menor valor de  $CC_{50}$  para cada linhagem, em cada série de compostos, está marcado em azul.

A cisplatina apresentou os valores de  $CC_{50}$  de 179,07  $\mu\text{M}$  para a linhagem HT-29 e 116,72  $\mu\text{M}$  para a linhagem B16F10. Para as linhagens Jurkat e K562, a cisplatina apresentou valores de  $CC_{50}$  de 89,47 e 179,07  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

### 5.4 Ensaios de citometria com Anexina V-FITC e PI

Nestes ensaios, foram selecionados os compostos com os melhores resultados, obtidos nos ensaios anteriores. A seguir serão apresentados os resultados para a linhagem HT-29 e Jurkat.

#### 5.4.1 HT-29

Com a linhagem tumoral HT-29, foram testados compostos tiazóis acetilpiridínicos (AT1, AT2, AT3, AT4, AT6, AT9) e da série ftalil-hidrazona-tiazol (PM, PM01, PM02, PM03, PM04, PM05), selecionados com base nos experimentos anteriores. A tabela 4 apresenta as concentrações utilizadas nos ensaios. Controles sem tratamento e tratado com saponina e cisplatina também foram avaliados.

**Tabela 4** - Compostos e respectivas concentrações utilizadas nos ensaios de Anexina V-FITC/PI, para a linhagem HT-29.

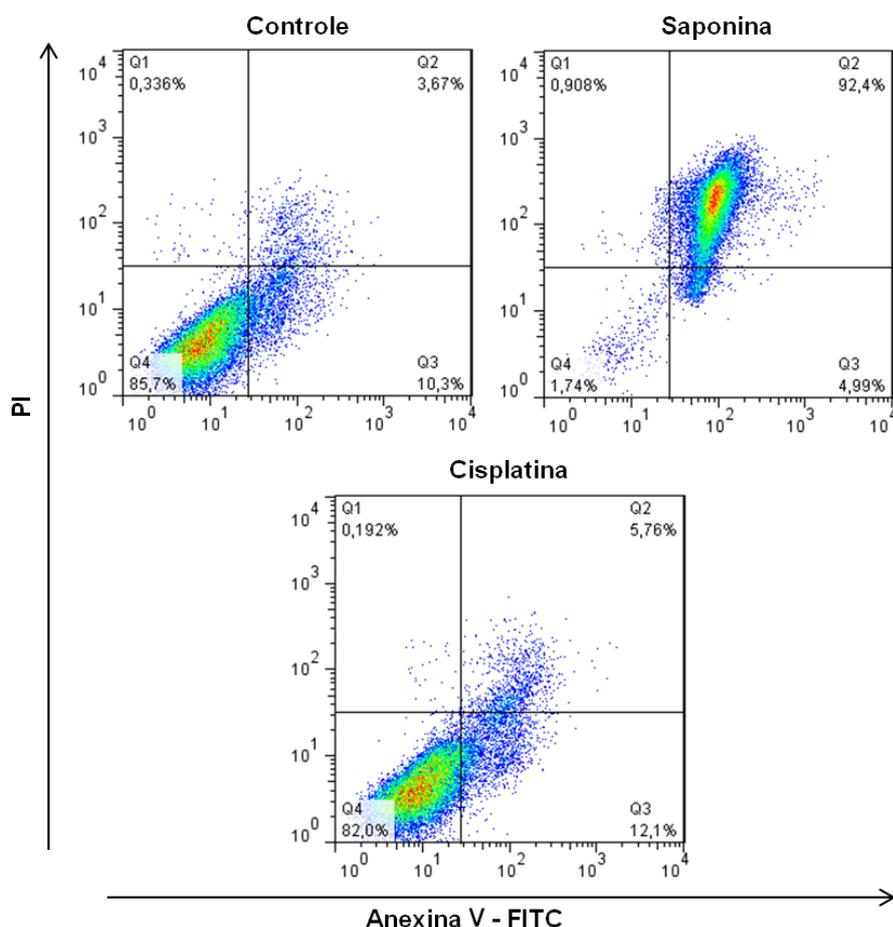
| <b>Compostos testados</b> | <b>CC<sub>50</sub> (µM)</b> | <b>Compostos testados</b> | <b>CC<sub>50</sub> (µM)</b> |
|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| PM                        | 13,44                       | AT1                       | 57,83                       |
| PM01                      | 21,05                       | AT2                       | 65,62                       |
| PM02                      | 17,84                       | AT3                       | 108,25                      |
| PM03                      | 22,09                       | AT4                       | 78,87                       |
| PM04                      | 21,28                       | AT6                       | 51,29                       |
| PM05                      | 273,22                      | AT9                       | 25,22                       |

Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a análise e obtenção dos dot-plots, os resultados foram submetidos a teste estatístico (ANOVA seguido de teste de Dunnett), utilizando o software Graph Pad Prism.

Na figura 6 são apresentados os resultados de citometria de fluxo com a linhagem HT-29 com os controles basal, cisplatina e saponina. Observou-se, como esperado, baixa marcação com AN/PI no controle sem tratamento e grande quantidade de células duplamente marcadas após tratamento com a saponina.

**Figura 5**—Dot-plots obtidos do controle e após incubação com saponina e cisplatina, com a linhagem HT-29, após incubação por 72h.

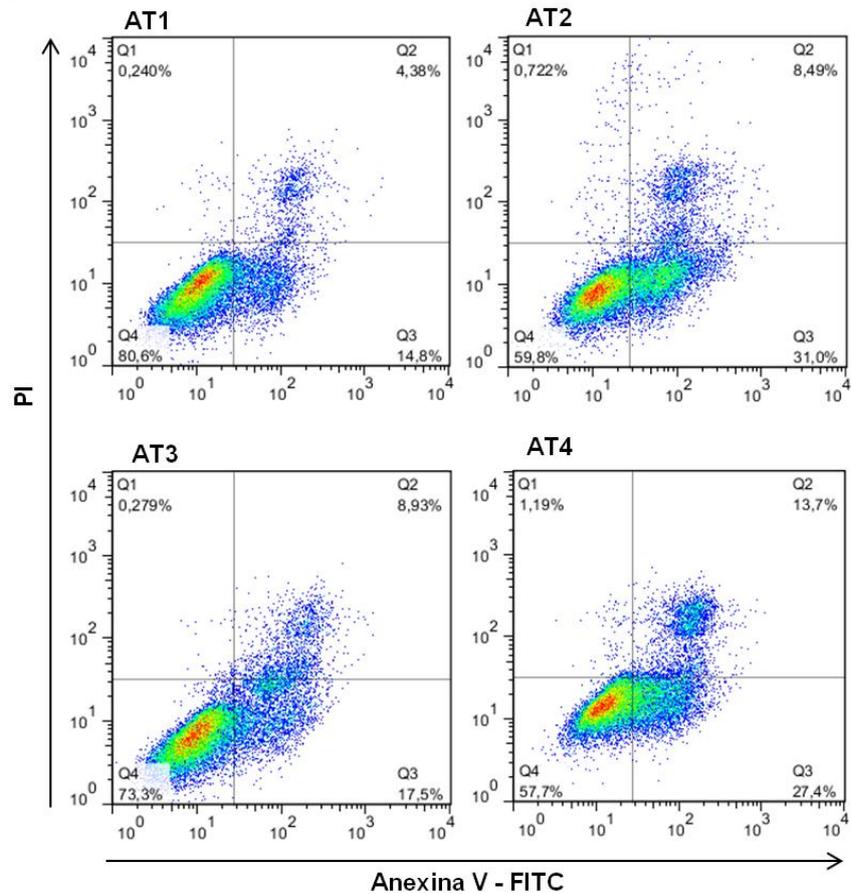


Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Concentrações utilizadas – controle (não houve tratamento), saponina (0,05% p/v), Cisplatina (179,07  $\mu$ M)

Entre os compostos da série dos tiazóis acetilpiridínicos (AT), os compostos AT2, AT3, AT4, AT6, AT9 apresentaram aumento significativo ( $p < 0.0001$ ) na população celular marcada com PI e duplo-marcada ( $AN^+PI^+$ ) quando comparado ao grupo controle, sinalizando para necrose. Observou-se também, aumento significativo ( $p < 0.0001$ ) da população celular marcada com AN, sinalizando para apoptose, após incubação com os compostos AT1, AT2, AT3, AT4, AT6 e AT9 quando comparados ao grupo controle (Figuras 7 e 8).

**Figura 6-** Dot-plots obtidos após incubação com os compostos AT1, AT2, AT3 e AT4, com a

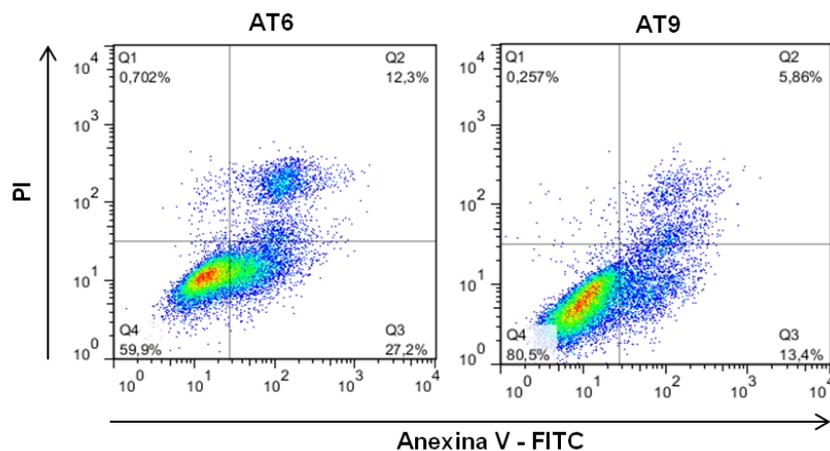


linhagem HT-29, após incubação por 72h.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Concentrações utilizadas, em  $\mu\text{M}$  – AT1 (57,83), AT2 (65,62), AT3 (108,25), AT4 (78,87).

**Figura 7-** Dot-plots obtidos após incubação com os compostos AT6 e AT9, com a linhagem HT-29, após incubação por 72h.

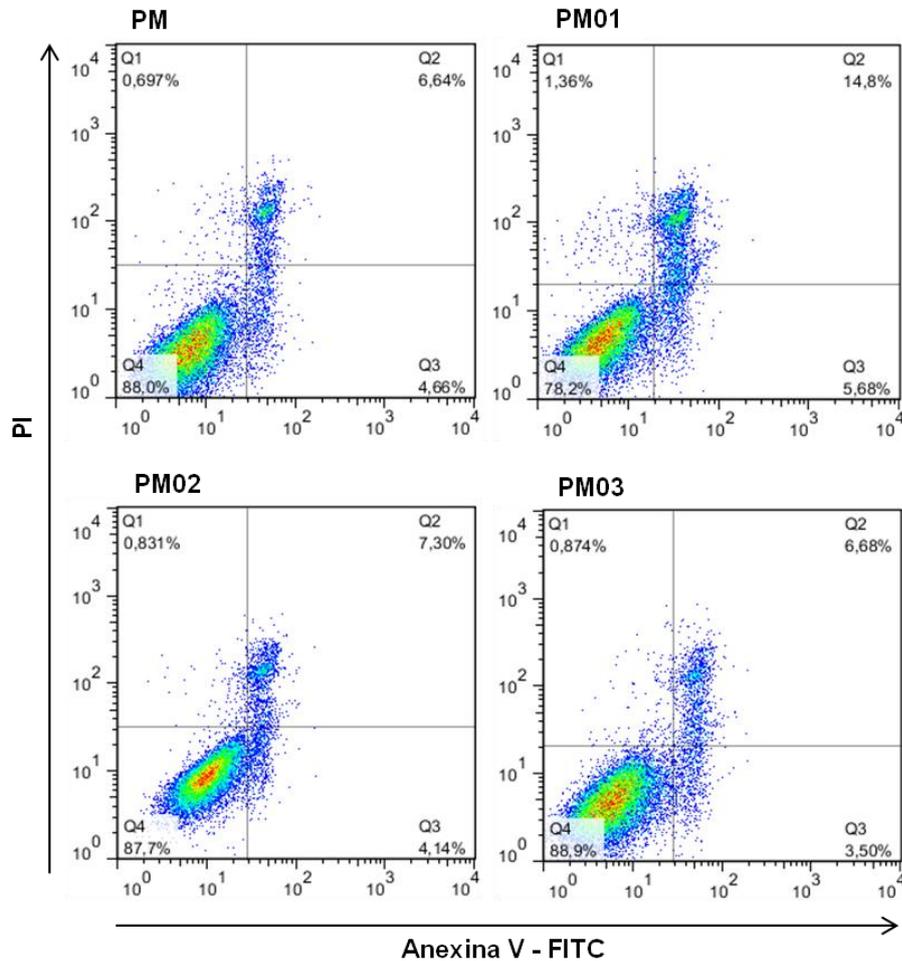


Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Concentrações utilizadas, em  $\mu\text{M}$  – AT6 (51,29), AT9 (25,22).

Com os compostos da série ftalil-hidrazona-tiazol (PM), observou-se aumento significativo ( $p < 0.0001$ ) na população celular com marcação para necrose ( $PI^+$  e  $AN^+PI^+$ ) para os compostos PM01 e PM05 quando comparados ao controle (Figuras 9 e 10). Por outro lado, a população celular com marcação para apoptose ( $AN^+$ ) só apresentou aumento significativo para o composto PM05 ( $p < 0.0001$ ) (Figura 10).

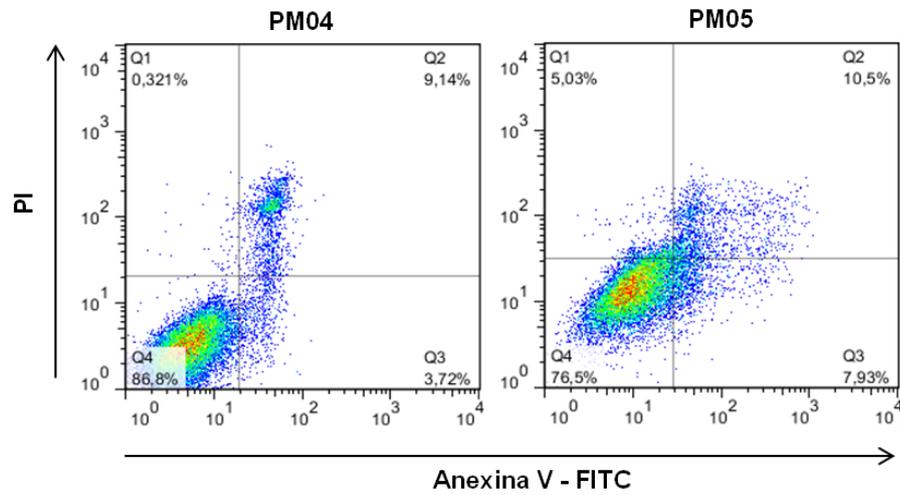
**Figura 8-** Dot-plots obtidos após incubação com compostos PM, PM01, PM02 e PM03, com a linhagem HT-29, após incubação por 72h.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Concentrações utilizadas, em  $\mu M$  – PM (13,44), PM01 (21,05), PM02 (17,84), PM03 (22,09).

**Figura 9-** Dot-plots obtidos após incubação com os compostos PM04 e PM05, com a linhagem HT-29, após incubação por 72h.

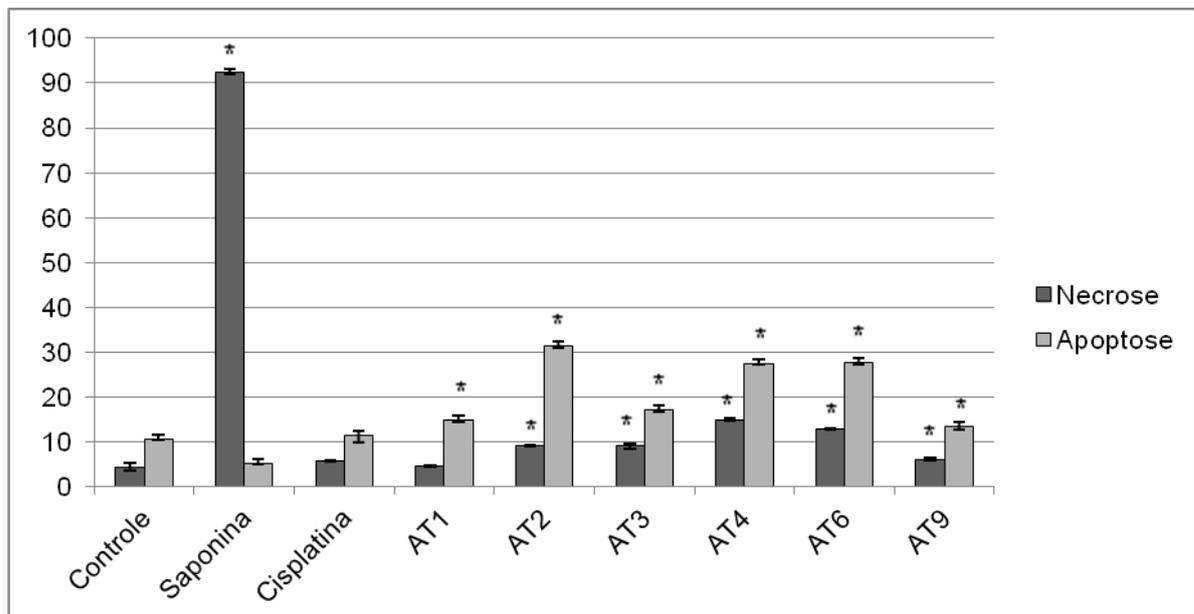


Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Concentrações utilizadas, em  $\mu\text{M}$  – PM04 (21,28), PM05 (273,22).

As figuras 11 e 12 mostram a porcentagem de células marcadas para apoptose e necrose para os compostos testados na linhagem HT-29.

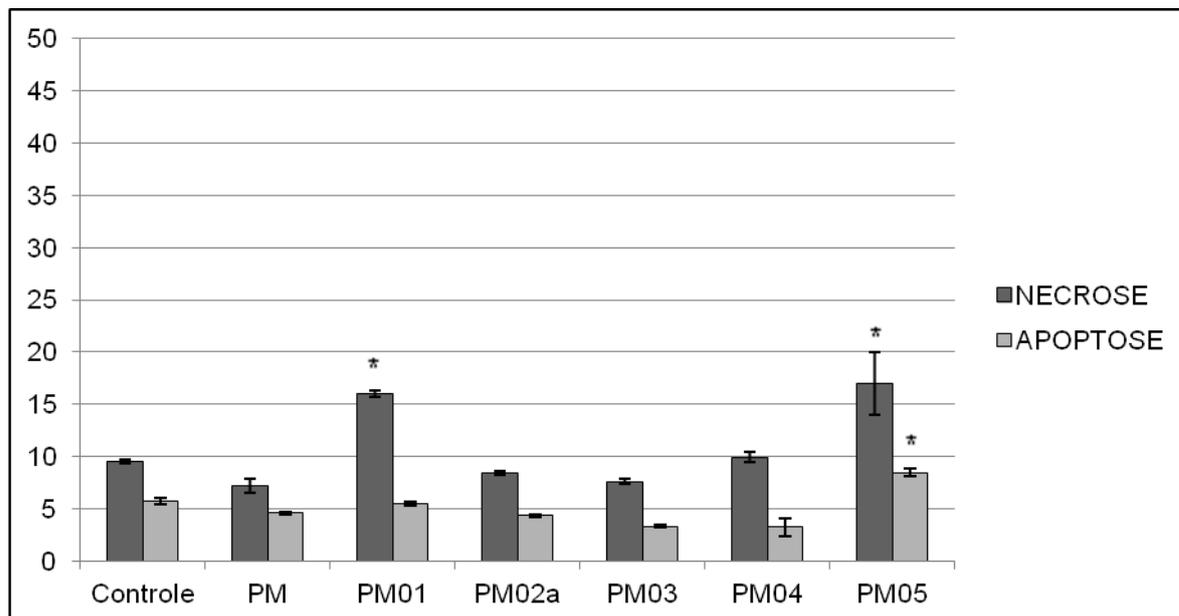
**Figura 10-** Porcentagem de células da linhagem HT-29 com marcação para necrose e apoptose após incubação por 72 horas com compostos da série AT, saponina e cisplatina.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: (\*) corresponde a aumento significativo em relação ao controle.  $p < 0.0001$ .

**Figura 11-** Porcentagem de células da linhagem HT-29 com marcação para necrose e apoptose após incubação por 72 horas com compostos da série PM.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: (\*) corresponde a aumento significativo em relação ao controle.  $p < 0.0001$ .

#### 5.4.2 Jurkat

Com a linhagem Jurkat, foram testados compostos das séries 3-Bromo-Fenil-propil-Hidrazona-Tiazóis (PA04, PT01.6, PT01.14), Ftalil-Hidrazona-Tiazol (PM02, PM04, PM05 e PM08), Tiazóis acetilpiridínicos (AT1, AT2, AT3, AT4, AT6) e Hidrazonas piridínicas (EP2). A tabela 12 apresenta as concentrações utilizadas nos ensaios.

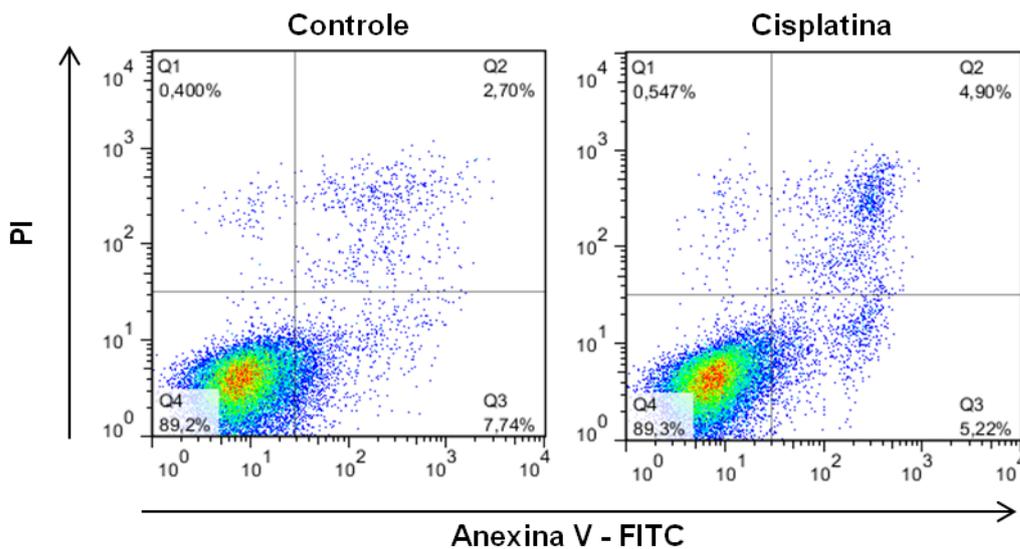
**Tabela 5** - Compostos e respectivas concentrações utilizadas nos ensaios de Anexina V-FITC/PI, para a linhagem Jurkat.

| Compostos testados | CC <sub>50</sub> (µM) | Compostos testados | CC <sub>50</sub> (µM) |
|--------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|
| PA04               | 17,48                 | AT1                | 16,23                 |
| PM02               | 23,42                 | AT2                | 21,30                 |
| PM04               | 21,22                 | AT3                | 19,59                 |
| PM05               | 21,53                 | AT4                | 28,18                 |
| PM08               | 8,54                  | AT6                | 21,54                 |
| PT01.6             | 2,79                  | EP2                | 32,80                 |
| PT01.14            | 25,13                 | -                  | -                     |

Fonte: Elaborado pelo autor.

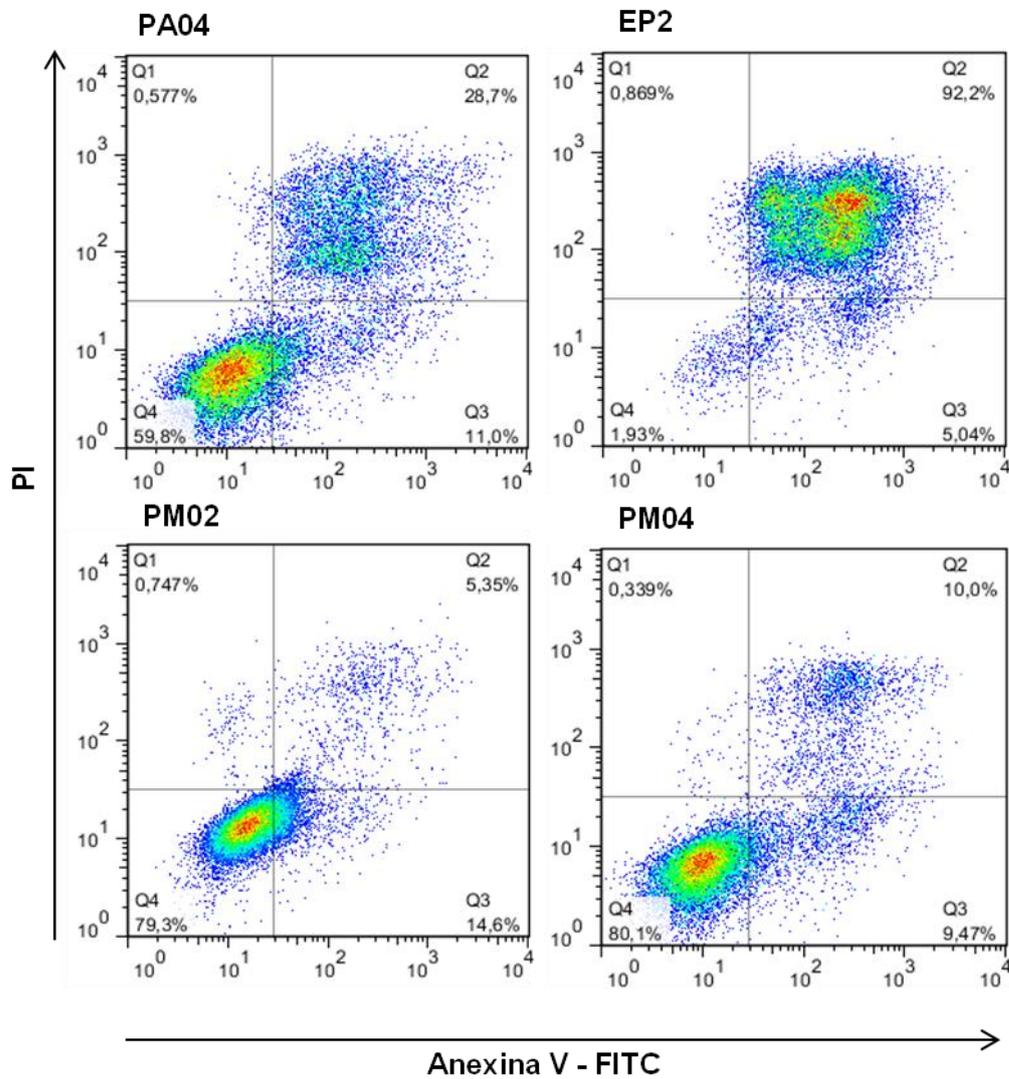
A seguir serão apresentados os dot-plots obtidos após aquisição dos eventos no citômetro de fluxo e análise com o software FlowJo. Na figura 13 são apresentados os resultados de citometria de fluxo com o controle basal e cisplatina. Foi observado aumento significativo na população celular com marcação sinalizando para necrose ( $PI^+$  e  $AN^+PI$ ) na presença dos compostos PA04, EP2, PM02 e PM04 (Figura 14), e nos compostos AT1, AT2, AT3, AT4, AT6 (Figura 15) quando comparados ao grupo controle ( $p < 0.0001$ ). Na população celular marcada para apoptose ( $AN^+$ ) foi observado aumento significativo após incubação com os compostos PA04, AT1, AT2, AT3, AT4, AT6, PM02 e PM04 (Figuras 14 e 15) quando comparado ao grupo controle ( $p < 0.0001$ ).

**Figura 12-** Dot-plots obtidos do controle e após incubação com cisplatina, com a linhagem Jurkat, após incubação por 72h.



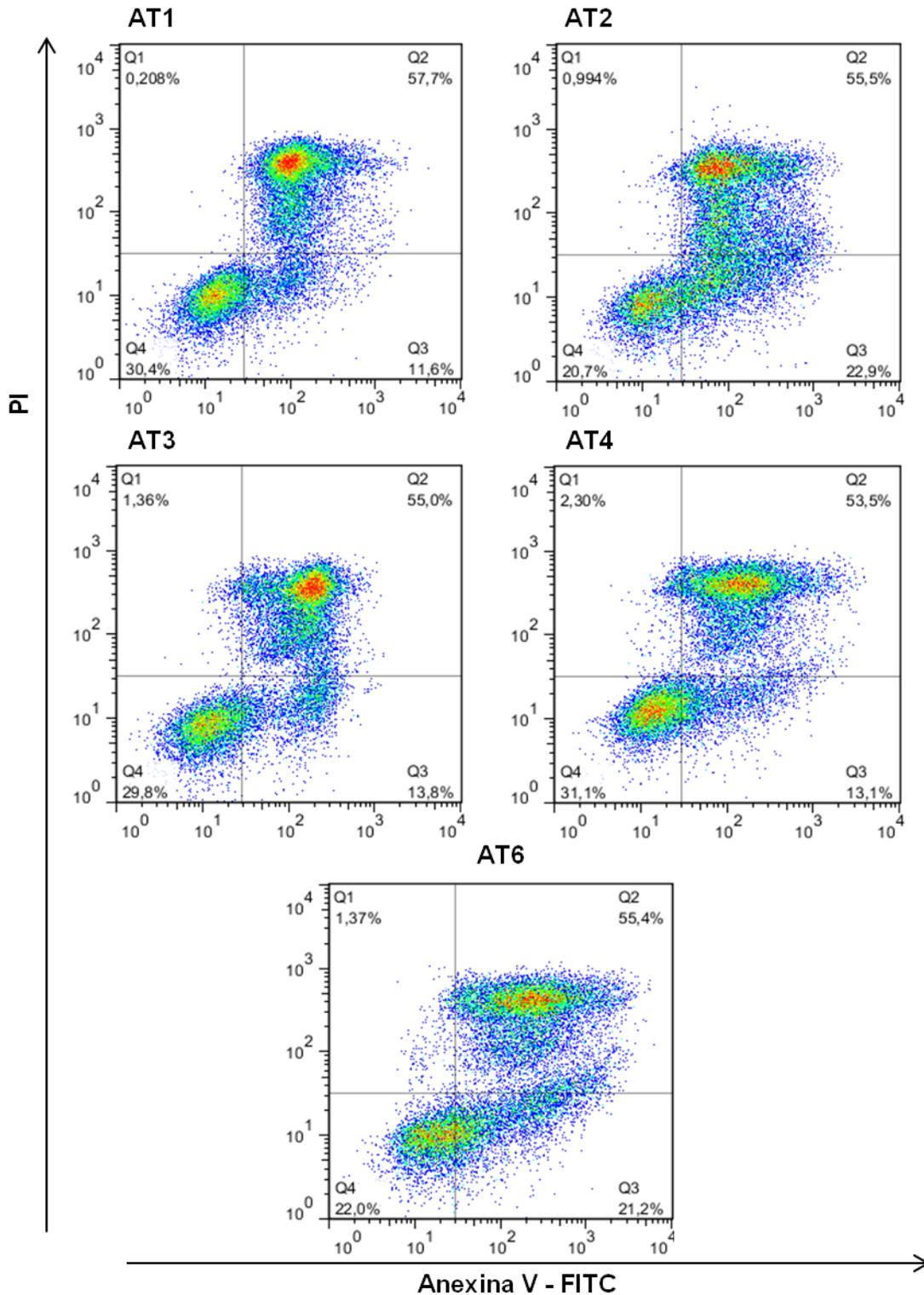
Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 13-** Dot-plots obtidos após incubação com os compostos PA04, EP2, PM02 e PM04, com a linhagem Jurkat, após incubação por 72h.



Fonte: Elaborado pelo autor.

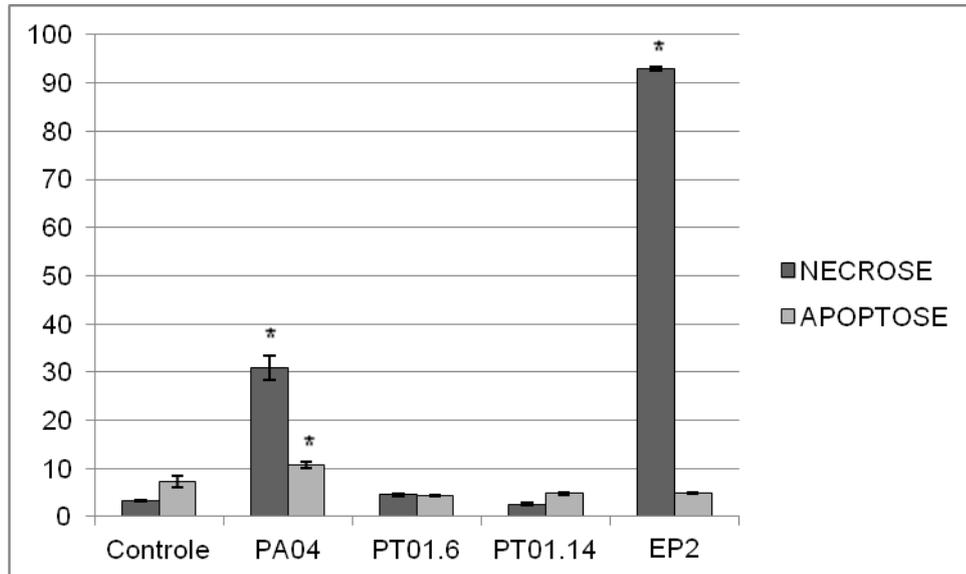
**Figura 14-** Dot-plots obtidos após incubação com os compostos AT1, AT2, AT3, AT4 e AT6, com a linhagem Jurkat, após incubação por 72h.



Fonte: Elaborado pelo autor.

As figuras 16 e 17 mostram a porcentagem de células marcadas para apoptose e necrose para os compostos testados na linhagem Jurkat.

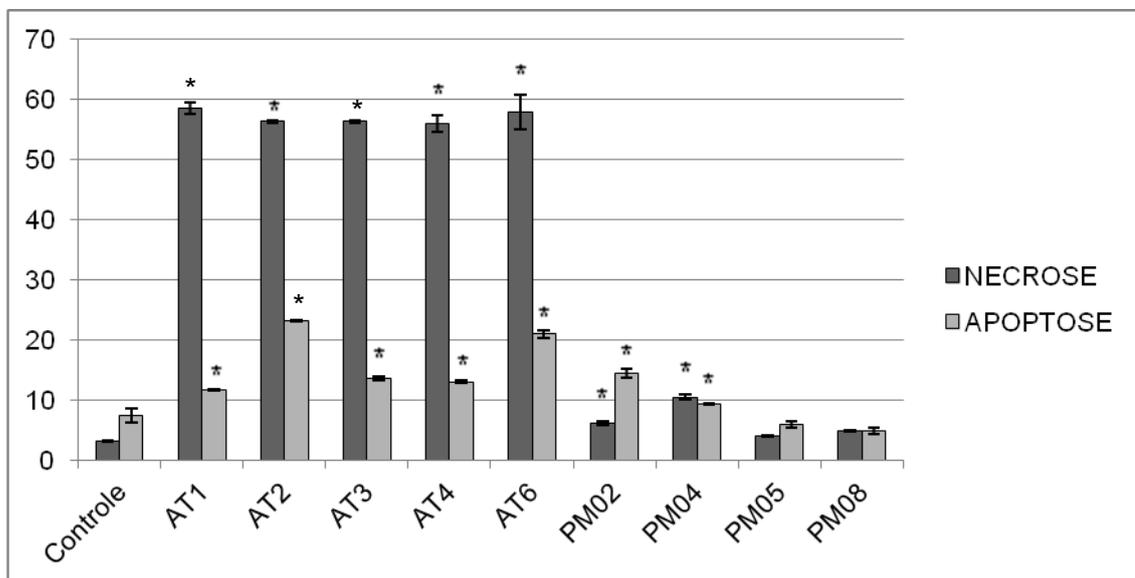
**Figura 15-** Porcentagem de células da linhagem Jurkat com marcação para necrose e apoptose após incubação com compostos da série PA/PT e EP.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: (\*) corresponde a aumento significativo em relação ao controle.  $p < 0.0001$ .

**Figura 16-** Porcentagem de células da linhagem Jurkat com marcação para necrose e apoptose após incubação com compostos da série AT e PM.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: (\*) corresponde a aumento significativo em relação ao controle.  $p < 0.0001$ .

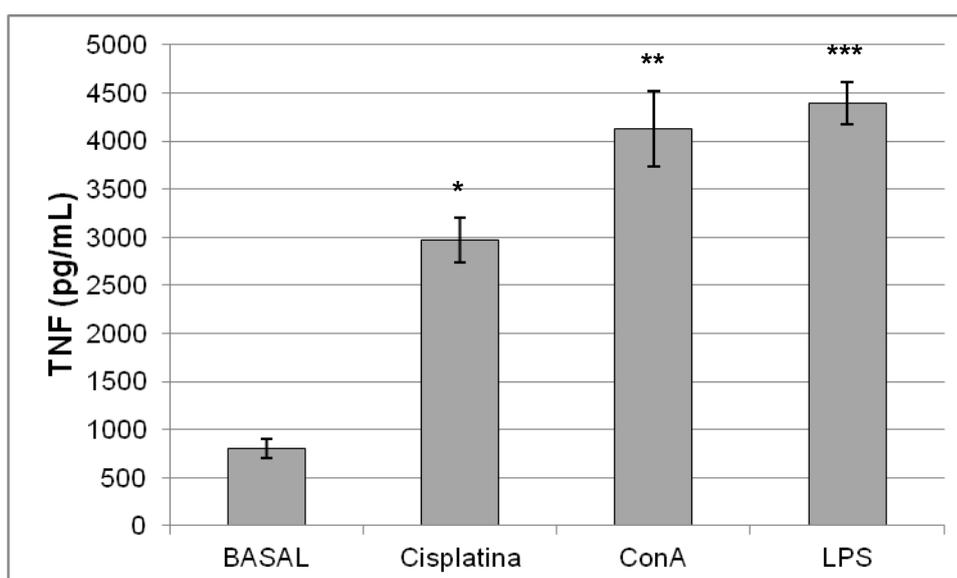
## 5.5 Dosagem de citocinas em sobrenadante de cultura

Para dosagem de citocinas, foram utilizados sobrenadantes de cultura de macrófagos J774A.1, em três tempos distintos de cultivo, 24, 48 e 72 horas. Serão apresentados, a seguir, os resultados para cada citocina.

### 5.5.1 TNF

No período de incubação de **24 horas** não foi detectada a produção de TNF, exceto para o controle basal. Por outro lado, após a incubação por **48 horas**, houve produção significativa de TNF no grupo tratado com cisplatina, ConA e LPS, quando em comparação ao grupo sem nenhum tratamento (Basal) (Figura 18).

**Figura 17-** Produção de TNF, após 48 horas de incubação, nos controles.

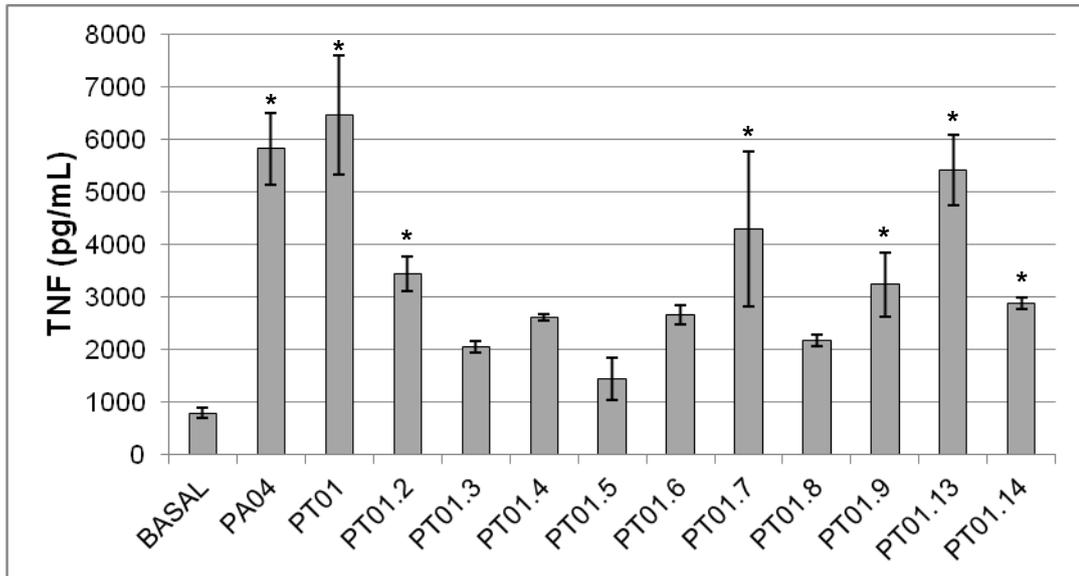


Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: (\*) corresponde à diferença significativa em relação ao basal, teste t.  $p < 0.0068$ . (\*\*) corresponde à diferença significativa com relação ao basal, teste t.  $p < 0.0072$ . (\*\*\*) corresponde à diferença significativa com relação ao basal, teste t.  $p < 0.0022$ .

Na série PA/PT, houve produção de TNF para os compostos PA04, PT01, PT01.2, PT01.3, PT01.4, PT01.5, PT01.6, PT01.7, PT01.8, PT01.9, PT01.13 e PT01.14 (Figura 19). Entretanto, essa produção foi significativa apenas para os compostos PA04, PT01, PT01.2, PT01.7, PT01.9, PT01.13 e PT01.14 quando comparado ao controle basal.

**Figura 18-** Produção de TNF, após 48 horas de incubação, no grupo tratado com os compostos da série PA/PT.

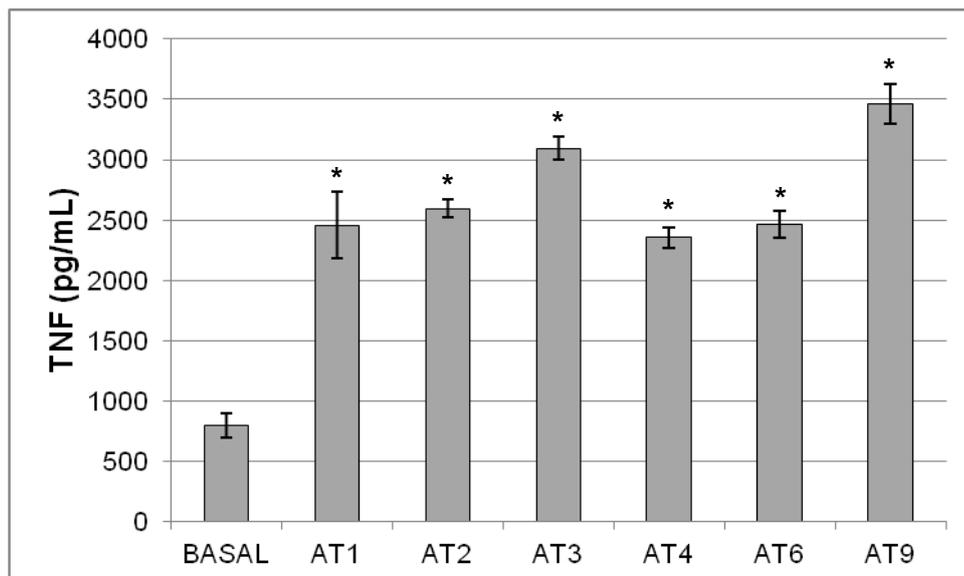


Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: (\*) corresponde à diferença significativa em relação ao basal, ANOVA seguido de teste de Dunnett's.  $p < 0.0001$ .

Na série AT, houve produção significativa de TNF em todos os compostos testados quando comparados ao grupo basal (Figura 20).

**Figura 19-** Produção de TNF, após 48 horas de incubação, no grupo tratado com os compostos da série AT.

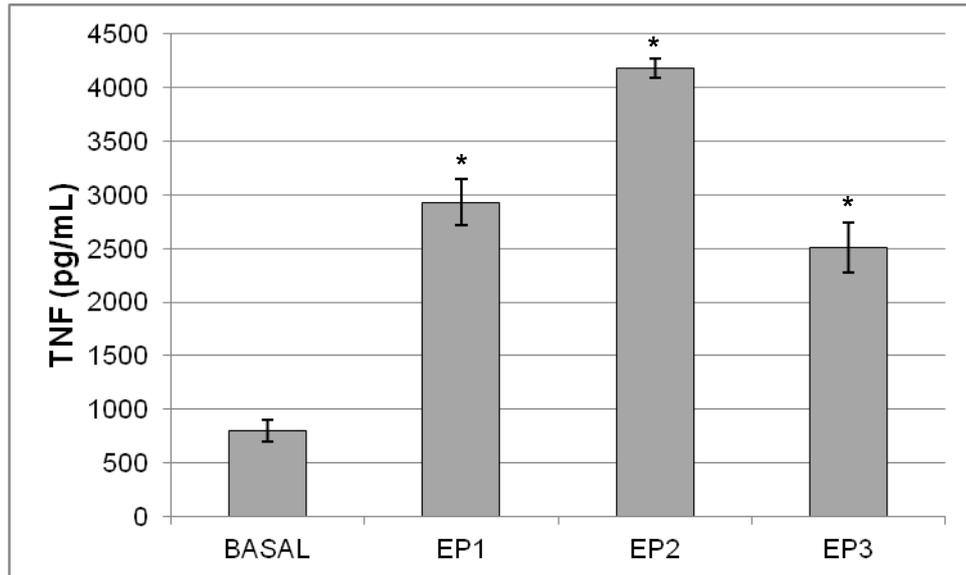


Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: (\*) corresponde à diferença significativa em relação ao basal, ANOVA seguido de teste de Dunnett's.  $p < 0.0001$ .

Com a série EP, após incubação com cada um dos três compostos, houve produção significativa de TNF (Figura 21) quando comparados ao grupo basal. Já com a série PM, houve produção de TNF significativa em comparação ao basal na presença de todos os compostos, exceto para o composto PM05 (Figura 22).

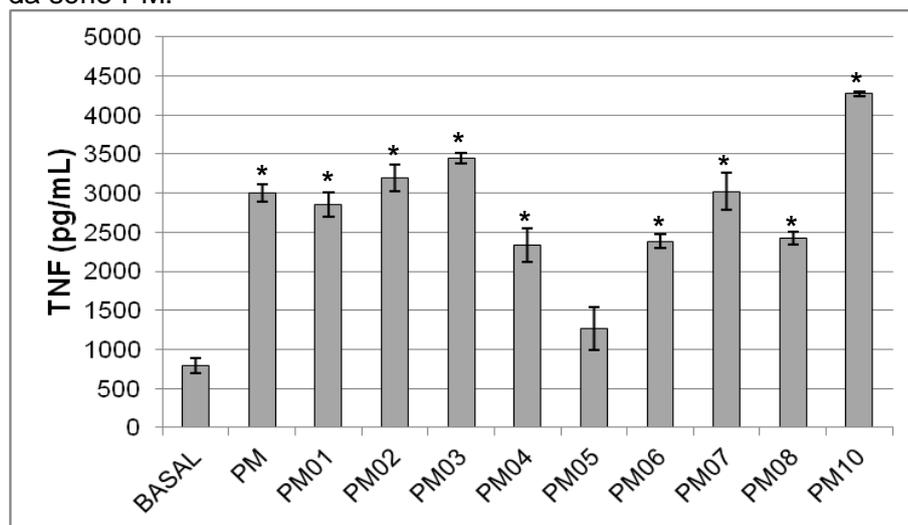
**Figura 20-** Produção de TNF, após 48 horas de incubação, no grupo tratado com os compostos da série EP.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: (\*) corresponde à diferença significativa em relação ao basal, ANOVA seguido de teste de Dunnett's.  $p < 0.0001$ .

**Figura 21-** Produção de TNF, após 48 horas de incubação, no grupo tratado com os compostos da série PM.

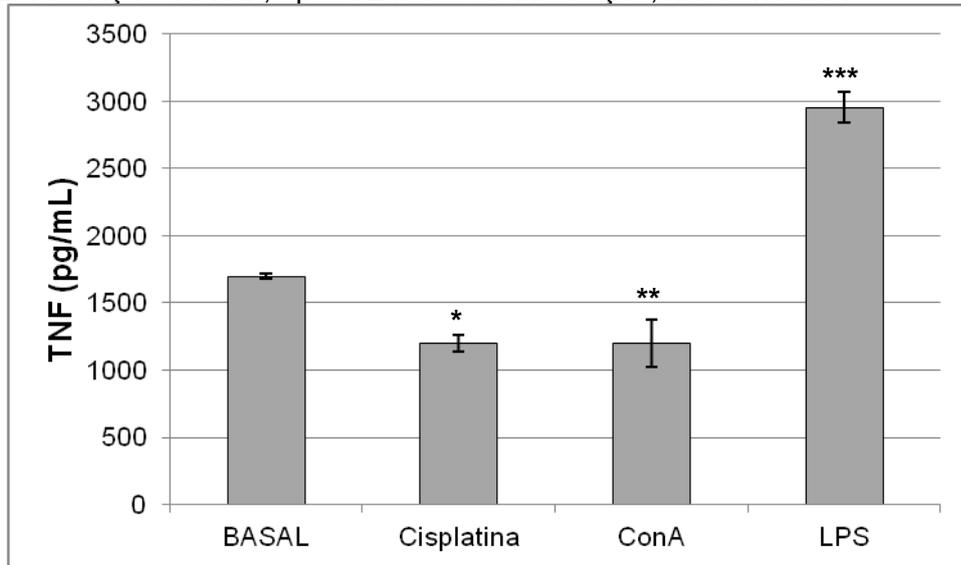


Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: (\*) corresponde à diferença significativa em relação ao basal, ANOVA seguido de teste de Dunnett's.  $p < 0.0001$ .

Em relação à produção de TNF no período de incubação de **72 horas**, esta foi significativa após a incubação com LPS, dentre os controles, quando comparados ao grupo basal (Figura 23). Todos os compostos da série PA/PT induziram produção significativa de TNF, com exceção dos compostos PT01.6 e PT01.8 (Figura 24).

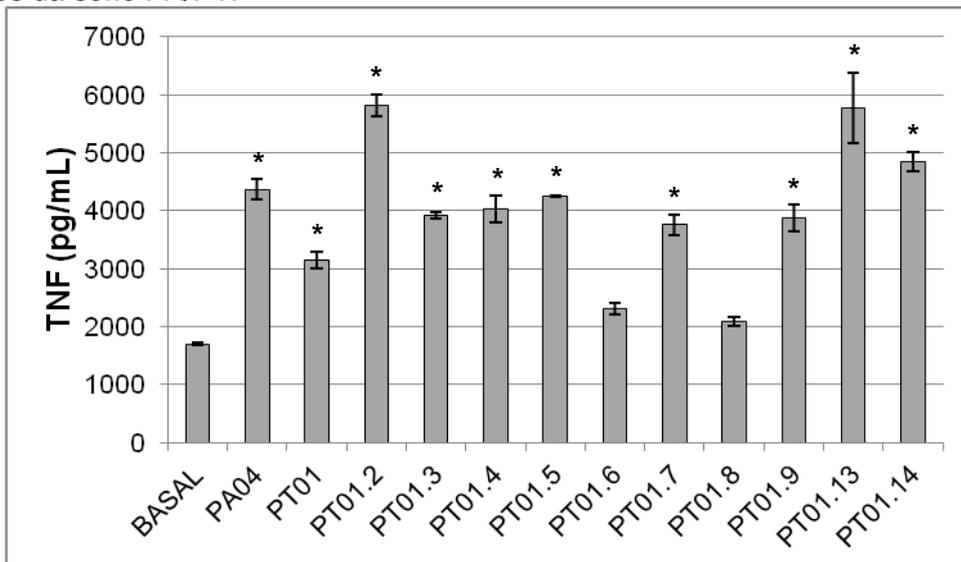
**Figura 22-** Produção de TNF, após 72 horas de incubação, nos controles.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: (\*) corresponde à diferença significativa em relação ao basal, teste t.  $p < 0.0076$ . (\*\*) Não houve diferença significativa em relação ao basal, teste t.  $p < 0.0578$ . (\*\*\*) corresponde à diferença significativa em relação ao basal, teste t.  $p < 0.0076$ .

**Figura 23-** Produção de TNF, após 72 horas de incubação, no grupo tratado com os compostos da série PA/PT.

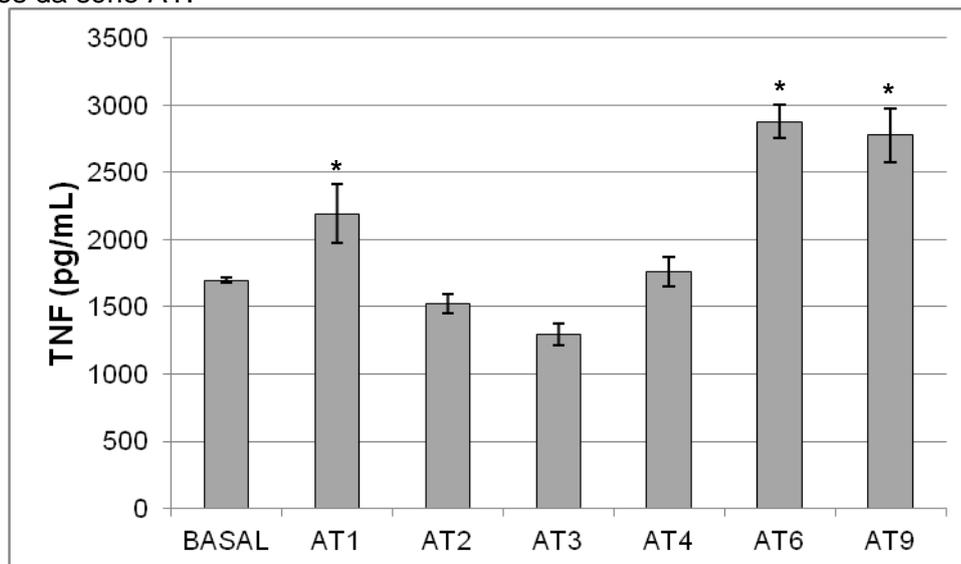


Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: (\*) corresponde à diferença significativa em relação ao basal, ANOVA seguido de teste de Dunnett's.  $p < 0.0001$ .

Na série AT, houve produção significativa de TNF após incubação com os compostos AT1, AT6 e AT9 (Figura 25). Já na série EP, os três compostos induziram produção significativa de TNF quando comparados ao grupo basal, após o período de incubação de 72 horas (Figura 26).

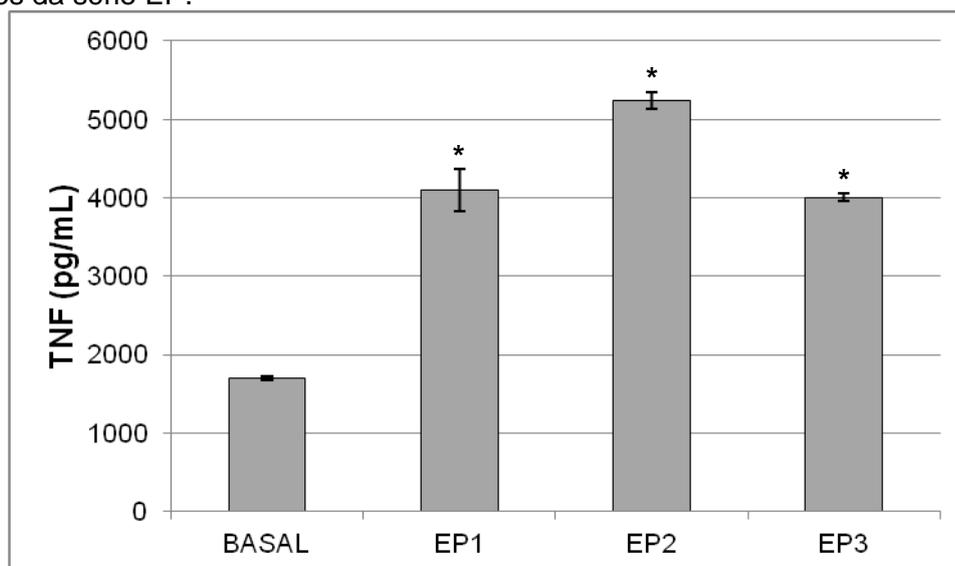
**Figura 24-** Produção de TNF, após 72 horas de incubação, no grupo tratado com os compostos da série AT.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: (\*) corresponde à diferença significativa em relação ao basal, ANOVA seguido de teste de Dunnett's.  $p < 0.0001$ .

**Figura 25-** Produção de TNF, após 72 horas de incubação, no grupo tratado com os compostos da série EP.

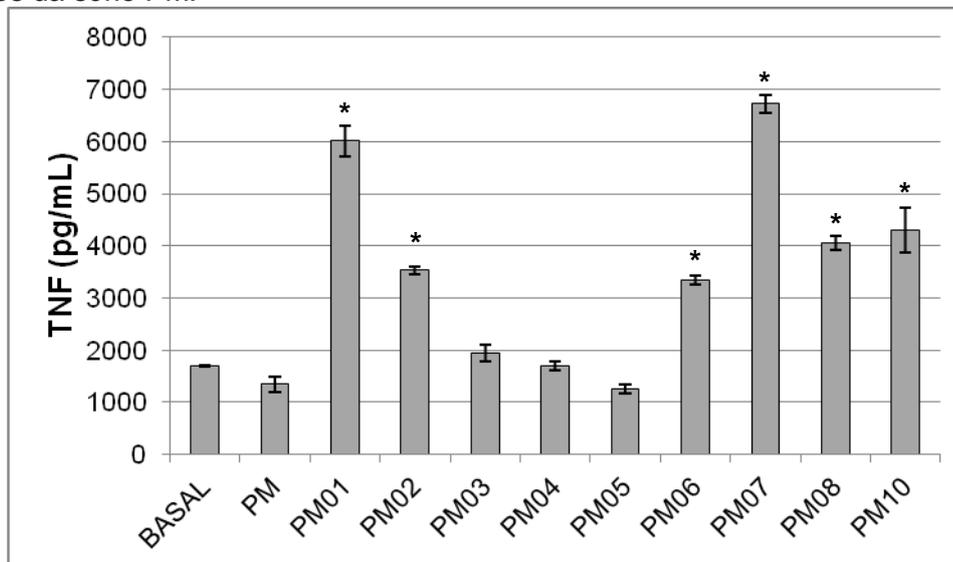


Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: (\*) corresponde à diferença significativa em relação ao basal, ANOVA seguido de teste de Dunnett's.  $p < 0.0001$ .

Após incubação com os compostos da série PM, apenas PM01, PM02, PM06, PM07, PM08 e PM10 induziram produção significativa de TNF quando comparado ao grupo basal (Figura 27).

**Figura 26-** Produção de TNF, após 72 horas de incubação, no grupo tratado com os compostos da série PM.



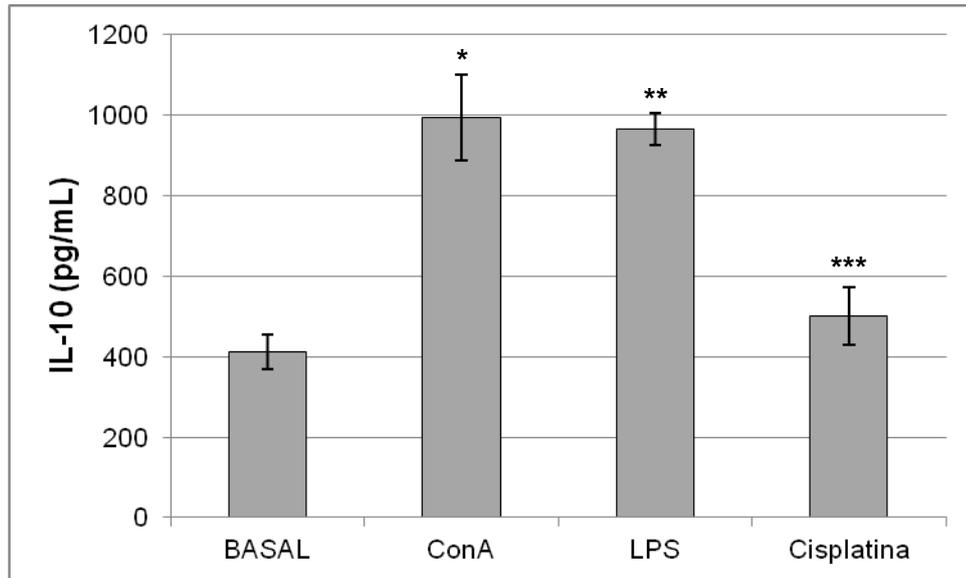
Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: (\*) corresponde a diferença significativa em relação ao basal, ANOVA seguido de teste de Dunnett's.  $p < 0.0001$ .

### 5.5.2 IL-10

Serão apresentados a seguir os gráficos referentes à produção de IL-10, no período de incubação de **24 horas**. Entre os controles, houve aumento significativo na produção de IL-10 após incubação com cisplatina, ConA e LPS quando comparados ao grupo basal (Figura 28). Não houve produção de IL-10 na presença dos compostos da série EP.

**Figura 27-** Produção de IL-10, após 24 horas de incubação, nos controles.

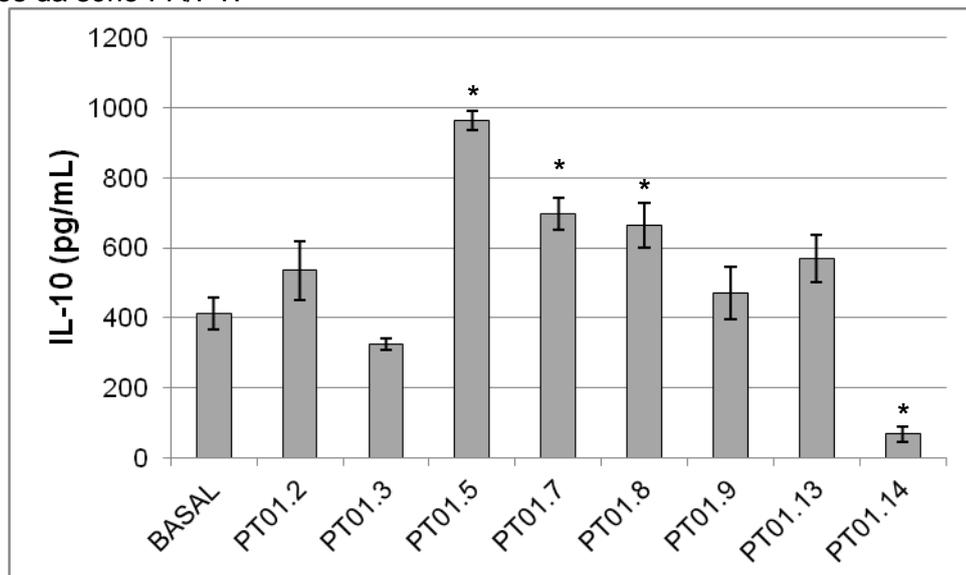


Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: (\*) corresponde à diferença significativa em relação ao basal, teste t.  $p=0.0190$ . (\*\*) corresponde à diferença significativa em relação ao basal, teste t.  $p=0.0057$ . (\*\*\*) Não houve diferença significativa em relação ao basal, teste t.  $p=0.0088$ .

Na série PA/PT, houve aumento significativo na produção de IL-10 após 24 horas de incubação com os compostos PT01.5, PT01.7 e PT01.8 quando comparados ao grupo basal (Figura 29).

**Figura 28-** Produção de IL-10, após 24 horas de incubação, no grupo tratado com os compostos da série PA/PT.

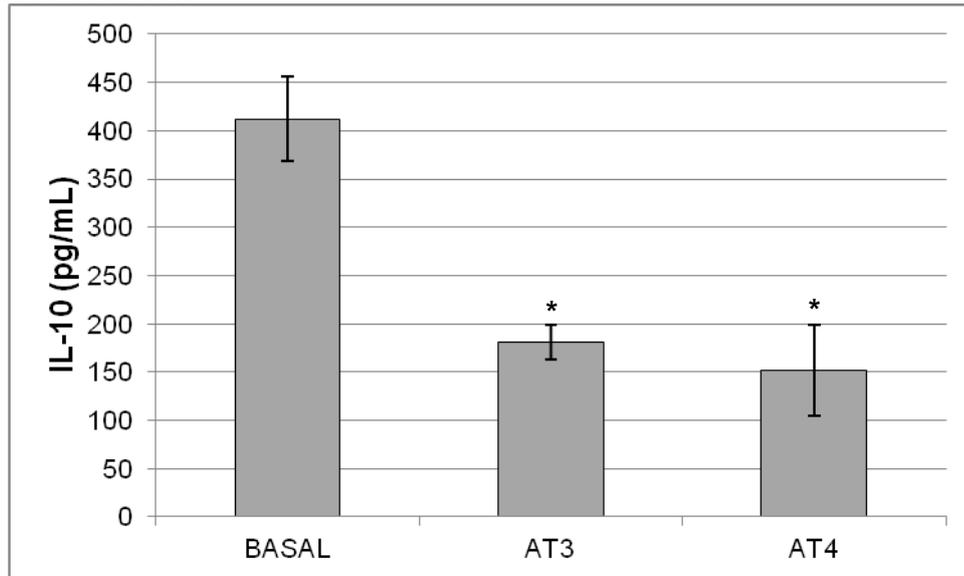


Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: (\*) corresponde à diferença significativa em relação ao basal, ANOVA seguido de teste de Dunnett's.  $p<0.0001$ .

Para a série AT, houve redução significativa na produção de IL-10 com os compostos AT3 e AT4 quando comparados ao basal (Figura 30). Já na série PM, os compostos PM06, PM07 e PM10 induziram aumento significativo na produção de IL-10 quando comparados ao grupo basal (Figura 31).

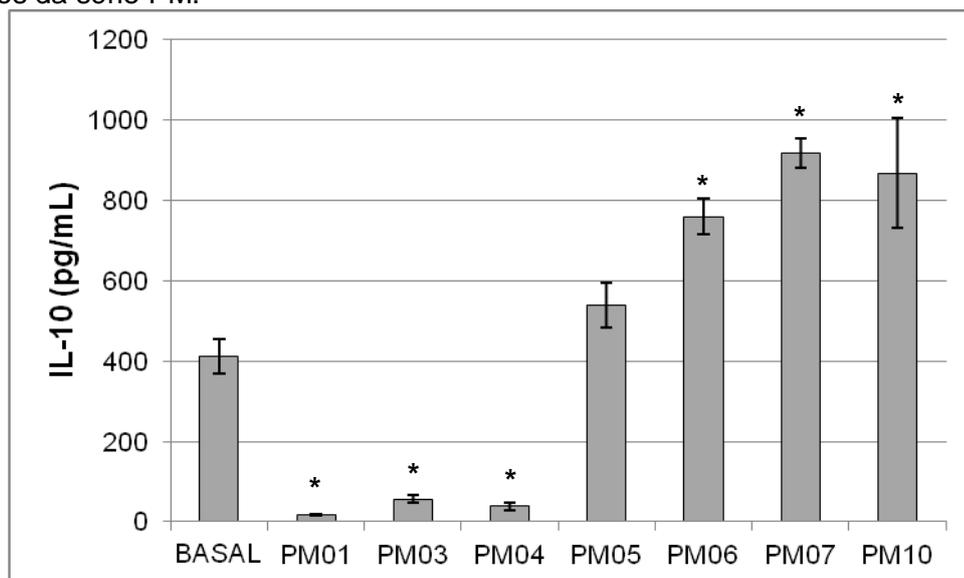
**Figura 29-** Produção de IL-10, após 24 horas de incubação, no grupo tratado com os compostos da série AT.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: (\*) corresponde à diferença significativa em relação ao basal, ANOVA seguido de teste de Dunnett's.  $p < 0.0001$ .

**Figura 30-** Produção de IL-10, após 24 horas de incubação, no grupo tratado com os compostos da série PM.

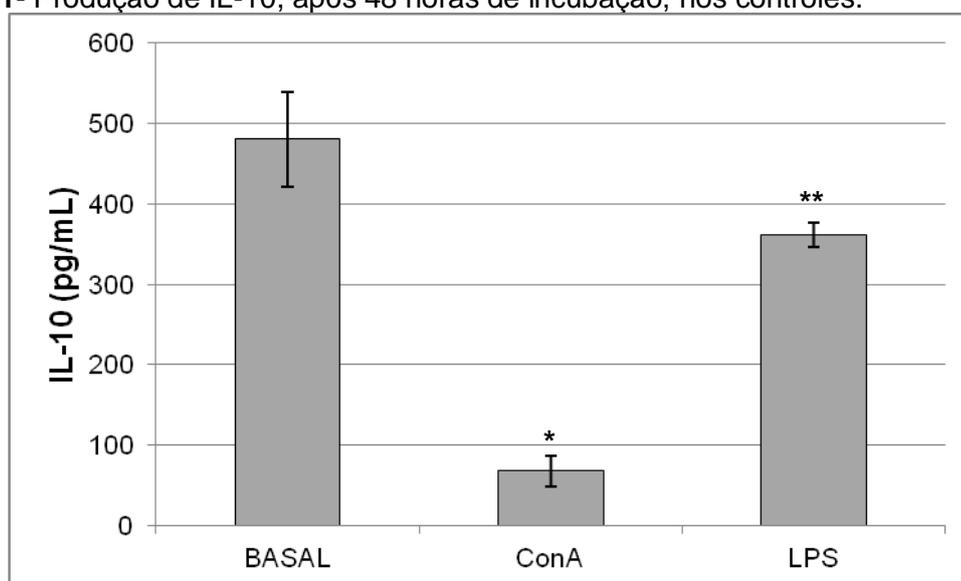


Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: (\*) corresponde à diferença significativa em relação ao basal, ANOVA seguido de teste de Dunnett's.  $p < 0.0001$ .

A seguir serão apresentados os gráficos referentes à produção de IL-10 no período de incubação de **48 horas**. Entre os controles, não foi constatado aumento significativo na produção de IL-10, havendo redução significativa após incubação com ConA (Figura 32).

**Figura 31-** Produção de IL-10, após 48 horas de incubação, nos controles.

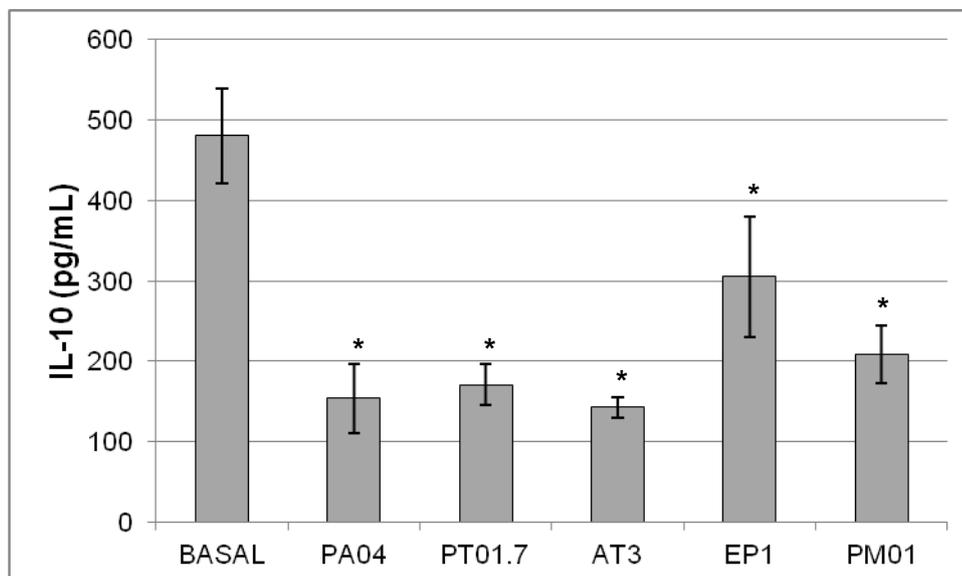


Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: (\*) corresponde à diferença significativa em relação ao basal, teste t.  $p=0.0112$ . (\*\*) Não houve diferença significativa em relação ao basal, teste t.  $p=0.1108$ .

Dentre todas as séries, apenas foi observada redução significativa na produção de IL-10 no período de 48 horas. Essa redução foi constatada após incubação com os compostos PA04, PT01.7, AT3, EP1 e PM01 (Figura 33).

**Figura 32-** Produção de IL-10, após 48 horas de incubação, para compostos de todas as séries testadas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

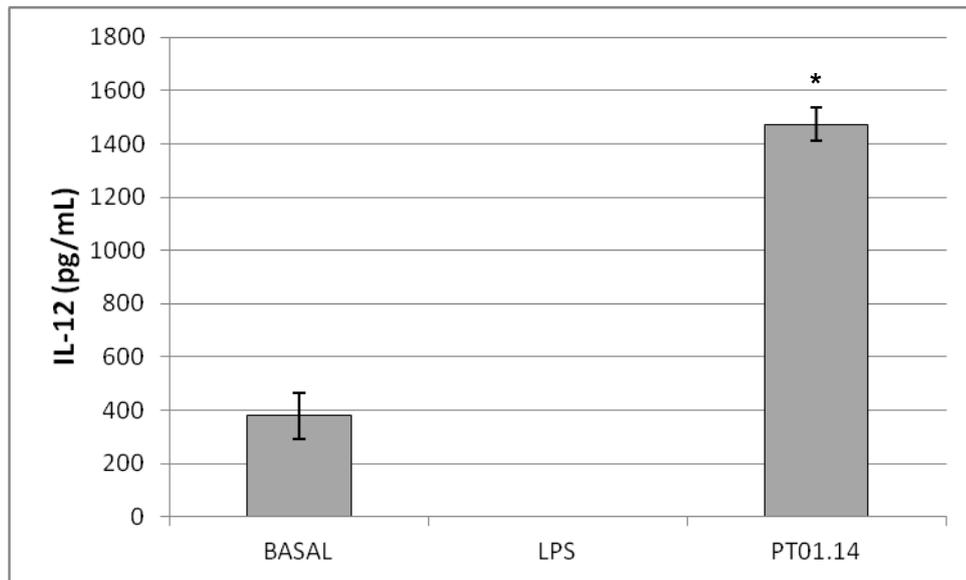
Nota: (\*) corresponde à diferença significativa em relação ao basal, ANOVA seguido de teste de Dunnett's.  $p=0.0022$ .

No período de incubação de **72 horas**, não foi detectada produção de IL-10 entre os controles. Também não foi detectada produção na presença dos compostos de todas as séries testadas.

### 5.5.3 IL-12

A produção de IL-12 não foi detectada no período de 24 horas após incubação com cisplatina e LPS. Neste mesmo período de incubação com os compostos, houve aumento significativo na produção IL-12 apenas na presença de PT01.14 quando comparado ao basal (Figura 34).

**Figura 33-** Produção de IL-12, após 24 horas de incubação.

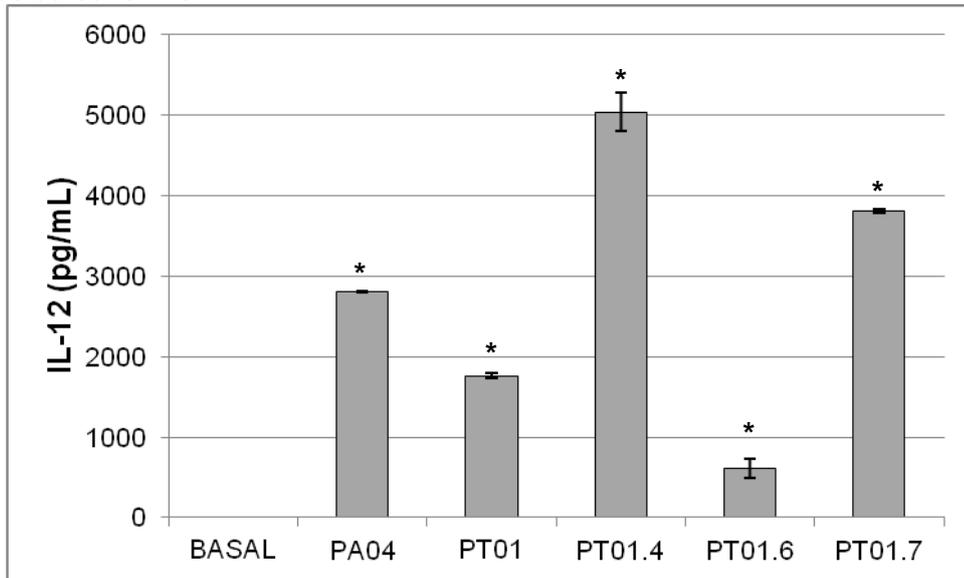


Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: (\*) corresponde à diferença significativa em relação ao basal, teste t.  $p < 0.0020$ .

Após 48 horas de incubação, não foi detectada produção de IL-12 no controle basal, nem na presença de LPS, ConA e cisplatina. Dentre as séries testadas, apenas na presença dos compostos PA04, PT01, PT01.4, PT01.6 e PT01.7, da séries PA/PT (Figura 35), e EP1 e EP2, da série EP, (Figura 36) houve aumento significativo da produção de IL-12, quando comparado ao grupo basal.

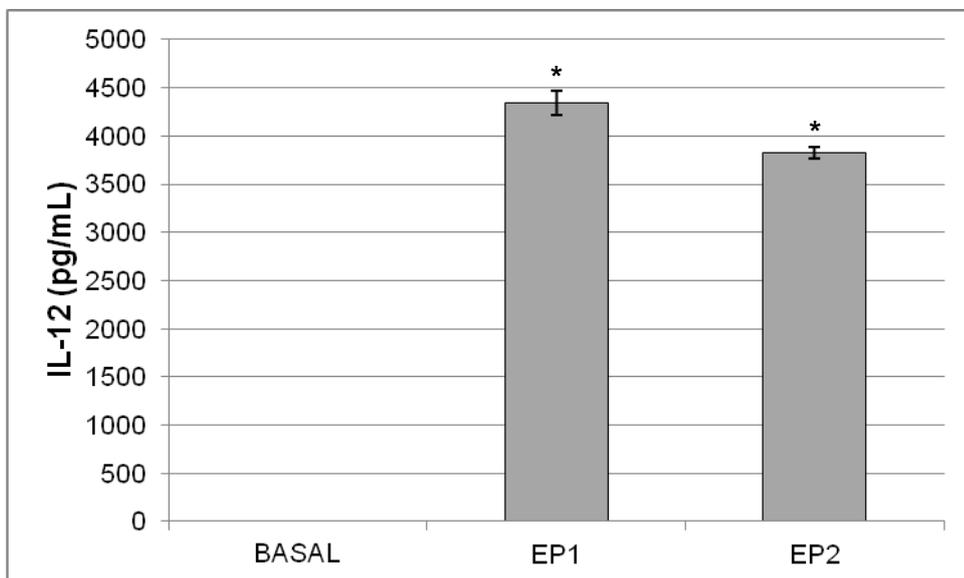
**Figura 34-** Produção de IL-12, após 48 horas de incubação, no grupo tratado com os compostos da série PA/PT.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: (\*) corresponde à diferença significativa em relação ao basal, ANOVA seguido de teste de Dunnett's.  $p < 0.0001$ .

**Figura 35-** Produção de IL-12, após 48 horas de incubação, no grupo tratado com os compostos da série EP.



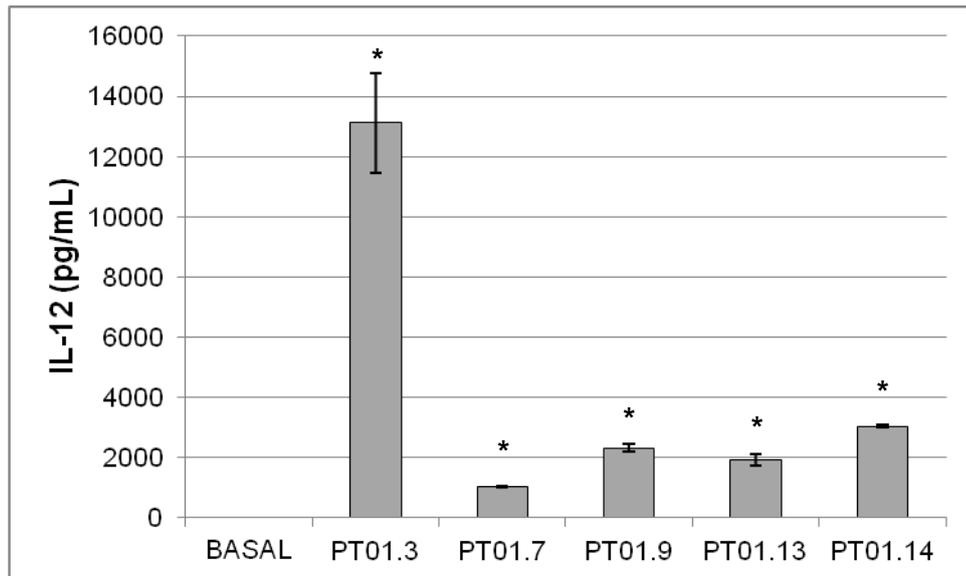
Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: (\*) corresponde à diferença significativa em relação ao basal, ANOVA seguido de teste de Dunnett's.  $p < 0.0001$ .

Quanto a IL-12, no período de incubação de **72 horas**, não foi detectada produção no grupo basal nem na presença de LPS, ConA e Cisplatina. Para a série EP também não foi detectada produção de IL-12. Da série PA/PT, apenas após

incubação com os compostos PT01.3, PT01.7, PT01.9, PT01.13 e PT01.14 foi detectado aumento significativo da produção de IL-12 quando comparado ao grupo basal (Figura 37). Dentre os compostos da série AT, apenas AT9 induziu aumento significativo da produção de IL-12, no período de incubação mencionado (Figura 38).

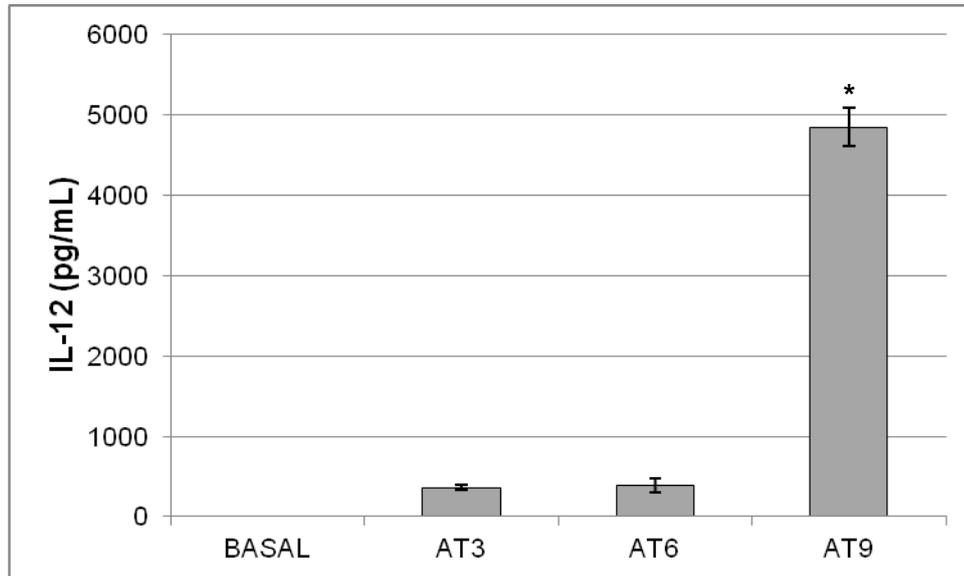
**Figura 36-** Produção de IL-12, após 72 horas de incubação, no grupo tratado com os compostos da série PA/PT.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: (\*) corresponde à diferença significativa em relação ao basal, ANOVA seguido de teste de Dunnett's.  $p < 0.0001$ .

**Figura 37-** Produção de IL-12, após 72 horas de incubação, no grupo tratado com os compostos da série AT.

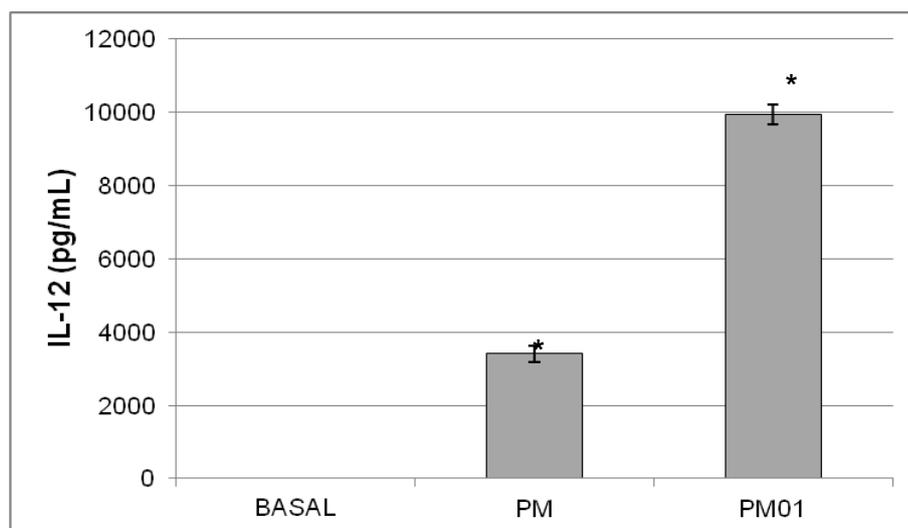


Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: (\*) corresponde à diferença significativa em relação ao basal, ANOVA seguido de teste de Dunnett's.  $p < 0.0001$ .

Para a série PM, foi detectado aumento significativo da produção de IL-12, após incubação com os compostos PM e PM01 quando comparado ao basal (Figura 39).

**Figura 38-** Produção de IL-12, após 72 horas de incubação, no grupo tratado com os compostos da série PM.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: (\*) corresponde à diferença significativa em relação ao basal, ANOVA seguido de teste de Dunnett's.  $p < 0.0001$ .

## 6 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de novas drogas para o tratamento do câncer continua um processo desafiador (LORD; ASHWORTH, 2010). O fato de o câncer ser uma doença celular implica em uma grande complexidade quando se tenta buscar agentes anticâncer eficazes (FLACHNER et al., 2012). Por se tratar de um problema heterogêneo e multifacetado, diversas abordagens têm sido desenvolvidas e testadas (STURLA *et al.*, 2007). As contribuições advindas da química medicinal constituem uma dessas abordagens.

Nesse contexto, variados grupamentos químicos tem atraído atenção por sua atividade em diversas patologias, incluindo o câncer (STURLA *et al.*, 2007). Entre eles destacamos as hidrazonas, tiazóis e ftalimidas, grupamentos presentes nas moléculas testadas no presente trabalho.

A escolha desses grupamentos para o desenvolvimento de ensaios pré-clínicos se baseou no amplo espectro de atividades biológicas relacionadas a eles, bem como nos efeitos sobre componentes do sistema imunológico, como as citocinas (PESSOA *et al.*, 2010; SINGH; RAGHAV, 2011). Neste trabalho, quatro séries de compostos, codificadas como AT, EP, PA/PT e PM, foram avaliadas quanto sua atividade frente a células tumorais, sua ação em células saudáveis e sua atividade em células do sistema imune.

Para o desenvolvimento do presente trabalho, inicialmente foi realizada uma avaliação da atividade dos compostos em estudo sobre a proliferação de esplenócitos murinos, utilizando a abordagem de marcação com timidina tritiada. Essa etapa visou observar antecipadamente a ação dos compostos sobre a proliferação de células do sistema imunológico. Espera-se que um potencial candidato a fármaco anticâncer estimule a imunidade protetora contra o tumor e a favor do hospedeiro (DOUGAN; DRANOFF, 2009). No experimento com timidina tritiada com esplenócitos murinos, espera-se que os melhores compostos apresentem altos valores de  $CC_{50}$ , indicando a necessidade de uma maior quantidade do composto para observar o efeito citotóxico em 50% das células.

Na série PA/PT, o substituinte fenil-metil em PT01.3 se demonstrou favorável, tendo em vista que esse composto apresentou o maior valor de  $CC_{50}$ . Já o composto PT01.7 apresentou o menor valor de  $CC_{50}$ , quando comparado com todos os outros compostos dessa série. Para a série EP, o maior valor de  $CC_{50}$  foi observado com o

composto EP3, que apresentou os grupamentos metil e ftalil. O menor valor de  $CC_{50}$  foi observado com o composto EP1, que tem como substituintes dois grupamentos metil. Essa modificação provocou uma grande diferença no valor de  $CC_{50}$ , que variou de 19,45 para 126,75  $\mu\text{M}$ . Para a série PM, observou-se o maior valor de  $CC_{50}$  com o composto PM08, que apresenta em sua estrutura o substituinte fluorofenil. Os compostos PM02 (substituinte metil-fenil), PM04 (substituinte nitrofenil) e PM10 (substituinte 3,4 diclorofenil) apresentaram os menores valores de  $CC_{50}$ , todos abaixo de 10  $\mu\text{M}$ , demonstrando uma maior citotoxicidade em esplenócitos murinos. O maior valor de  $CC_{50}$  na série AT foi observado no composto AT2, que apresenta o substituinte nitro ( $\text{NO}_2$ ). O menor valor de  $CC_{50}$  na série AT, por sua vez, foi observado no composto AT1.

Dando prosseguimento à avaliação dos compostos testados, foram realizados ensaios com MTT em macrófagos da linhagem J774A.1. Nesse ensaio, apenas células metabolicamente viáveis são capazes de reduzir o MTT, através de desidrogenases mitocondriais, levando à formação de cristais de formazan. A mensuração da produção desses cristais, após a diluição com solventes orgânicos como o DMSO, é então realizada.

Esses experimentos tiveram por objetivo avaliar a ação citotóxica dos compostos sob essa importante célula do sistema imune, presente no microambiente de praticamente todos os tumores sólidos (Solinas *et al.*, 2009). Sabe-se que os macrófagos podem ter um papel tanto pro tumoral como antitumoral, em decorrência de sua polarização e alta plasticidade (HEUSINKVELD; VAN DER BURG, 2011; MANTOVANI *et al.*, 2002; MARTINEZ; HELMING; GORDON, 2009). Diante dessa problemática, constitui-se uma abordagem relevante avaliar se os compostos em estudo contribuem para a citotoxicidade de macrófagos.

Os resultados com a série PA/PT mostraram que o maior valor de  $CC_{50}$  foi obtido com o composto PT01.13 (124,76  $\mu\text{M}$ ), que apresenta o substituinte 3,4 diclorofenil. Os compostos PT01.4 (substituinte metoxil) e PT01.3 (substituinte fenil-metil) apresentaram valores de  $CC_{50}$  muito próximos ao observado com PT01.13. O menor valor de  $CC_{50}$  na série PA/PT foi observado com o composto PT01.8 (6,50  $\mu\text{M}$ ) que apresenta o substituinte fluorofenil. Na série EP, o maior valor de  $CC_{50}$  foi observado com a substituição metil/H, observada no composto EP2. Os compostos EP1 e EP3, com os substituintes metil/metil e metil/ftalil, respectivamente apresentaram valores de  $CC_{50}$  próximos, em torno de 21  $\mu\text{M}$ . Na série PM, o

composto PM04, com a presença do substituinte nitrofenil em sua estrutura, apresentou o maior valor de  $CC_{50}$  da série. Os substituintes PM02 e PM03, com os substituintes metilfenil e metoxifenil respectivamente, geraram valores de  $CC_{50}$  semelhantes, em torno de 40  $\mu\text{M}$ . Para a série de compostos AT, o maior valor de  $CC_{50}$  foi observado com o composto AT2, apresentando o substituinte  $\text{NO}_2$ . Os compostos AT6 e AT1, com os substituintes Br e H respectivamente, apresentaram valores de  $CC_{50}$  próximos (33,59 e 30,52  $\mu\text{M}$  respectivamente).

Para avaliação inicial do efeito anticâncer dos compostos em estudo, foram realizados ensaios de MTT com quatro linhagens tumorais. A ação citotóxica dos compostos em estudo sobre tais células foi avaliada após um período de incubação de 72 horas, utilizando diferentes linhagens tumorais. Duas foram linhagens leucêmicas, sendo uma de leucemia mieloide crônica (K562) e outra de leucemia de células T (Jurkat). Utilizou-se, também, a linhagem de adenocarcinoma de cólon humano HT-29 e a linhagem de melanoma murino B16F10. O propósito na escolha dessas linhagens foi a utilização de células de tumores frequentemente incidentes, de órgãos-fonte distintos e em diferentes estágios de progressão tumoral.

Com a linhagem HT-29 o teste com a série de compostos PA/PT revelou como melhor composto a molécula PT01.14, que apresentou o menor valor de  $CC_{50}$  da série. Esta molécula apresenta o substituinte 2,4-diclorofenil. A PA04 apresentou o maior valor de  $CC_{50}$  da série. Para os compostos da série EP, o melhor resultado foi observado com o composto EP2 (17,18  $\mu\text{M}$ ), com os substituintes H e  $\text{CH}_3$  em sua estrutura. A substituição  $\text{CH}_3/\text{CH}_3$ , presente em EP1, elevou a  $CC_{50}$  para 83,09  $\mu\text{M}$ . Para a série PM, o composto PM apresentou o menor valor de  $CC_{50}$  (13,44  $\mu\text{M}$ ). A substituição por fluorofenil no composto PM08 elevou substancialmente a  $CC_{50}$  (129,71  $\mu\text{M}$ ). Na série AT, o composto AT9, com a presença de Flúor em sua estrutura, revelou a menor  $CC_{50}$  (25,22  $\mu\text{M}$ ).

Para linhagem B16F10, com a série PA/PT, em oposto ao observado com a linhagem HT-29, o composto PA04 apresentou o menor valor de  $CC_{50}$  (18,64  $\mu\text{M}$ ), e PT01.14 por sua vez, apresentou o maior valor de  $CC_{50}$  (131,44  $\mu\text{M}$ ). Para a série EP, o composto EP3, em concordância com o resultado observado na linhagem HT-29, apresentou o menor valor de  $CC_{50}$  (14,16  $\mu\text{M}$ ). Na série PM, o composto PM08, com o substituinte fenil em sua estrutura, apresentou o menor valor de  $CC_{50}$  (34,94  $\mu\text{M}$ ). Para a série AT, o composto AT2 (substituinte Fluor) apresentou o menor valor de  $CC_{50}$  (18,55  $\mu\text{M}$ ).

Com a linhagem Jurkat, os menores valores de  $CC_{50}$  foram observados com os compostos PT01.6, que possui nitrofenil como substituinte e valor de  $CC_{50}$  de 2,79  $\mu\text{M}$ , EP1 com a presença de  $\text{CH}_3/\text{CH}_3$  e valor de  $CC_{50}$  de 14,91  $\mu\text{M}$ , PM08 com possui fluorofenil em sua estrutura e valor de  $CC_{50}$  de 8,54  $\mu\text{M}$  e AT1, que possui hidrogênio como substituinte e valor de  $CC_{50}$  de 16,23  $\mu\text{M}$ .

Os compostos mais ativos frente à linhagem K562 foram: EP3 que possui ftali como substituinte valor de  $CC_{50}$  de 10,58  $\mu\text{M}$ , PT01.9 (40,26  $\mu\text{M}$ ) e PM06 (4,10  $\mu\text{M}$ ) que possuem em comum a substituição por clorofenil em suas estruturas e AT6 que possui substituição por bromo e valor de  $CC_{50}$  de 51,99  $\mu\text{M}$ .

Uma vez observada a atividade dos compostos sobre as linhagens tumorais, foram selecionadas as linhagens HT-29 e Jurkat para avaliação da forma de morte celular induzida após incubação com alguns compostos, selecionados com base nos ensaios anteriores. Para tal, foi empregada citometria de fluxo, utilizando os marcadores Anexina V-FITC e PI. A indução de apoptose e necrose pôde, então, ser quantificada para cada composto.

A Anexina V é uma proteína que se liga a fosfolipídeos e possui alta afinidade por fosfatidilserina (PS) na presença de íons de cálcio. PS é predominantemente observada na superfície interna da bicamada lipídica, voltada para o citosol. Nas células no início da apoptose, onde a membrana celular ainda permanece intacta mas sofre uma desorganização, a PS é translocada para a superfície exterior da bicamada (DE BRUIN; MEDEMA, 2008). O aparecimento de PS na superfície celular é reconhecido pelos fagócitos, que captam este sinal e removem a célula que sinalizou seu “suicídio” ao ambiente. Mudanças nesta assimetria da membrana, que é analisada através da medição da aderência de Anexina V à membrana celular, podem ser detectadas antes das alterações morfológicas associadas ao início da apoptose e antes da perda da integridade da membrana. Ao conjugar a Anexina V ao FITC (Isotiocianato de fluoresceína) é possível identificar e quantificar as células apoptóticas por citometria de fluxo.

O PI é um marcador nuclear fluorescente que se intercala a ácidos nucleicos. Isso ocorre apenas quando a permeabilidade da membrana plasmática está alterada, permitindo sua entrada na célula.

A morte celular nos tumores pode ser induzida por uma variedade de desencadeadores distintos, incluindo hipóxia, redução de nutrientes, ausência de fatores de crescimento essenciais e tratamentos anticâncer. Durante o tratamento

com agentes tumorais, as células neoplásicas podem passar por mecanismos de morte celular distintos, dependendo do estímulo letal gerado (KEPP *et al.*, 2009). A imunogenicidade da morte celular tumoral depende amplamente desse estímulo inicial e não simplesmente do tipo de morte desencadeado. A imunogenicidade se dá através da exposição de fatores imunogênicos na superfície celular ou pela liberação de sinais imunogênicos no espaço extracelular (KEPP *et al.*, 2009; ZITVOGEL *et al.*, 2008).

A apoptose é um tipo de morte celular fortemente regulado, que pode ser iniciado por dois diferentes tipos de sinal: sinais de estresse intracelulares e ligantes extracelulares (BRUIN, DE; MEDEMA, 2008). Este tipo de morte celular é caracterizado morfológicamente por encolhimento celular, picnose nuclear, e eventualmente fragmentação em corpos apoptóticos (AMARAVADI; THOMPSON, 2007; KERR *et al.*, 1972). A inativação da apoptose é um evento central para o desenvolvimento do câncer e tratamentos que explorem o seu desencadeamento por células tumorais são importantes, uma vez que a sua reativação pode apresentar consequências benéficas ao paciente (KASIBHATLA *et al.*, 2003).

Diferentemente da apoptose, a necrose tem sido considerada como uma forma de morte celular descontrolada. Morfológicamente, é caracterizada por vacuolização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e tumefação celular (BRUIN, DE; MEDEMA, 2008).

A apoptose constitui apenas uma forma de morte celular. As células tumorais devem ser eliminadas por uma série de mecanismos alternativos, incluindo necrose (KASIBHATLA *et al.*, 2003). Entender os processos que contribuem para a morte ou sobrevivência celular é crítico para reduzir a mortalidade e a morbidade associadas ao câncer (AMARAVADI, THOMPSON, 2007).

A indução de morte celular por necrose/apoptose pelos compostos em estudo foi avaliada. Duas das linhagens tumorais em estudo nesse trabalho, HT-29 e Jurkat, foram utilizadas.

Com a linhagem HT-29, foram obtidos resultados diferentes com as diferentes séries de compostos testados. Com a série AT, foi observado aumento significativo na marcação para morte por apoptose em todos os compostos da série. Também foi observado aumento significativo de células com marcação para necrose nos compostos AT2, AT3, AT4, AT6 e AT9. Com os compostos PM01 e PM05 foi observado aumento significativo da população celular marcada para necrose e

aumento significativo para marcação de apoptose apenas no composto PM05. Esses resultados sugerem que essas duas séries de compostos apresentam mecanismos de ação distintos, com maior de indução de apoptose para a série AT e com maior indução de necrose para a série PM. Os compostos da série AT se mostraram mais promissores nesses ensaios, uma vez que as diferentes substituições nos compostos da série geraram resultados satisfatórios, dentro das condições experimentais aplicadas.

Com a linhagem Jurkat, os compostos AT1, AT2, AT3, AT4 e AT6 demonstraram alta indução de necrose, com valores acima de 50%. Os compostos PA04 e EP2 também apresentaram indução de necrose nas células Jurkat, com destaque para o composto EP2, com valor acima de 90%.

A série de compostos AT apresentou bons resultados, induzindo fortemente necrose nas células Jurkat, e também induzindo apoptose na linhagem HT-29. Estudos identificando o mecanismo de ação podem ser úteis no entendimento de como algumas dessas moléculas podem causar tanto apoptose quanto necrose. De fato, o desencadeamento desses dois tipos de morte celular pode ter efeitos benéficos na clínica (DE BRUIN ; MEDEMA, 2008), e esses resultados endossam a necessidade de estudos mais aprofundados *in vitro* e *in vivo*, buscando identificar o mecanismo de ação dessa série de compostos.

Com o objetivo de verificar a atividade dos compostos sobre a produção de citocinas por macrófagos, foram utilizadas células da linhagem J774A.1. Foram verificadas, por ELISA, a produção das citocinas TNF, IL-10 e IL-12; durante os tempos de incubação de 24, 48 e 72 horas. A presença de citocinas é um componente relevante no microambiente tumoral e, muitas vezes, mais importante que o próprio conteúdo celular. O tipo e a quantidade de citocinas produzidas nesse microambiente podem ser decisivos no desenvolvimento e progressão tumoral (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010).

De maneira geral, dois estados de polarização diferentes são reconhecidos, os macrófagos classicamente ativados (tipo 1 ou M1) e macrófagos alternativamente ativados (tipo 2 ou M2) (HEUSINKVELD; VAN DER BURG, 2011). A expressão de iNOS, ROS e a produção da citocina IL-12 são características importantes dos macrófagos M1 (SOLINAS *et al.*, 2009). Por sua vez, os macrófagos M2 apresentam alta expressão de receptor scavenger, e estão associados com alta produção de IL-10, IL-1 $\beta$ , VEGF (Fator de crescimento vascular endotelial) e metaloproteinases de

matriz (HEUSINKVELD; VAN DER BURG, 2011). Os macrófagos apresentam notável plasticidade e podem se adaptar a uma infinidade de estágios de ativação, variando entre o fenótipo M1 ou M2 na dependência dos diferentes sinais no seu microambiente (HEUSINKVELD; VAN DER BURG, 2011). Macrófagos podem ser identificados pela expressão de fatores de transcrição, marcadores de superfície celular, pela produção de citocinas e pela sua função *in vitro*. Estudos *in vitro* se concentram principalmente na produção de IL-12 e IL-10 para discriminar entre subpopulações M1 e M2 (HEUSINKVELD; VAN DER BURG, 2011; MURRAY; WYNN, 2011).

Durante a experimentação com macrófagos J774A.1 foi observada produção de IL-10 (24 e 48 h) no estado basal. Já para a citocina IL-12, observou-se produção apenas no tempo de 24 h, não sendo detectada produção nos períodos de 48 e 72 h. Pode-se atribuir esse comportamento ao papel da IL-10 na inibição da produção de IL-12. Além disso, em ensaios para a detecção de NO (dados não mostrados), também utilizando macrófagos J774A.1 sem qualquer tratamento com as moléculas em estudo, não foi detectada produção de NO. Essa característica nos leva a acreditar na tendência a polarização M2 dos macrófagos J774A.1 sob as condições experimentais utilizadas. Sabe-se que em estado estacionário, os macrófagos teciduais apresentam funções anti-inflamatórias intrínsecas (MURRAY; WYNN, 2011).

Após o tratamento com LPS, um fator desencadeador da polarização M1, não foi observada produção de IL-12 em nenhum período de tempo avaliado. Isso constituiria um contrassenso, visto que o LPS deveria induzir a polarização M1, elevando a produção de IL-12 (MANTOVANI *et al.*, 2009). A ausência de detecção de IL-12, após o estímulo com LPS, pode ser explicada pela concentração de LPS utilizada nos ensaios. Inicialmente foi utilizada uma concentração de 50 ng/mL. Novos experimentos estão sendo realizados, utilizando concentrações maiores de LPS para o estímulo.

A interleucina 10 (IL-10) exerce sua resposta imune através de sua ação inibitória sobre macrófagos e células dendríticas. A IL-10 inibe a produção de IL-12 por macrófagos ativados e células dendríticas, além de diminuir a expressão de MHC de classe II por essas células (LEE; MARGOLIN, 2011).

Dentre os compostos utilizados, foi observado que alguns deles diminuiriam a produção de IL-10, enquanto outros causaram aumento na produção quando

comparado à população basal. A redução da IL-10 pode ser considerada um fenômeno benéfico no tratamento do câncer, principalmente quando ocorre no microambiente tumoral, pois diversas ações pro tumorais tem sido associadas a essa citocina (ITAKURA *et al.*, 2011; ZENG *et al.*, 2010). Após incubação por 24 horas, foi observada redução na produção de IL-10 na presença dos compostos AT3 e AT4, que possuem como substituintes metoxil e cloro, respectivamente. Também foi observada essa redução para os compostos PM01, PM03 e PM04, que possuem como substituintes fenil, metoxifenil e nitrofenil, respectivamente. No período de 48 horas, foi observada redução na produção de IL-10, com os compostos PA04, PT01.7 (Nitrofenil), AT3 (Metoxil), EP1 (Metil), PM01 (Fenil).

A interleucina IL-12 tem sido estudada como uma citocina terapêutica para o câncer em variados estudos pré-clínicos e em uma variedade de situações clínicas (LEE; MARGOLIN, 2011). É desejável que novas abordagens no tratamento do câncer induzam células presentes no microambiente tumoral, principalmente os macrófagos, a produzirem a citocina IL-12, tendo em vista sua influência na estimulação de diferentes células efetoras do sistema imunológico (LEE; MARGOLIN, 2011). Após incubação por 24 horas, observou-se aumento na produção de IL-12 na presença do composto PT01.14, que apresenta a substituição metoxifenil em sua estrutura.

No período de incubação de 48 horas, entre os compostos da série PA/PT, os compostos PA04, PT01, PT01.4 (Metoxil), PT01.6 (Nitrofenil) e PT01.7 (Nitrofenil) induziram aumento na produção de IL-12. Entre os compostos da série EP, foi visualizado o mesmo efeito com os compostos EP1 e EP2 que possuem metil e ftalil em suas estruturas.

No período de 72 horas, entre os compostos da série PA/PT, as moléculas PT01.3 (Fenil-metil), PT01.7 (Nitrofenil), PT01.9 (4-Clorofenil), PT01.13 (3,4 diclorofenil), PT01.14 (2,4 diclorofenil) induziram aumento significativo na produção de IL-12. Na série AT, o composto AT9, que contém flúor, induziu aumento significativo na produção de IL-12. Finalmente, para a série PM, o composto PM01 (Fenil) se mostrou eficiente na indução da produção de IL-12. Dentre todas as moléculas, de todas as séries avaliadas, os compostos PT01.3 e PM01 se destacaram na indução da produção de IL-12, com valores acima de 10000 pg/mL, nesse período de incubação.

De maneira geral, os compostos testados aumentaram a produção de IL-12 em todos os tempos avaliados. Entretanto, estes resultados precisam ser confirmados em estudos *in vivo*, utilizando modelos tumorais experimentais.

Historicamente o TNF foi a primeira citocina a ser usada no tratamento do câncer (BERTAZZA; MOCELLIN, 2010). Fora do contexto do câncer, o TNF foi identificado como um dos principais reguladores da inflamação e uma peça chave na rede de citocinas (BALKWILL, 2009). Esta citocina apresenta um papel dicotômico na biologia do câncer, podendo apresentar um papel pro ou antitumoral, em diferentes contextos (BERTAZZA; MOCELLIN, 2010; GRIVENNIKOV; KARIN, 2011).

Diversas células malignas constitutivamente produzem pequenas quantidades de TNF (BALKWILL, 2009). Esta citocina pró-inflamatória é um importante fator envolvido na iniciação, proliferação, angiogênese e metástase de vários tipos de câncer (LIN; KARIN, 2007). O papel desempenhado pelo TNF no desenvolvimento e progressão tumorais pode parecer sombrear o potencial anticâncer dessa citocina (BERTAZZA; MOCELLIN, 2010). Definir o papel do TNF na terapia anticâncer ainda constitui-se uma tarefa desafiadora, devido a sua natureza pleiotrópica, que pode estimular múltiplas rotas complexas e interconectadas, frequentemente envolvidas em fenômenos opostos (BERTAZZA; MOCELLIN, 2010).

De maneira geral, os compostos avaliados no presente trabalho induziram aumento na produção de TNF. A produção de TNF só foi verificada a partir do tempo de incubação de 48 horas. Neste período de incubação, as moléculas PA04 e PT01 foram as que induziram maior produção de TNF, com quantidades em torno de 6000 pg/mL. No tempo de 72 horas, por outro lado, foi detectada uma indução menos intensa da produção de TNF por esses compostos. Os compostos da série AT se mostraram bons imunomoduladores sobre a produção de TNF, induzindo aumento significativo desta citocina após 48 h (todos os compostos) e 72 h (AT1, AT 6 e AT9), quando comparados ao grupo basal.

Se com ação pro ou antitumoral, não há dúvidas que o TNF é importante na biologia e no tratamento do câncer (BALKWILL, 2009). Os resultados obtidos indicam que tais compostos apresentam boa atividade como imunomoduladores diretos sobre a linhagem macrofágica em questão.

Entender os mecanismos pelos quais um contexto imune favorável pode ser criado e mantido é essencial para guiar terapias inovadoras (FRIDMAN et al., 2012). Novas abordagens no tratamento do câncer devem considerar, e tirar vantagem de

mecanismos que interfiram nos macrófagos M2 em diferentes níveis, como na atração, diferenciação e ativação dessas células (HEUSINKVELD; VAN DER BURG, 2011).

Dessa maneira, diversos compostos das séries PA/PT. AT, PM e EP merecem ser mais bem investigados, uma vez que foi observado, para vários deles, baixo efeito citotóxico sobre células saudáveis, ação citotóxica contra células tumorais, além da indução de necrose/apoptose. Os resultados obtidos mostram que tais compostos podem representar bons protótipos para o desenvolvimento de novos agentes farmacológicos. Como perspectivas, necessita-se de maior elucidação quanto a seu modo de ação e seus efeitos em modelos *in vivo*.

## 7 CONCLUSÕES

- Os compostos avaliados, especialmente os compostos PT01.3 e PT01.4, apresentaram baixa citotoxicidade sobre esplenócitos e macrófagos;
- Para a linhagem HT-29 os compostos PM, EP2, PT01.14 e AT9 apresentaram maior efeito citotóxico, com menores valores de  $CC_{50}$ , sendo o composto PM o mais efetivo;
- Os compostos EP3, PA04, AT2 e PM08 apresentaram os menores valores de  $CC_{50}$  sobre a linhagem tumoral B16F10;
- Para a linhagem tumoral Jurkat, os compostos PT01.6, PM08, EP1 e AT1 apresentaram os menores valores de  $CC_{50}$ , sendo o composto PT01.6 o mais efetivo;
- Os ensaios com a linhagem K562 revelaram os compostos PM06, EP3, PT01.9 e AT6 com os menores valores de  $CC_{50}$  para cada série, sendo o composto PM06 o que apresentou a menor  $CC_{50}$  entre todos os compostos;
- Os compostos da série AT apresentaram alta indução de necrose nas células da linhagem tumoral Jurkat e indução de necrose e apoptose nas células da linhagem tumoral HT-29;
- Os compostos PA04, PT01, PT01.14, EP1 e PM01 induziram diminuição da produção de IL-10, aumento na produção de IL-12 e de TNF, demonstrando que além de possuírem atividade anticâncer direta podem influenciar na modulação da resposta imune.

## REFERÊNCIAS

AMARAVADI, R. K.; THOMPSON, C. B. The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 13, n. 24, p. 7271–9, 15 dez. 2007.

ASSIS, S. P. D. O. *et al.* Synthesis and anti-inflammatory activity of new alkyl-substituted phthalimide 1H-1,2,3-triazole derivatives. **TheScientificWorldJournal**, v. 2012, p. 925925, jan. 2012.

BALA, S. *et al.* Bioactivity-therapeutic Potential in Present Scenario. v. 18, n. 1, p. 65–74, 2013.

BALKWILL, F. Tumour necrosis factor and cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, n. 5, p. 361–71, maio 2009.

BERTAZZA, L.; MOCELLIN, S. The dual role of tumor necrosis factor (TNF) in cancer biology. **Current medicinal chemistry**, v. 17, n. 29, p. 3337–3352, jan. 2010.

BRUIN, E. C. DE; MEDEMA, J. P. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. **Cancer treatment reviews**, v. 34, n. 8, p. 737–49, dez. 2008.

COLLINS, I.; WORKMAN, P. New approaches to molecular cancer therapeutics. **Nature chemical biology**, v. 2, n. 12, p. 689–700, dez. 2006.

COTTER, T. G. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, n. 7, p. 501–7, jul. 2009.

DOUGAN, M.; DRANOFF, G. Immune therapy for cancer. **Annual review of immunology**, v. 27, p. 83–117, jan. 2009.

DRANITSARIS, G. *et al.* Advances in cancer therapeutics and patient access to new drugs. **PharmacoEconomics**, v. 29, n. 3, p. 213–24, mar. 2011.

DRANOFF, G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. **Nature reviews. Cancer**, v. 4, n. 1, p. 11–22, jan. 2004.

FERLAY, J. *et al.* GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. **International Agency for Research on Cancer**, v. 1.0, n. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet], 2013.

FRIDMAN, W. H. *et al.* The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. **Nature reviews. Cancer**, v. 12, n. 4, p. 298–306, abr. 2012.

GERMANO, G.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Cytokines as a key component of cancer-related inflammation. **Cytokine**, v. 43, n. 3, p. 374–9, set. 2008.

GHORAB, M. M.; AL-SAID, M. S. Antitumor activity of novel pyridine, thiophene and thiazole derivatives. **Archives of pharmacal research**, v. 35, n. 6, p. 965–73, jun. 2012.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883–99, 19 mar. 2010.

GRIVENNIKOV, S. I.; KARIN, M. Inflammatory cytokines in cancer: tumour necrosis factor and interleukin 6 take the stage. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 70 Suppl 1, p. i104–8, mar. 2011.

HAMBLEY, T. W. Is anticancer drug development heading in the right direction? **Cancer research**, v. 69, n. 4, p. 1259–62, fev. 2009.

HANAHAN, D.; COUSSENS, L. M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. **Cancer cell**, v. 21, n. 3, p. 309–22, 20 mar. 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, mar. 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, p. 57–70, 2000.

HASHIMOTO, Y. Thalidomide as a multi-template for development of biologically active compounds. **Archiv der Pharmazie**, v. 341, n. 9, p. 536–47, set. 2008.

HEUSINKVELD, M.; BURG, S. H. VAN DER. Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. **Journal of translational medicine**, v. 9, n. 1, p. 216, jan. 2011.

ITAKURA, E. *et al.* IL-10 expression by primary tumor cells correlates with melanoma progression from radial to vertical growth phase and development of metastatic competence. **Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 24, n. 6, p. 801–9, jun. 2011.

KAMB, A.; WEE, S.; LENGAUER, C. Why is cancer drug discovery so difficult? **NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY**, v. 6, n. February, p. 115–120, 2007.

KASHYAP, S. J. *et al.* Thiazoles: having diverse biological activities. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, n. 8, p. 2123–2132, 28 jun. 2011.

KASIBHATLA, S.; TSENG, B. Why Target Apoptosis in Cancer Treatment? Minireview Why Target Apoptosis in Cancer Treatment ? p. 573–580, 2003.

KEPP, O. *et al.* Immunogenic cell death modalities and their impact on cancer treatment. **Apoptosis: an international journal on programmed cell death**, v. 14, n. 4, p. 364–75, abr. 2009.

LEE, S.; MARGOLIN, K. Cytokines in Cancer Immunotherapy. **Cancers**, v. 3, n. 4, p. 3856–3893, 13 out. 2011.

LESTERHUIS, W. J.; HAANEN, J. B. A G.; PUNT, C. J. A. Cancer immunotherapy - revisited. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 10, n. 8, p. 591–600, jan. 2011.

LIMA LEITE, A. C. *et al.* Synthesis of aminoacyl thiaolidones as potential antitumour agents. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomédecine & pharmacothérapie**, v. 60, n. 3, p. 121–6, abr. 2006.

LIN, W.; KARIN, M. A cytokine-mediated link between innate immunity , inflammation , and cancer. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 5, p. 1175–1183, 2007.

LORD, C. J.; ASHWORTH, A. Biology-driven cancer drug development: back to the future. **BMC biology**, v. 8, p. 38, jan. 2010.

LUO, J.; SOLIMINI, N. L.; ELLEDGE, S. J. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. **Cell**, v. 136, n. 5, p. 823–37, mar. 2009.

MANTOVANI, A. *et al.* Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends in immunology**, v. 23, n. 11, p. 549–55, nov. 2002.

\_\_\_\_. Tumor-associated macrophages and the related myeloid-derived suppressor cells as a paradigm of the diversity of macrophage activation. **Human immunology**, v. 70, n. 5, p. 325–30, maio 2009.

MANTOVANI, A.; SICA, A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. **Current opinion in immunology**, v. 22, n. 2, p. 231–7, abr. 2010.

MARTINEZ, F. O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective. **Annual Review of Immunology**, 2009.

MELCHERT, M.; LIST, A. The thalidomide saga. **International Journal of Biochemistry**, v. 39, p. 1489–1499, 2007.

MÉNARD, C. *et al.* Cancer chemotherapy: not only a direct cytotoxic effect, but also an adjuvant for antitumor immunity. **Cancer immunology, immunotherapy : CII**, v. 57, n. 11, p. 1579–87, nov. 2008.

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 11, p. 723–37, nov. 2011.

PABLA, N.; DONG, Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. **Kidney international**, v. 73, n. 9, p. 994–1007, maio 2008.

PESSOA, C. *et al.* Discovery of Phthalimides as Immunomodulatory and Antitumor Drug Prototypes. p. 523 – 528, 2010.

PRITCHARD, K. I. Endocrine therapy: is the first generation of targeted drugs the last? **Journal of internal medicine**, v. 274, n. 2, p. 144–52, ago. 2013.

REICHERT, J. M.; WENGER, J. B. Development trends for new cancer therapeutics and vaccines. **Drug discovery today**, v. 13, n. 1-2, p. 30–7, jan. 2008.

ROLLAS, S.; KÜÇÜKGÜZEL, S. G. Biological activities of hydrazone derivatives. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 8, p. 1910–39, jan. 2007.

SAWYERS, C. Targeted cancer therapy. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 294–7, 18 nov. 2004.

SCHADE, A. E. *et al.* Dasatinib, a small-molecule protein tyrosine kinase inhibitor, inhibits T-cell activation and proliferation. **Blood**, v. 111, n. 3, p. 1366–77, 1 fev. 2008.

SHARMA, U. *et al.* Recent advances in the chemistry of phthalimide analogues and their therapeutic potential. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 10, n. 8, p. 678–704, jul. 2010a.

\_\_\_\_\_. Recent advances in the chemistry of phthalimide analogues and their therapeutic potential. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 10, n. 8, p. 678–704, jul. 2010b.

SICA, A.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Cancer related inflammation: the macrophage connection. **Cancer letters**, v. 267, n. 2, p. 204–15, 28 ago. 2008.

SINGH, M.; RAGHAV, N. BIOLOGICAL ACTIVITIES OF HYDRAZONES: A REVIEW. v. 3, n. 4, 2011.

SOLINAS, G. *et al.* Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. **Journal of leukocyte biology**, v. 86, n. 5, p. 1065–73, nov. 2009.

SOUZA, C. M. DE *et al.* Thalidomide attenuates mammary cancer associated-inflammation, angiogenesis and tumor growth in mice. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomédecine & pharmacothérapie**, v. 66, n. 7, p. 491–8, out. 2012.

STRASSER, A.; CORY, S.; ADAMS, J. M. Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. **The EMBO journal**, v. 30, n. 18, p. 3667–3683, 23 ago. 2011.

STURLA, S. J. *et al.* Chemistry in cancer research: a vital partnership. **Cancer research**, v. 67, n. 14, p. 6539–43, 15 jul. 2007.

SWARTZ, M. A *et al.* Tumor microenvironment complexity: emerging roles in cancer therapy. **Cancer research**, v. 72, n. 10, p. 2473–80, 15 maio 2012.

TAN, T.-T.; COUSSENS, L. M. Humoral immunity, inflammation and cancer. **Current opinion in immunology**, v. 19, n. 2, p. 209–16, abr. 2007.

WORKMAN, P. Genomics and the second golden era of cancer drug development. **Molecular BioSystems**, v. 1, n. 1, p. 17, 2005.

ZENG, L. *et al.* IL-10 promotes resistance to apoptosis and metastatic potential in lung tumor cell lines. **Cytokine**, v. 49, n. 3, p. 294–302, mar. 2010.

ZHENG, S. *et al.* Discovery of a Series of Thiazole Derivatives as Novel Inhibitors of Metastatic Cancer Cell Migration and Invasion. **ACS medicinal chemistry letters**, v. 4, n. 2, p. 191–196, 14 fev. 2013a.

\_\_\_\_\_. Discovery of a Series of Thiazole Derivatives as Novel Inhibitors of Metastatic Cancer Cell Migration and Invasion. **ACS medicinal chemistry letters**, v. 4, n. 2, p. 191–196, 14 fev. 2013b.

ZITVOGEL, L. *et al.* Immunological aspects of cancer chemotherapy. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, n. 1, p. 59–73, jan. 2008.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, Cidade, v. 26, p. 239-257, 1972.

INCA. Estimativa 2012 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância, 118 p. Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2012>.

INCA. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Educação ; organização Luiz Claudio Santos Thuler. – 2. ed. rev. e atual, 129 p.– Rio de Janeiro : Inca, 2012.

SHARMA, U. *et al.* Recent advances in the chemistry of phthalimide analogues and their therapeutic potential. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, 2010, 10, 678-704.

SUVARAPU *et al.* Review on Analytical and Biological applications of Hydrazones and their Metal Complexes. **E-Journal of Chemistry**, 2012, 9(3), 1288-1304.

FLACHNER *et al.* A chemocentric approach to the identification of cancer targets. **PloS one**, 2012, v.7, n.4, e35582.

OMS. Cancer [NMH fact sheet], Geneva, 2013. Disponível em: < [http:// www.who.int/mediacentre / factsheets/fs297/en />. Acesso em: 03 out 2013.](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/)

**ANEXO A - MANUSCRITO EM REDAÇÃO**

A ser submetido a revista Journal of Medicinal Chemistry.

# Immunomodulatory effect and antitumor activity of thiazoles against Jurkat and HT-29 cell lines

*Thiago André R. dos Santos<sup>a</sup>, Aline Caroline da Silva<sup>a</sup>, Elany Barbosa Silva<sup>b</sup>, Diogo  
Rodrigo Magalhães Moreira<sup>b</sup>, Ana Cristina L. Leite<sup>b</sup>, Valéria R. A. Pereira<sup>a</sup>*

Laboratory of immunogenetic – Aggeu Magalhães Research Center - CPqAM/FIOCRUZ,  
50670-420, Recife, PE, Brazil<sup>a</sup>. Laboratory of Planning and Medicinal Chemistry –  
Department of Pharmacy, UFPE, 50740-520, Recife, PE, Brazil<sup>b</sup>.

**ABSTRACT**

Cancer remains a high incidence and mortality disease. It was the cause of 8.2 millions of deaths in 2012, according the World Health Organization. Medicinal chemistry approaches have been essential for the development of the first cytotoxic drugs used in cancer treatment, and keep contributing so far. In this work, we assessed the antitumor and immunomodulatory effects of six compounds (AT1, AT2, AT3, AT4, AT6 and AT9) containing the thiazole group in its structures. Cisplatin, a cancer drug, was used as control. Cytotoxicity against healthy cells was evaluated, using splenocytes and J774A.1 macrophages, and the compounds demonstrated intermediate cytotoxicity. Compounds presented remarkable antitumor activity against HT-29 and Jurkat cells, causing apoptosis and necrosis, especially for the last one. Owing to the cancer complexity, the possibility of a molecule to interfere with immunological

factors, as the cytokine environment, has a profound impact when looking for new treatment approaches. Therefore, immunomodulatory effects were observed for IL-10, IL-12 and TNF cytokines production, under the influence of the new compounds evaluated.

## **INTRODUCTION**

Cancer remains a high incidence and mortality disease. Beyond the genetic and heredity susceptibility, life and feed style are strong risk factors. Among the diverse organ font, lung emerge in the first position in statistics of new diagnosed cases in 2012, and colorectum and leukemia appear respectively at the third and the eleventh positions (Ferlay *et al.*, 2013).

Medicinal chemistry approaches have been essential for the development of the first cytotoxic drugs used in cancer treatment, and keep contributing so far. However, routine treatment has been associated with several collateral effects and high distress to the patient. The development of new drug alternatives has been stimulated aiming less collateral effects to patient and more selectivity to cancer cells. Additionally, when looking cancer in a complexity view, the possibility of a potential molecule to interfere with immunological factors, as the cytokine milieu, has a profound impact when looking for new treatment approaches (Hanahan and Weinberg, 2011). Diverse cytokines have its role in cancer rise and progression characterized, and the cytokine milieu in cancer has been the focus of several articles (Balkwill, 2009; Bertazza and Mocellin, 2010; Germano, Allavena and Mantovani, 2008; Grivennikov and Karin, 2011). Through the activation of several intracellular effectors, cytokines can control the immunologic and inflammatory milieu stimulating an antitumor immunity (IL-12, TRAIL, IFN- $\gamma$ ) or contributing for tumor progression (IL-6, IL-17, IL-23), and also present direct effects on tumor cells (TRAIL, FasL, TNF, IL-6, TGF- $\beta$ ) (Grivennikov, Greten and Karin, 2010).

Here we assessed the antitumor and immunomodulatory activity of six compounds containing the thiazole group in its structures. The induction of cell death was measured using flow cytometry.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Compounds**

Compounds used in this work were obtained through synthesis performed at the Laboratory of Planning and Medicinal Chemistry, in Federal University of Pernambuco (UFPE), Brazil, which were duly identified by nuclear magnetic resonance of hydrogen, infrared and mass spectroscopy.

### **Cell lineages**

In this work were used the cell lines HT-29 (colorectal), B16F10 (melanoma), Jurkat (Leukemia) and K562 (leukemia). HT-29 is derived from a colorectal tumor. The cell lines used in this work were obtained from the cell bank of Rio de Janeiro (BCRJ). All cell lines were conserved in liquid nitrogen.

HT-29 cells were cultured in DMEM medium (Cultilab) containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 100U/mL penicillin G, and 2mMl-glutamine in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air at 37°C. The cells were passaged twice a week and used in exponential growth phase. Cell viability was determined by tripan blue exclusion.

Jurkat cells were cultured in RPMI 1640 medium (Sigma) containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 100U/mL penicillin G, and 2mMl-glutamine in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air at 37°C. The cells were passaged twice a week and used in exponential growth phase. Cell viability was determined by tripan blue exclusion.

### **Spleen cell obtention from BALB/c mice**

Male BALB/c mice (6 to 8 weeks old) were raised at the animal facility of the Oswaldo Cruz Foundation (Rio de Janeiro, Brazil) and maintained at the facility of the Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation in Recife, Brazil. All mice were euthanased and their spleens removed in accordance with the Oswaldo Cruz Foundation Commission for Experiments with Laboratory Animal (Ministry of Health, Brazil 0266/05).

### **Spleen cell harvesting**

Spleen cells were harvested according to a previous protocol (cite Pereira, 2004). After killing the BALB/c mice using CO<sub>2</sub> gas, spleen of each mouse was removed aseptically and placed in a conic tube containing incomplete RPMI 1640 with fetal serum (complete medium). In a vertical flow, each spleen was transferred to a petri dish where they were soaked. The cell suspensions obtained were transferred to new conic tubes containing approximately 10 mL of incomplete medium per spleen, centrifuged at 4°C, 200 x g for five minutes. After discarding the supernatant, distilled water was added to the sediment to promote red blood cells lysis. The supernatant, without cellular debris was collected and centrifuged at 4°C, 200 x g for five minutes. The resulting sediment (containing cells) was re-suspended in complete RPMI 1640. An aliquot of each cell suspension was separated, diluted in trypan blue for quantification in a Neubauer chamber and cell viability was determined.

### **Cell proliferation assessment by tritiated thymidine assay**

BALB/c mouse splenocytes were seeded at  $5 \times 10^6$  cells/well in 96-well plate. Compounds were dissolved in DMSO and then diluted in RPMI-1640 medium at six concentrations (1, 5, 10, 25, 50 and 100 µg/mL) and added to respective wells, in triplicate. The final DMSO

concentration was 1 %. The plate was incubated for 24 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> containing 1.0 µCi of 3H-thymidine (Perkin-Elmer, Waltham, MA). The content of the plate was then harvested and transferred to a liquid scintillation counter (WALLAC 1209, Rackbeta Pharmacia, Stockholm, Sweden) and the percent of 3H-thymidine incorporation was determined. Were used as controls cells treated with saponin (0.05%). Each compound was tested in triplicate. For determining the CC<sub>50</sub> values, six different concentrations were used. Compounds toxicity was determined by comparing the percentage of [3H] thymidine incorporation (as an indicator of cell viability) i untreated cells with that in untreated cells. The concentration leading to 50% inhibition of viability (CC<sub>50</sub>) was also calculated by regression analysis.

#### **Cytotoxicity assessment by MTT assay**

The MTT-tetrazolium reduction assay was used to evaluate the toxic effects of the compounds against HT-29 and Jurkat cancer cells and J774A.1 macrophages.  $1 \times 10^5$  cells/well were added in 96-well plate with the appropriated medium and incubated for 24 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. After that, compounds were added in different concentrations (100, 50, 25, 10, 5 e 1 µg/ml) and the plate was incubated for 72 h. Cisplatin was used as a reference drug. After this period, 25 µL de MTT in PBS (5 mg/mL, p/v) were added to each well, incubating for 2 h. Culture medium was then removed and 100 µL of DMSO was added. Optical density was measured in 540 nm. The concentration leading to 50% inhibition of viability (CC<sub>50</sub>) was also calculated by regression analysis.

#### **Annexin V – FITC/ PI biding and flow citometry assay**

Tumoral cell lines ( $1 \times 10^6$  cells/mL) were resuspended in the appropriated medium and treated with the compounds in the respective  $CC_{50}$ , obtained in previous experiments for each compound, for 24 h at  $37^\circ\text{C}$  with 5%  $\text{CO}_2$ . Tumor cells were labeled with propidium iodide (PI) and annexin V using the annexin V-FITC apoptosis detection kit (Ebioscience, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer instructions. Experiment was performed using a BD Calibur flow cytometer (San Jose, CA, USA) by acquiring 20,000 events at least, and data were analyzed by BD CellQuest software Flowjo software (San Jose, CA, USA).

### **Immunomodulatory activity in macrophages treated with the compounds**

The measurement of cytokines was done using supernatant of J774A.1 macrophages cultured treated with the compounds in its respective  $CC_{50}$  values. Quantifications were done after 24, 48 and 72 h of incubation. As positive control, cells were stimulated with the mitogens lipopolysaccharide (LPS at  $x \mu\text{g. mL}^{-1}$ ) and concanavalin A (ConA at  $x \mu\text{g. mL}^{-1}$ ), while for the negative control, cells did not receive either mitogen or drugs. The levels of TNF , IL-10 and IL-12 cytokines were measured using sandwich enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs), according to the manufacturer's suggested protocols. The monoclonal antibodies used were the OptEIA (BD Biosciences) kit, and these were used after titration. Plates with 96 wells (NalgeNunc International Corp.) were sensitized with specific anticytokine antibodies (according to the manufacturer's instructions) and incubated overnight at  $4^\circ\text{C}$ . Cytokine standard were added after serial dilutions from their initial concentrations ( $16,000 \text{ pg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). After a washing step,  $50 \mu\text{l}$  of all samples and standards was added in duplicate, and the plate was incubated for 2 h at room temperature. The specific antibodies were then combined with biotin (according to the manufacturer's instructions) and incubated for 1 h 30 min at room temperature.

Revealer solution containing 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) was added. The reaction was blocked with 1 M sulfuric acid, and the reading was carried out on a spectrophotometer (3550; Bio-Rad, Hercules, CA) at 415 nm. Sample concentrations were calculated in the linear region of the titration curve of cytokine standards, and final concentrations were expressed in  $\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$ , using Microplate Manager, version 4.0, software (Bio-Rad Laboratories).

### **Statistical analysis**

All experiments were done in triplicate. Data were analyzed for statistically significant experimental differences using analysis of variance (ANOVA) and the Dunnett's test. Statistical significance was considered when  $p < 0.05$ . Significance and linear regression analysis were done using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, California, EUA).

## **RESULTS**

### **Proliferation of murine splenocytes after incubation with compounds by thymidine tritiated**

Initially in this screening, the effect of compounds in proliferation of spleen cells was assessed. For this purpose, tritiated thymidine was used. The incorporation of this nucleic acid was correlated with the proliferation ratio.  $CC_{50}$  values in spleen cell varied between 19 and 51  $\mu\text{M}$ , for AT1 and AT2 respectively. Cisplatin presented a low cytotoxicity for spleen cells (171.70  $\mu\text{M}$ ). Results are shown in table 1.

### **Cytotoxicity effect on J774A.1 macrophages**

Cytotoxicity against J774A.1 was done by MTT assay and used as a control of nontumorous lineage.  $CC_{50}$  results varied between 11 and 36  $\mu\text{M}$  and are showed in table x.

Cisplatin showed a  $CC_{50}$  of 58.98  $\mu$ M.  $CC_{50}$  values obtained in this step were used for antitumor experiments.

### Antitumor activity on Jurkat and HT-29 cell lines

Using MTT assay we observed that compounds demonstrated antitumor activity in both cell lines tested. Compounds tested showed a dose-dependent effect. Despite the  $CC_{50}$  levels observed with J774A.1 macrophages, all compounds showed lower levels of  $CC_{50}$  in HT-29 and Jurkat cells when compared with treatment with cisplatin (Table X). A lower  $CC_{50}$  represents a greater antitumor activity.

**Table 1.** Cytotoxicity effect of compounds tested in Spleen cells, J774A.1 Macrophages, HT-29 and Jurkat cell lines.

| Compounds | Spleen cells | Macrophage J774A.1 | HT-29  | Jurkat |
|-----------|--------------|--------------------|--------|--------|
| AT1       | 19,21        | 30,35              | 57,83  | 16,23  |
| AT2       | 51,77        | 36,05              | 65,62  | 21,30  |
| AT3       | 21,33        | 19,99              | 108,25 | 19,59  |
| AT4       | 28,29        | 20,32              | 78,87  | 28,18  |
| AT6       | 37,54        | 33,60              | 51,29  | 21,54  |
| AT9       | 34,87        | 11,65              | 25,22  | ND     |
| Cisplatin | 171,10       | 58,98              | 179,07 | 89,47  |

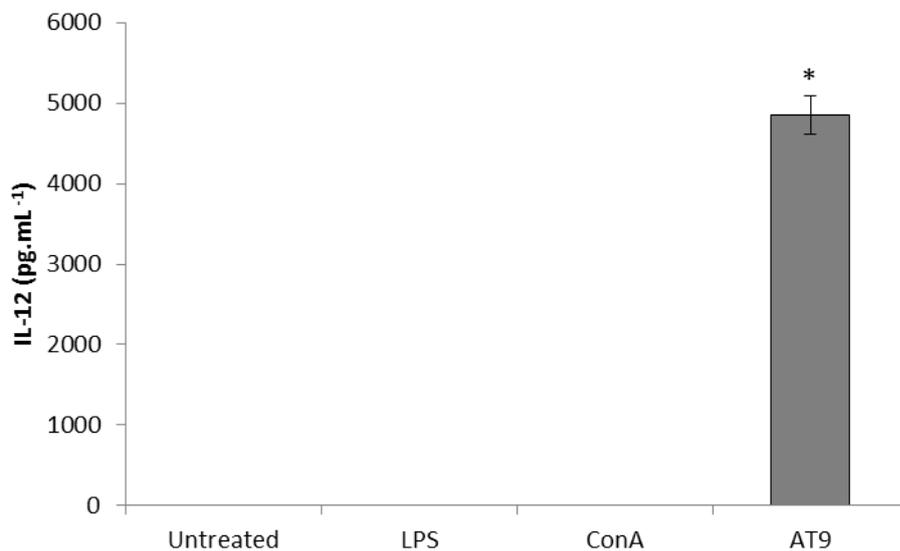
$CC_{50}$  values in  $\mu$ M. ND: Not Determined.

### Immunomodulatory activity in J774A.1 macrophages treated with the compounds

Aiming to assess if compounds had any immunomodulatory activity, we evaluated induction of secretion of cytokines by ELISA.

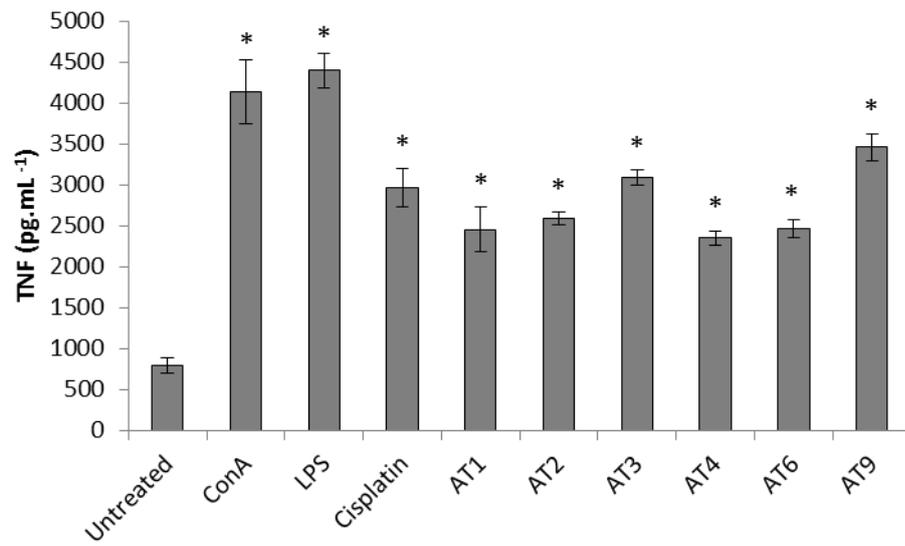
The influence of the compounds in stimulating the production and secretion of IL-12, IL-10 and TNF was assessed. For this purpose, J774A.1 macrophages supernatants of culture were collected after incubation for 24, 48 and 72 h with the compounds. Results are showed below.

For **IL-12**, a significant ( $p < 0.0001$ ) production, when compared with the untreated group, was observed only after 72 h of incubation with the compound AT9. LPS, ConA and cisplatin, after 24, 48 and 72 h of incubation, did not influence this cytokine production, in the experimental conditions applied.

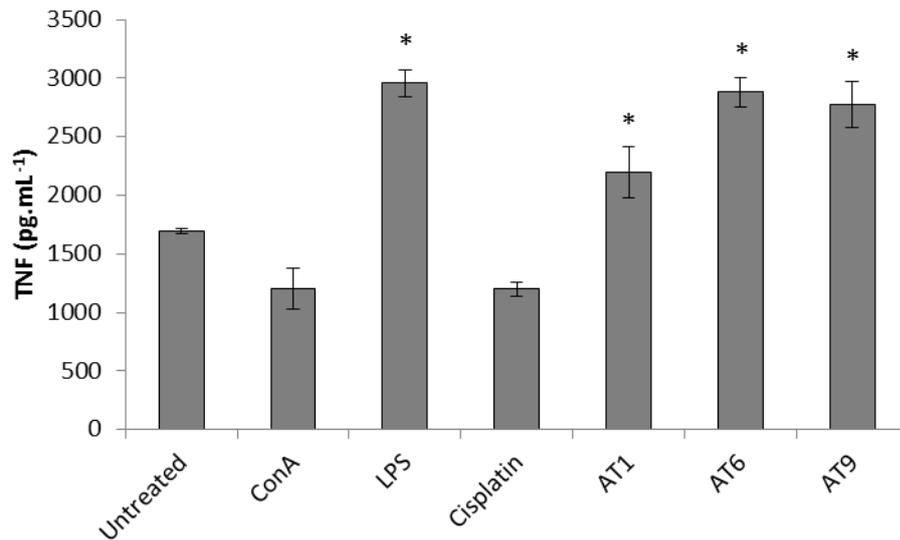


**Figure 1.** IL-12 production in supernatants of the macrophage culture in the presence of AT9 at 11,65  $\mu$ M after 72 h of incubation. The horizontal bars represent standard derivation. \*,  $P < 0.0001$ .

Significant ( $p < 0.0001$ ) production of **TNF** was observed for all compounds tested after 48 h of incubation. Similar results were observed after 72 h of incubation with the compounds AT1, AT6 and AT9. Results are shown in figure 2 and 3.

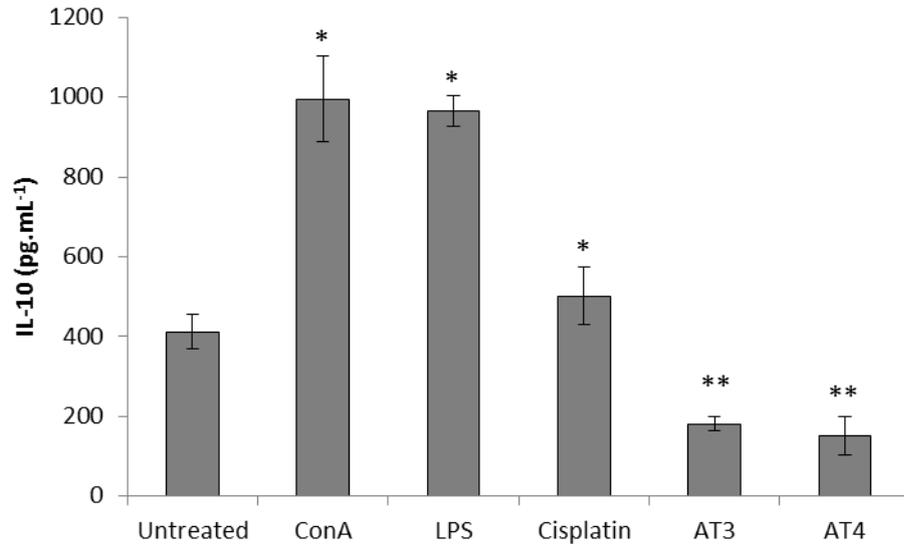


**Figure 2.** TNF production in supernatants of the macrophage culture in the presence of all compounds tested at its respective CC<sub>50</sub> values, after 48 h of incubation. The horizontal bars represent standard derivation. \*, P<0.0001.

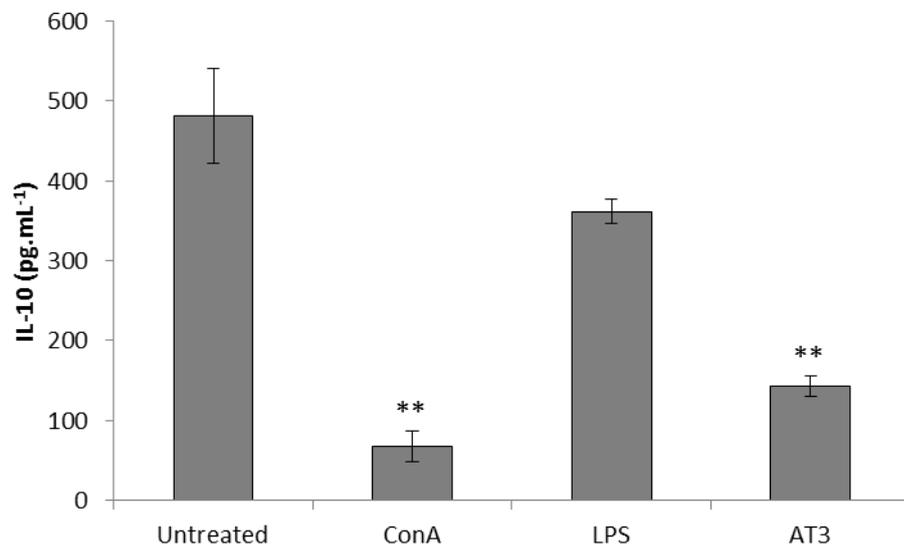


**Figure 3.** TNF production in supernatants of the macrophage culture in the presence of AT1, AT6 and AT9, at its respective  $CC_{50}$  values, after 72 h of incubation. The horizontal bars represent standard derivation. \*,  $P < 0.0001$ .

For **IL-10**, after 24 h of incubation with compounds AT3 and AT4 a significant ( $p < 0.0001$ ) reduction of the production was observed when compared to untreated group. Inhibition of production of this cytokine was sustained with AT3 after 48 h of incubation. After 72 h of treatment was not observed production of this cytokine in any group.



**Figure 4.** IL-10 production in supernatants of the macrophage culture in the presence of AT3, and AT4, at its respective  $CC_{50}$  values, after 24 h of incubation. The horizontal bars represent standard derivation. \*,  $P < 0.0001$ .

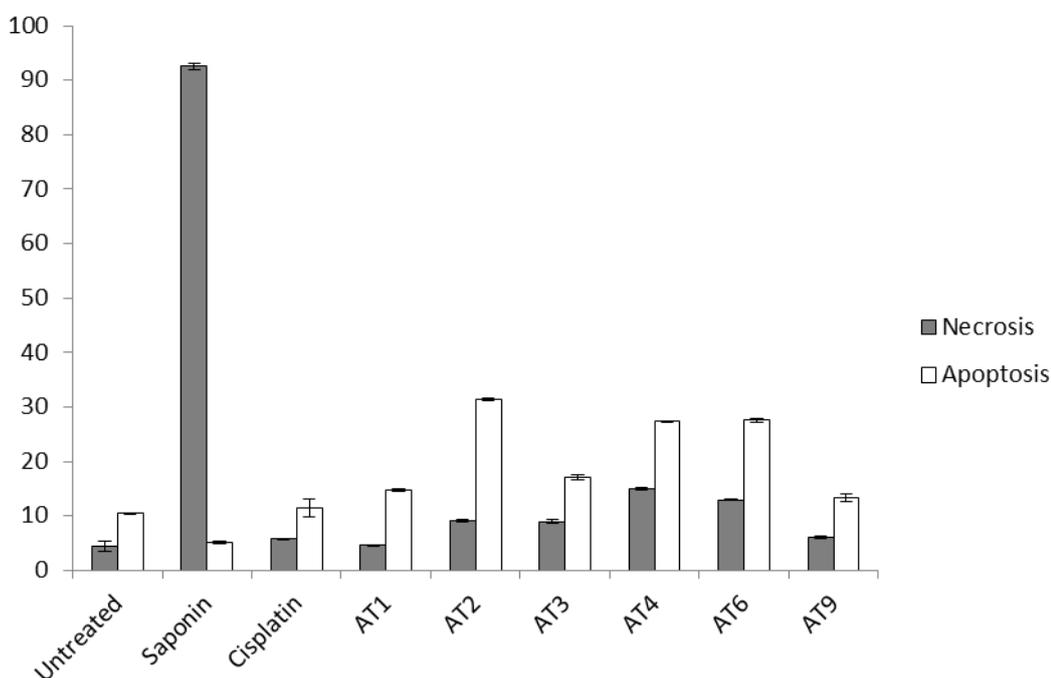


**Figure 5.** IL-10 significant reduction in supernatants of the macrophage culture in the presence of AT3 at its respective  $CC_{50}$  value, after 48 h of incubation. The horizontal bars represent standard derivation. \*\*,  $P < 0.0001$ .

### Cell death induction

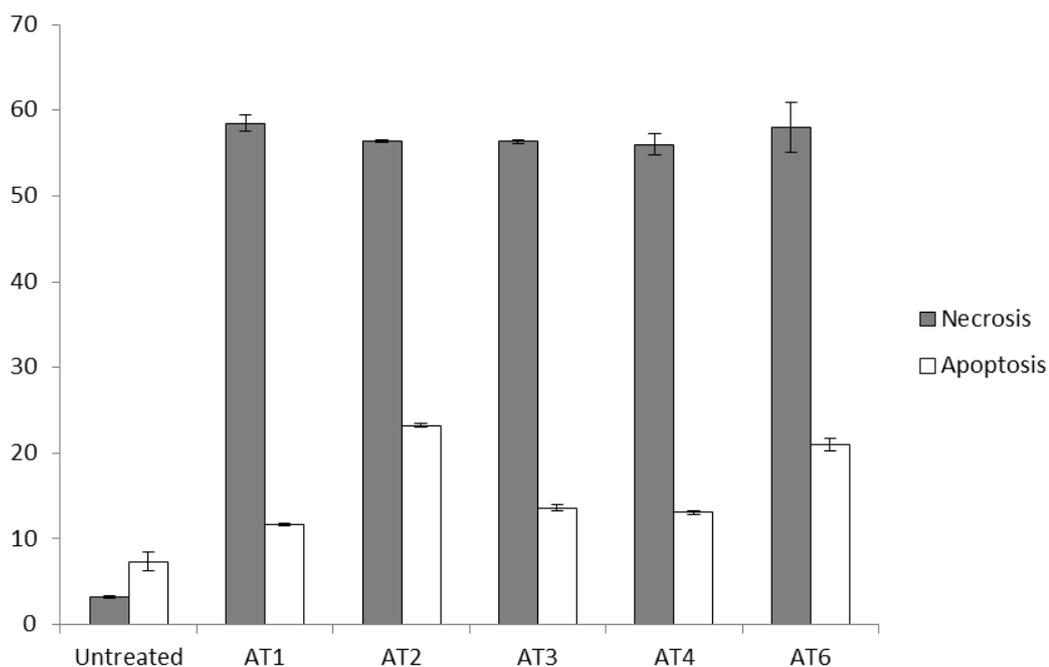
Once observed that the compounds had an antitumor effect, and after the determination of the  $CC_{50}$  value for each compound in the two cell lines tested, we incubated these compounds in its respective  $CC_{50}$  value for 72 h aiming to evaluate the kind of cell death induced. For this, cells were labeled with annexin V-FITC and propidium iodide and analyzed by flow cytometry.

Results with HT-29 cell line showed that untreated cells presented a lower labeling with either AN or PI, demonstrating cell viability. Saponin, used as cell death positive control, caused a high labeling (>90%) with PI, indicating cell death by necrosis, as expected. Compounds showed higher labeling with AN when compared to PI, under the experimental conditions applied, indicating cell death predominantly by apoptosis. Results are showed in figure 6.



**Figure 6.** Percentage of HT-29 cells labeled for necrosis and apoptosis, after 72 h of incubation with the compounds.

Similarly to HT-29 cell, Jurkat untreated cells showed low labeling with either AN or PI. [Result with cisplatin]. However, in contrast to HT-29, Jurkat cells presented a high labeling (>50%) with PI, and a lower labeling with AN. Results are showed in figure x.



**Figure 7.** Percentage of Jurkat cells labeled for necrosis and apoptosis, after 72 h of incubation with the compounds.

## DISCUSSION

Despite great efforts made by public and private organizations cancer's characteristics, as severity and often lethality, has persisted over the years (Kamb, Wee and Lengauer, 2007). The development of new cancer treatments remains a challenging process, (Lord and Ashworth, 2010) diverse therapy strategies have been developed and tried, and medicinal chemistry is one of this approaches [cite]. In this context, several compounds has been noted for its activity in various diseases, including cancer (Sturla *et al.*, 2007).

Thiazoles are organic heterocyclic compounds presenting a ring of five members containing three carbon, one atom of sulfur and one atom of nitrogen (Kashyap *et al.*, 2011). These structures are frequently found in several compounds with strong biological activities, including anticancer agents, as bleomycin and thiazofurin (Kashyap *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2013a).

In this work six compounds, with thiazoles in its structures, were screened for its antitumor and immunomodulatory activities. Cisplatin, used as a control, is one of the most remarkable success in the treatment of cancer (Pabla and Dong, 2008). Initially, an evaluation of the effects of these compounds on murine splenocytes proliferation was done.  $CC_{50}$  values range among 19 and 51  $\mu\text{M}$  for the compounds. Despite the  $CC_{50}$  value observed with cisplatin, results observed after incubation of the compounds with tumoral cell lines encouraged the sequence of work. Cisplatin is known for its accentuated nephrotoxicity and it should be. In this screening was observed that ...

In addition, a screening was performed aiming to assess the cytotoxic effect of the compounds tested on J774A.1 macrophages.

When treating the tumor cells, with both HT-29 and Jurkat was observed that cytotoxic effect of compounds was superior to the observed after treatment with cisplatin. These results showed that these compounds have a potential as a therapeutic tool, despite the cytotoxicity observed in splenocytes and macrophages. Therefore, other experiments were performed, aiming to elucidate this potential in these tumor cell lines.

Antitumor treatment can cause different cell death to neoplastic cells, depending on the lethal stimuli generated (Kepp *et al.*, 2009). Apoptosis is a strongly regulated process that can be initiated by both intracellular stress signals and extracellular ligands (Bruin, de and Medema, 2008). Apoptosis is morphologically characterized by cell shrink, picnosis and eventually fragmentation of apoptotic bodies (Amaravadi and Thompson, 2007) Inactivation

of apoptosis is a central event in cancer development, and its activation, by treatment approaches, can present benefits in patient prognostic (Kasibhatla and Tseng, 2003). In contrast, necrosis has been considered as an uncontrolled cell death pathway, characterized by cytoplasmatic vacuolization, loss of plasma membrane integrity and cell swelling (Bruin, de and Medema, 2008).

After the observation that compounds had a considerable cytotoxic effect with tumor cell lines the induction of necrosis and apoptosis was assessed for HT-29 and Jurkat cell lines.

For HT-29 cells compounds AT2, AT4 and AT6 have stood out for the induction of apoptosis, under the experimental conditions applied. All the compounds tested increase significantly the labeling for apoptosis and necrosis.

AT1, AT2, AT3, AT4 and AT6 compound showed a great induction of necrosis in Jurkat cell, observed in AN/PI assays. Again, all compounds tested increase significantly the labeling for apoptosis and necrosis. The evaluation of this effect on other leukemia cell lines is currently underway. Cisplatin nephrotoxicity is characterized by both necrosis and apoptosis (Pabla and Dong, 2008).

The differential induction of cell death in those cell lines reinforce the necessity of deepening investigations in mechanisms of action and suggests that distinct mechanisms of action are present in HT-29 and Jurkat cells. Cytokine induction might be among those mechanisms.

Cytokines are a relevant component in tumor microenvironment. Cytokine type and quantity produced in tumor microenvironment can play an important role in tumor development and progression (Grivennikov, Greten and Karin, 2010). Several cell types can be found in tumor microenvironment, as innate immune cells, including macrophages, neutrophils, mastocytes, Nk cells; adaptative immune cells, as T and B lymphocytes in addition to tumor cells and its surrounding stroma (Grivennikov, Greten and Karin, 2010; Hanahan and Weinberg, 2011).

Stands out among the lymphocytic infiltrate the presence of tumor-associated macrophages (TAM). Macrophages are considered a paradigm in tumor related inflammation. Its marked plasticity confers to them the potential to express pro and antitumor activities (Grivennikov, Greten and Karin, 2010; Mantovani and Sica, 2010). In response to diverse signals macrophages can be activated in a polarized way. This activation can be divided basically in two classes, M1 and M2 macrophages (Grivennikov, Greten and Karin, 2010). Regarding this, M1 macrophages are characterized by the production of proinflammatory cytokines, as TNF, IL-1, IL-6, IL-12 e IL-23, while M2 macrophages downregulates de expression of IL-12 and presents elevated expression of IL-10, among other characteristics (Grivennikov, Greten and Karin, 2010; Mantovani and Sica, 2010; Murray and Wynn, 2011; Solinas *et al.*, 2009). *In vitro* studies often concentrates in the production of IL-10 and IL-12 to discriminates M1 and M2 macrophages (Heusinkveld and Burg, van der, 2011; Murray and Wynn, 2011).

Given the importance of these cells, cytokine production after incubation with compounds were evaluated with J774A.1 macrophages. IL-12, IL-10 and TNF production were assessed after 24, 48 and 72 h of incubation.

Among the untreated group, after 24 and 48 h, was observed production of IL-10. With respect to IL-12, production was observed only after 24 h, without detection of production after 48 and 72 h. Assays with J774A.1 revealed. This profile might be attributed to the inhibitory action of IL-10 in the production of IL-12. Furthermore, its known that under stationary state tissue macrophages presents intrinsic anti-inflammatory functions (Murray and Wynn, 2011).

LPS section.

IL-10 exerts it function through inhibitory activity on macrophages and dendritic cells. IL-10 inhibits the production of IL-12 by activated macrophages in addition to down regulate MHC II expression by this cells (Lee and Margolin, 2011). Among the compounds tested,

was observed that some of them increased and some decreased the production of IL-10, in comparison to the untreated group. IL-10 reduction might be considered a desirable phenomenon, mainly if it happens in tumor microenvironment, since that several pro tumor effects have been associated with this cytokine (Itakura *et al.*, 2011; Zeng *et al.*, 2010). Compounds AT3 (metoxil) and AT4 (Cl) promoted decrease of IL-10 after 24 h of incubation. This effect was just observed with AT3 after 48 h of incubation.

IL-12 have been evaluated as a therapeutic cytokine for cancer in diverse pre-clinical situations (Lee and Margolin, 2011). The induction of production of IL-12 by macrophages in the microtumoral environment is a desirable event, in view of the stimulation of several effector cells of immune system by this cytokine (Lee and Margolin, 2011). The increase of production of IL-12 was observed with AT9 (Fluor) after 72 h of incubation. This production was near to 5000 pg/mL.

Historically, TNF was the first cytokine used in cancer treatment (Bertazza and Mocellin, 2010). Apart of cancer context, TNF was identified as a main regulator of inflammation and a key in cytokine network (Balkwill, 2009). In the cancer context, this cytokine can present a dicotomic and can actuate as a pro or antitumor agent, in diverse contexts. For instance, this pro-inflammatory cytokine is a important factor involved in initiation, proliferation, angiogenesis and metastasis of diverse cancer types (Lin and Karin, 2007). Several malign cells constitutively produce small quantities of TNF (Balkwill, 2009). Those observations, and the roles of TNF in cancer development and progression might shade the anticancer potential of this cytokine (Bertazza and Mocellin, 2010). Defining TNF role in cancer therapy remains a challenging process due to its pleiotropic nature that might stimulate multiple complex and interconnected pathways, often involved in opposite phenomena (Bertazza and Mocellin, 2010). Increase of production of TNF was observed after 48 h of incubation with all compounds, and after 72 h with AT1, AT6 and AT9.

Results obtained reveal that some compounds have good activity as immunomodulators on J774A.1 macrophage cell line. Understanding the mechanisms by which a favorable immune context can be developed and maintained is essential for guiding innovative therapies (Fridman *et al.*, 2012). New approaches on cancer treatment should consider , and take advantage of of mechanisms that interfere in M2 macrophages in several levels, as in the attraction, differentiation and activation of this cells (Heusinkveld and Burg, van der, 2011).

## REFERENCES

AMARAVADI, R. K.; THOMPSON, C. B. The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 13, n. 24, p. 7271–9, 15 dez. 2007.

ASSIS, S. P. D. O. *et al.* Synthesis and anti-inflammatory activity of new alkyl-substituted phthalimide 1H-1,2,3-triazole derivatives. **TheScientificWorldJournal**, v. 2012, p. 925925, jan. 2012.

BALA, S. *et al.* Bioactivity-therapeutic Potential in Present Scenario. v. 18, n. 1, p. 65–74, 2013.

BALKWILL, F. Tumour necrosis factor and cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, n. 5, p. 361–71, maio 2009.

BERTAZZA, L.; MOCELLIN, S. The dual role of tumor necrosis factor (TNF) in cancer biology. **Current medicinal chemistry**, v. 17, n. 29, p. 3337–3352, jan. 2010.

BRUIN, E. C. DE; MEDEMA, J. P. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. **Cancer treatment reviews**, v. 34, n. 8, p. 737–49, dez. 2008.

COLLINS, I.; WORKMAN, P. New approaches to molecular cancer therapeutics. **Nature chemical biology**, v. 2, n. 12, p. 689–700, dez. 2006.

COTTER, T. G. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, n. 7, p. 501–7, jul. 2009.

DOUGAN, M.; DRANOFF, G. Immune therapy for cancer. **Annual review of immunology**, v. 27, p. 83–117, jan. 2009.

DRANITSARIS, G. *et al.* Advances in cancer therapeutics and patient access to new drugs. **PharmacoEconomics**, v. 29, n. 3, p. 213–24, mar. 2011.

DRANOFF, G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. **Nature reviews. Cancer**, v. 4, n. 1, p. 11–22, jan. 2004.

FERLAY, J. *et al.* GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. **International Agency for Research on Cancer**, v. 1.0, n. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet], 2013.

FRIDMAN, W. H. *et al.* The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. **Nature reviews. Cancer**, v. 12, n. 4, p. 298–306, abr. 2012.

GERMANO, G.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Cytokines as a key component of cancer-related inflammation. **Cytokine**, v. 43, n. 3, p. 374–9, set. 2008.

GHORAB, M. M.; AL-SAID, M. S. Antitumor activity of novel pyridine, thiophene and thiazole derivatives. **Archives of pharmacal research**, v. 35, n. 6, p. 965–73, jun. 2012.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883–99, 19 mar. 2010.

GRIVENNIKOV, S. I.; KARIN, M. Inflammatory cytokines in cancer: tumour necrosis factor and interleukin 6 take the stage. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 70 Suppl 1, p. i104–8, mar. 2011.

HAMBLEY, T. W. Is anticancer drug development heading in the right direction? **Cancer research**, v. 69, n. 4, p. 1259–62, fev. 2009.

HANAHAN, D.; COUSSENS, L. M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. **Cancer cell**, v. 21, n. 3, p. 309–22, 20 mar. 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, mar. 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, p. 57–70, 2000.

HASHIMOTO, Y. Thalidomide as a multi-template for development of biologically active compounds. **Archiv der Pharmazie**, v. 341, n. 9, p. 536–47, set. 2008.

HEUSINKVELD, M.; BURG, S. H. VAN DER. Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. **Journal of translational medicine**, v. 9, n. 1, p. 216, jan. 2011.

ITAKURA, E. *et al.* IL-10 expression by primary tumor cells correlates with melanoma progression from radial to vertical growth phase and development of metastatic competence. **Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 24, n. 6, p. 801–9, jun. 2011.

KAMB, A.; WEE, S.; LENGAUER, C. Why is cancer drug discovery so difficult? **NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY**, v. 6, n. February, p. 115–120, 2007.

- KASHYAP, S. J. *et al.* Thiazoles: having diverse biological activities. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, n. 8, p. 2123–2132, 28 jun. 2011.
- KASIBHATLA, S.; TSENG, B. Why Target Apoptosis in Cancer Treatment ? Minireview Why Target Apoptosis in Cancer Treatment ? p. 573–580, 2003.
- KEPP, O. *et al.* Immunogenic cell death modalities and their impact on cancer treatment. **Apoptosis : an international journal on programmed cell death**, v. 14, n. 4, p. 364–75, abr. 2009.
- LEE, S.; MARGOLIN, K. Cytokines in Cancer Immunotherapy. **Cancers**, v. 3, n. 4, p. 3856–3893, 13 out. 2011.
- LESTERHUIS, W. J.; HAANEN, J. B. A G.; PUNT, C. J. A. Cancer immunotherapy - revisited. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 10, n. 8, p. 591–600, jan. 2011.
- LIMA LEITE, A. C. *et al.* Synthesis of aminoacyl thiaolidones as potential antitumour agents. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomédecine & pharmacothérapie**, v. 60, n. 3, p. 121–6, abr. 2006.
- LIN, W.; KARIN, M. A cytokine-mediated link between innate immunity , inflammation , and cancer. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 5, p. 1175–1183, 2007.
- LORD, C. J.; ASHWORTH, A. Biology-driven cancer drug development: back to the future. **BMC biology**, v. 8, p. 38, jan. 2010.
- LUO, J.; SOLIMINI, N. L.; ELLEDGE, S. J. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. **Cell**, v. 136, n. 5, p. 823–37, mar. 2009.
- MANTOVANI, A. *et al.* Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends in immunology**, v. 23, n. 11, p. 549–55, nov. 2002.
- \_\_\_\_\_. Tumor-associated macrophages and the related myeloid-derived suppressor cells as a paradigm of the diversity of macrophage activation. **Human immunology**, v. 70, n. 5, p. 325–30, maio 2009.
- MANTOVANI, A.; SICA, A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. **Current opinion in immunology**, v. 22, n. 2, p. 231–7, abr. 2010.
- MARTINEZ, F. O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative Activation of Macrophages : An Immunologic Functional Perspective. **Annual Review of Immunology**, 2009.
- MELCHERT, M.; LIST, A. The thalidomide saga. **International Journal of Biochemistry**, v. 39, p. 1489–1499, 2007.
- MÉNARD, C. *et al.* Cancer chemotherapy: not only a direct cytotoxic effect, but also an adjuvant for antitumor immunity. **Cancer immunology, immunotherapy : CII**, v. 57, n. 11, p. 1579–87, nov. 2008.

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 11, p. 723–37, nov. 2011.

PABLA, N.; DONG, Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. **Kidney international**, v. 73, n. 9, p. 994–1007, maio 2008.

PESSOA, C. *et al.* Discovery of Phthalimides as Immunomodulatory and Antitumor Drug Prototypes. p. 523 – 528, 2010.

PRITCHARD, K. I. Endocrine therapy: is the first generation of targeted drugs the last? **Journal of internal medicine**, v. 274, n. 2, p. 144–52, ago. 2013.

REICHERT, J. M.; WENGER, J. B. Development trends for new cancer therapeutics and vaccines. **Drug discovery today**, v. 13, n. 1-2, p. 30–7, jan. 2008.

ROLLAS, S.; KÜÇÜKGÜZEL, S. G. Biological activities of hydrazone derivatives. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 8, p. 1910–39, jan. 2007.

SAWYERS, C. Targeted cancer therapy. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 294–7, 18 nov. 2004.

SCHADE, A. E. *et al.* Dasatinib, a small-molecule protein tyrosine kinase inhibitor, inhibits T-cell activation and proliferation. **Blood**, v. 111, n. 3, p. 1366–77, 1 fev. 2008.

SHARMA, U. *et al.* Recent advances in the chemistry of phthalimide analogues and their therapeutic potential. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 10, n. 8, p. 678–704, jul. 2010a.

\_\_\_\_\_. Recent advances in the chemistry of phthalimide analogues and their therapeutic potential. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 10, n. 8, p. 678–704, jul. 2010b.

SICA, A.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Cancer related inflammation: the macrophage connection. **Cancer letters**, v. 267, n. 2, p. 204–15, 28 ago. 2008.

SINGH, M.; RAGHAV, N. BIOLOGICAL ACTIVITIES OF HYDRAZONES : A REVIEW. v. 3, n. 4, 2011.

SOLINAS, G. *et al.* Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. **Journal of leukocyte biology**, v. 86, n. 5, p. 1065–73, nov. 2009.

SOUZA, C. M. DE *et al.* Thalidomide attenuates mammary cancer associated-inflammation, angiogenesis and tumor growth in mice. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomédecine & pharmacothérapie**, v. 66, n. 7, p. 491–8, out. 2012.

STRASSER, A.; CORY, S.; ADAMS, J. M. Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. **The EMBO journal**, v. 30, n. 18, p. 3667–3683, 23 ago. 2011.

STURLA, S. J. *et al.* Chemistry in cancer research: a vital partnership. **Cancer research**, v. 67, n. 14, p. 6539–43, 15 jul. 2007.

SWARTZ, M. A *et al.* Tumor microenvironment complexity: emerging roles in cancer therapy. **Cancer research**, v. 72, n. 10, p. 2473–80, 15 maio 2012.

TAN, T.-T.; COUSSENS, L. M. Humoral immunity, inflammation and cancer. **Current opinion in immunology**, v. 19, n. 2, p. 209–16, abr. 2007.

WORKMAN, P. Genomics and the second golden era of cancer drug development. **Molecular BioSystems**, v. 1, n. 1, p. 17, 2005.

ZENG, L. *et al.* IL-10 promotes resistance to apoptosis and metastatic potential in lung tumor cell lines. **Cytokine**, v. 49, n. 3, p. 294–302, mar. 2010.

ZHENG, S. *et al.* Discovery of a Series of Thiazole Derivatives as Novel Inhibitors of Metastatic Cancer Cell Migration and Invasion. **ACS medicinal chemistry letters**, v. 4, n. 2, p. 191–196, 14 fev. 2013a.

\_\_\_\_\_. Discovery of a Series of Thiazole Derivatives as Novel Inhibitors of Metastatic Cancer Cell Migration and Invasion. **ACS medicinal chemistry letters**, v. 4, n. 2, p. 191–196, 14 fev. 2013b.

ZITVOGEL, L. *et al.* Immunological aspects of cancer chemotherapy. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, n. 1, p. 59–73, jan. 2008.

## APÊNDICE A - Detalhamento do processo de síntese

### 1. Detalhamento do processo de síntese das séries de compostos testados.

Os reagentes foram adquiridos da Acros Organics, Fluka, Vetec ou Sigma-Aldrich, enquanto que os solventes foram provenientes da Vetec ou Dinâmica. Os solventes deuterados (DMSO-d<sub>6</sub>, CDCl<sub>3</sub>, D<sub>2</sub>O) são da marca CIL (Tédia Brazil).

As reações foram acompanhadas em cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando sílica-gel 60 contendo indicador fluorescente F254. As placas cromatográficas foram visualizadas em uma lâmpada ultravioleta (com duplo comprimento de onda 365 ou 254nm).

Os pontos de fusão foram medidos em capilares usando um aparelho de Thomas Hoover e os valores não foram posteriormente corrigidos.

Para todos os compostos inéditos, foram feitas as análises de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e quando necessário, análises bidimensionais (DEPT) bem como a adição de D<sub>2</sub>O para a localização dos sinais de NH. Todos os compostos foram solubilizados em DMSO-d<sub>6</sub>. Os espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C foram adquiridos nos instrumentos Varian modelo Unity Plus (400 MHz para <sup>1</sup>H; 100 MHz para <sup>13</sup>C) ou Bruker AMX (300 MHz para <sup>1</sup>H e 75.5 MHz para o <sup>13</sup>C), usando o tetrametilsilano como padrão interno. A multiplicidade dos sinais nos espectros de RMN <sup>1</sup>H foram designadas da seguinte forma: s / singleto; d / dubleto; t / tripleto; dd / duplo dupleto; q / quarteto; m / multipeto. Para os espectros no infravermelho, utilizou-se o instrumento Bruker (Modelo IFS 66) usando pastilhas de KBr.

#### **Síntese do composto intermediário PT01, 2-(1-(3-bromofenil)propilideno)**

**hidrazinacarbotoamida:** Em balão de fundo redondo, adicionou-se a 1-(3-bromofenil)propan-1-ona, a tiossemicabazida (na proporção 1:1), etanol (q.s.p.s.) e HCl (cat.). A mistura reacional foi mantida em agitação magnética e refluxo por 2-3 horas. As reações foram acompanhadas por placa cromatográfica de camada delgada (CCD). O precipitado formado foi filtrado em funil sinterizado com etanol, obtendo-se o produto puro.

- **PT01** = 5,486mmols 1-(3-bromofenil)propan-1-ona, 5,486mmols tiossemicarbazida, 7 gotas HCl;

**Síntese da série 3-Br-fenil-propil-hidrazona-tiazóis (PT01.2-14):** Em balão de fundo redondo, adicionou-se o 2-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazinacarbotioamida (**PT01**), a respectiva cetona halogenada e isopropanol (q.s.p.s.). A mistura reacional foi mantida à temperatura ambiente por 1 hora. As reações foram acompanhadas por placa cromatográfica de camada delgada (CCD). O precipitado formado foi filtrado em funil sinterizado com água destilada, obtendo-se o produto puro.

- **PT01.2** = 1,398 mmol de **PT01**, 1,398 mmol de 2-bromo-acetofenona;
- **PT01.3** = 1,398 mmol de **PT01**, 1,398 mmol de 2-bromo-4'-metil-acetofenona;
- **PT01.4** = 1,398 mmol de **PT01**, 1,398 mmol de 2-bromo-4'-metoxi-acetofenona;
- **PT01.5** = 1,398 mmol de **PT01**, 1,398 mmol de 2,4'-dibromo-propilfenona;
- **PT01.6** = 1,398 mmol de **PT01**, 1,398 mmol de 2-bromo-3'-nitro-acetofenona;
- **PT01.7** = 1,398 mmol de **PT01**, 1,398 mmol de 2-bromo-4'-nitro-acetofenona;
- **PT01.8** = 1,398 mmol de **PT01**, 1,398 mmol de 2-bromo-4'-fluor-acetofenona;
- **PT01.9** = 1,398 mmol de **PT01**, 1,398 mmol de 2-bromo-4'-cloro-acetofenona;
- **PT01.13** = 1,398 mmol de **PT01**, 1,398 mmol de 2-bromo-3',4'-dicloro-acetofenona;
- **PT01.14** = 1,398 mmol de **PT01**, 1,398 mmol de 2,2',4'-tricloro-acetofenona.

**Síntese do composto intermediário 1 (Int1), 2-(2,2-dietoxietil)isoindolina-1,3-diona:** Em balão de fundo redondo, adicionou-se o anidrido ftálico, o aminoacetaldeído dietil acetal, dimetil-amino-piridina (DMAP) e quantidade suficiente para solubilizar (q.s.p.s.) de tolueno como solvente. A mistura reacional foi mantida em agitação magnética e refluxo por 2 horas. A reação foi acompanhada por placa cromatográfica de camada delgada (CCD). Após o termino da reação, foram realizadas três extrações tendo como fase orgânica o tolueno. Em seguida realizou-se uma secagem do tolueno com sulfato de sódio anidro. Por fim, o tolueno foi evaporado à vácuo, obtendo-se o precipitado puro.

- **Int1** = 13,5mmols de anidrido ftálico, 16,2mmols de aminoacetaldeído dietil acetal, 0,82mmols dimetil-amino-piridina (DMAP)

**Síntese do composto intermediário 2 (Int2), 2-(1,3-dioxoisoindol-2-il)acetaldeído:** Em balão de fundo redondo, adicionou-se 2-(2,2-dietoxietil)isoindolina-1,3-diona (**Int1**), ácido sulfúrico catalítico e q.s.p.s. de água como solvente. A mistura reacional foi mantida em agitação magnética e refluxo por 2 horas. A reação foi acompanhada por placa cromatográfica de camada delgada (CCD). Após o término da reação, aguardou-se atingir a temperatura ambiente e foi colocada sob resfriamento para indução da precipitação. O precipitado formado foi filtrado em funil sinterizado com água destilada, obtendo-se o produto puro.

- **Int2** = 4,5mmols de **Int1**, 7 gotas H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

**Síntese do composto intermediário 3a (Int3a), 2-(2-(1,3-dioxoisoindolin-2-il)etilideno)hidrazinacarbotioamida:** Em balão de fundo redondo, adicionou-se o aldeído 2-(1,3-dioxoisoindol-2-il)acetaldeído (**Int2**), a tiossemicabazida (na proporção 1:1), etanol (q.s.p.s.) e HCl (cat.). A mistura reacional foi mantida em agitação magnética e refluxo por 4 horas. As reações foram acompanhadas por placa cromatográfica de camada delgada (CCD). O precipitado formado foi filtrado em funil sinterizado com etanol, obtendo-se o produto puro.

- **Int3a** = 3,85mmols **Int2**, 3,85mmols tiossemicarbazida, 7 gotas HCl;

**Síntese do PA01, 2-(2-(2-(4-(clorometil)tiazol-2-il)hidrazona)etil)isoindolina-1,3-diona:** Em um balão de fundo redondo, adicionou-se o 2-(2-(1,3-dioxoisoindolin-2-il)etilideno)hidrazinacarbotioamida (**Int3a**), a 1,3-dicloro-acetona e DMF (dimetilformamida) (q.s.p.s.). A mistura reacional foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por cerca de 1 hora. A reação foi acompanhada por placa cromatográfica de camada delgada (CCD). Após adição de água destilada ocorre a precipitação do produto puro.

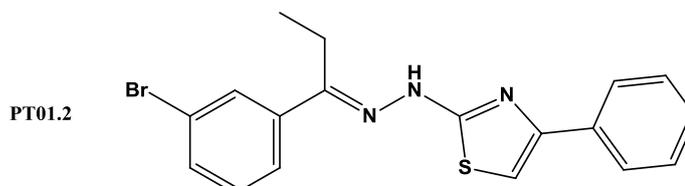
- **PA01** = 3 mmol de **Int3a**, 3 mmol de 1,3-dicloroacetona.

### Dados Físico-Químicos e Elucidação Estrutural

PT01: 2-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazinacarbotioamida:

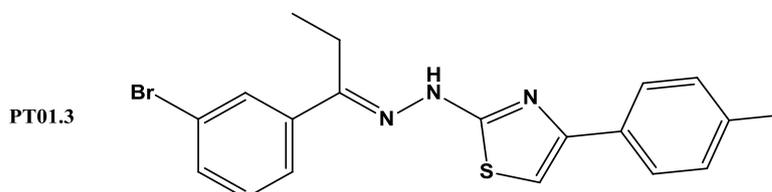
C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>BrN<sub>3</sub>S; 286,19g/mol; R<sub>f</sub> (8:2-Hexano:Acetato de etila): 0.4; PF: 142°-146°C; IV (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3415.33 (NH), 3200.90 e 3146.40 (CH Ar), 1507.11 (C=N); RMN- <sup>1</sup>H

(300 MHz, ppm): 0.992 (t, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.860 (q, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.341 (t, 1H, Ar), 7.560 (d, 1H, Ar), 7.860 (d, 1H, Ar), 8.083 e 8.151 (2s, 2H, NH<sub>2</sub>), 8.310 (s, 1H, Ar), 10.353 (s, 1H, NH); RMN- <sup>13</sup>C (75.5 MHz, ppm): 10.791 (Alif), 19.096 (Alif), 122.137 (Ar), 125.746 (Ar), 129.028 (Ar), 130.382 (Ar), 131.796 (Ar), 138.776 (Ar), 150.221 (C=N), 179.045 (S=C-NH<sub>2</sub>).



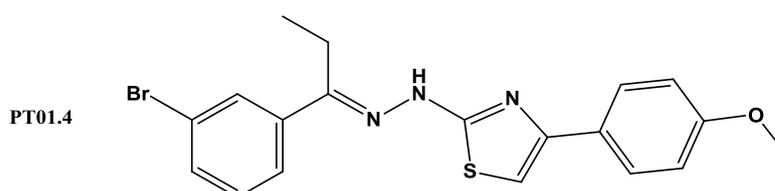
PT01.2: 2-(2-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazinil)-4-feniltiazol:

C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>BrN<sub>3</sub>S; 386,31g/mol; Rf (8:2-Hexano:Acetato de etila): 0.63; PF: 196°-199°C; IV (KBr, cm<sup>-1</sup>): 1516.36 (C=N); RMN- <sup>1</sup>H (300 MHz, ppm): 1.029 (t, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.820 (d, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.276-7.396 (m, 5H, Ar), 7.518-7.536 (d, 1H, Ar), 7.721-7.739 (d, 1H, Ar), 7.810-7.828 (d, 2H, Ar), 7.911 (s, 1H, Tiazol), 10.638 (s, 1H, NH); RMN- <sup>13</sup>C (75.5 MHz, ppm): 10.065 (Alif), 19.639 (Alif), 104.404 (Tiazol), 122.100-138.962 (Ar), 149.819 (C=N), 169.576 (Tiazol).



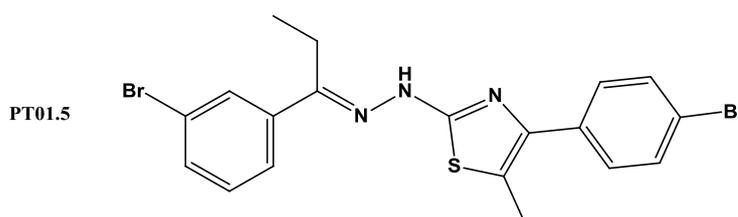
PT01.3: 2-(2-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazinil)-4-(p-tolil)tiazol:

C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>BrN<sub>3</sub>S; 399,04g/mol; Rf (8:2-Hexano:Acetato de etila): 0.63; PF: 192°-196°C; IV (KBr, cm<sup>-1</sup>): 1505.60 (C=N); RMN- <sup>1</sup>H (300 MHz, ppm): 1.064 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.314 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.847 e 2.864 (d, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.322 (s, 1H, NH), 7.211-7.752 (m, 8H, Ar), 7.943 (s, 1H, Tiazol); RMN- <sup>13</sup>C (75.5 MHz, ppm): 10.583 (Alif), 19.587 (Alif), 20.792 (Alif), 103.422 (Tiazol), 122.085-137.042 (Ar), 138.992 (C=N), 169.494 (Tiazol).



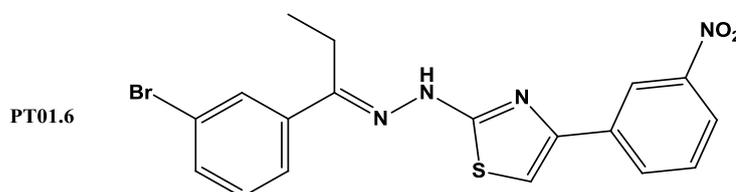
PT01.4: 2-(2-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazinil)-4-(4-metoxifenil)thiazol:

$C_{19}H_{18}BrN_3OS$ ; 416,33g/mol; Rf (8:2-Hexano:Acetato de etila): 0.55; PF: 197°-200°C; IV (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3115.41 (NH), 2954.46 e 2831.76 (CH Ar), 1509.43 (C=N); RMN-  $^1H$  (300 MHz, ppm): 1.062 (t, 3H,  $CH_3$ ), 2.780 (q, 2H,  $CH_2$ ), 3.780 (s, 3H,  $CH_3$ ), 5.708 (s, 1H, NH), 6.964 e 6.993 (d, 2H, Ar), 7.164 (s, 1H, Ar), 7.391 (t, 1H, Ar), 7.57 (dd, 1H, Ar), 7.776 (d, 1H, Ar), 7.79 (d, 2H, Ar), 7.946 (s, 1H, Tiazol); RMN-  $^{13}C$  (75.5 MHz, ppm): 10.655 (Alif), 19.621 (Alif), 55.182 (Alif), 102.258 (Tiazol), 114.048-139.024 (Ar), 158.956 (C=N), 169.494 (Tiazol).



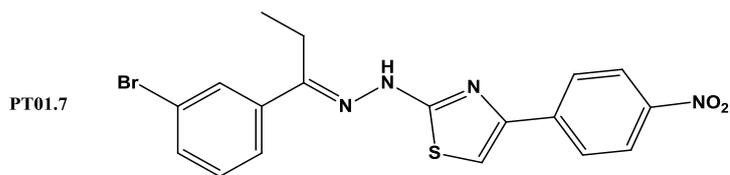
**PT01.5: 4-(4-bromofenil)-2-(2-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazinil)-5-metil-tiazol:**

$C_{19}H_{17}Br_2N_3S$ ; 479,23g/mol; Rf (8:2-Hexano:Acetato de etila): 0.65; PF: 192°-197°C; RMN-  $^1H$  (300 MHz, ppm): 1.051 (t, 3H,  $CH_3$ ), 2.396 (s, 3H,  $CH_3$ ), 2.822 e 2.840 (d, 2H,  $CH_2$ ), 4.637 (s, 1H, NH), 7.385 (t, 1H, Ar), 7.567 e 7.584 (d, 3H, Ar), 7.630 e 7.650 (d, 2H, Ar), 7.753 e 7.771 (d, 1H, Ar), 7.941 (s, 1H, Ar); RMN-  $^{13}C$  (75.5 MHz, ppm): 10.598 (Alif), 12.130 (Alif), 19.587 (Alif), 118.156-131.290 (Ar), 138.955 (C=N), 165.796 (Tiazol).



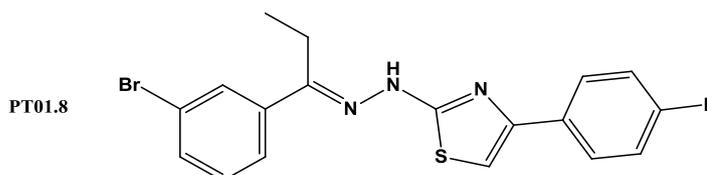
PT01.6: 2-(2-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazinil)-4-(3-nitrofenil)thiazol:

$C_{18}H_{15}BrN_4O_2S$ ; 431,31g/mol; Rf (8:2-Hexano:Acetato de etila): 0.63; PF: 220°-223°C; IV (KBr,  $cm^{-1}$ ): 1530.66 (C=N); RMN-  $^1H$  (300 MHz, ppm): 1.071 (s, 3H,  $CH_3$ ), 2.862 (s, 2H,  $CH_2$ ), 6.83 e 11.6 (s, 1H, NH), 7.393-8.717 (m, 9H, Ar); RMN-  $^{13}C$  (75.5 MHz, ppm): 10.545 (Alif), 19.527 (Alif), 107.098 (Tiazol), 122.070-148.271 (Ar), 149.261 (C=N), 169.903 (Tiazol).



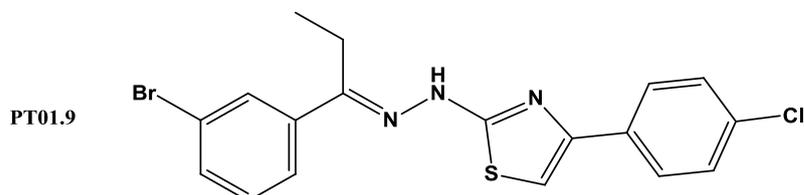
PT01.7: 2-(2-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazinil)-4-(4-nitrofenil)tiazol:

$C_{18}H_{15}BrN_4O_2S$ ; 431,31g/mol; Rf (8:2-Hexano:Acetato de etila): 0.52; PF: 193<sup>o</sup>-196<sup>o</sup>C; IV (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3332.81 (NH), 1508.37 (C=O); RMN-  $^1H$  (300 MHz, ppm): 1.071 (s, 3H,  $CH_3$ ), 2.850 e 2.864 (d, 2H,  $CH_2$ ), 7.397-8.291 (m, 9H, Ar), 11.663 (s, 1H, NH); RMN-  $^{13}C$  (75.5 MHz, ppm): 10.545 (Alif), 19.557 (Alif), 109.181 (Tiazol), 122.085-140.733 (Ar), 146.173 (C=N), 170.015 (Tiazol).



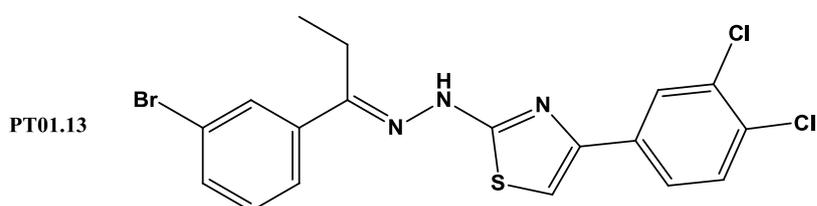
PT01.8: 2-(2-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazinil)-4-(4-fluorofenil)tiazol:

$C_{18}H_{15}BrFN_3S$ ; 404,30g/mol; Rf (8:2-Hexano:Acetato de etila): 0.65; PF: 207<sup>o</sup>-210<sup>o</sup>C; RMN-  $^1H$  (300 MHz, ppm): 1.066 (t, 3H,  $CH_3$ ), 2.85 (q, 2H,  $CH_2$ ), 4.275 (s, 1H, NH), 7.218-7.929 (m, 9H, Ar); RMN-  $^{13}C$  (75.5 MHz, ppm): 10.568 (Alif), 19.505 (Alif), 104.047 (Tiazol), 115.335-139.074 (Ar), 149.164 (C=N), 169.688 (Tiazol).

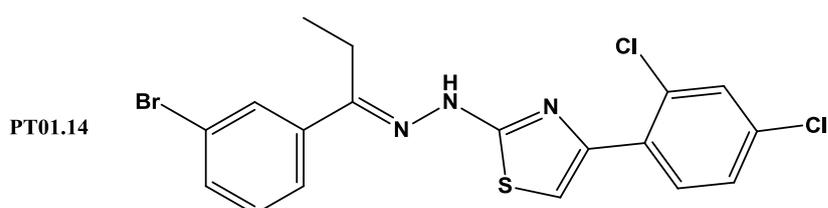


PT01.9: 2-(2-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazinil)-4-(4-clorofenil)tiazol:

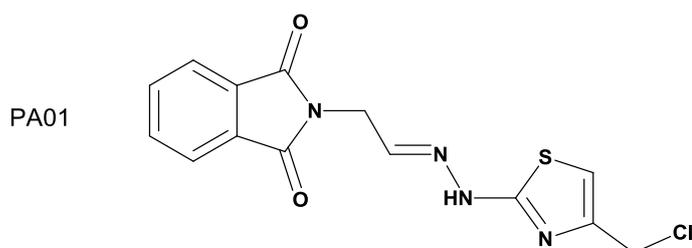
$C_{18}H_{15}BrClN_3S$ ; 420,75g/mol; Rf (8:2-Hexano:Acetato de etila): 0.65; PF: 204<sup>o</sup>-209<sup>o</sup>C; IV (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3922.26 (NH); RMN-  $^1H$  (300 MHz, ppm): 1.096 (t, 3H,  $CH_3$ ), 2.834 (q, 2H,  $CH_2$ ), 6,006 (s, 1H, NH), 7.361-7.926 (m, 9H, Ar); RMN-  $^{13}C$  (75.5 MHz, ppm): 10.624 (Alif), 19.552 (Alif), 105.180 (Tiazol), 122.144-139.055 (Ar), 149.181 (C=N), 169.754 (Tiazol).



PT01.13: 2-(2-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazinil)-4-(3,4-diclorofenil)tiazol:  
 $C_{18}H_{14}BrCl_2N_3S$ ; 455,20g/mol; Rf (8:2-Hexano:Acetato de etila): 0.85; PF: 228°-231°C; IV (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3642.77 e 2971.43 (CH Ar), 1475.20 (C=N); RMN-  $^1H$  (300 MHz, ppm): 1.033 e 1.049 (d, 3H,  $CH_3$ ), 2.822 e 2.845 (d, 2H,  $CH_2$ ), 5.288 (s, 1H, NH), 7.348-8.101 (m, 8H, Ar); RMN-  $^{13}C$  (75.5 MHz, ppm): 10.632 (Alif), 19.583 (Alif), 106.623 (Tiazol), 122.152-147.868 (Ar), 149.265 (C=N), 169.808 (Tiazol).



PT01.14: 2-(2-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazinil)-4-(2,4-diclorofenil)tiazol:  
 $C_{18}H_{14}BrCl_2N_3S$ ; 455,20g/mol; Rf (8:2-Hexano:Acetato de etila): 0.75; PF: 174°-179°C; IV (KBr,  $cm^{-1}$ ): 1518.07 (C=N); RMN-  $^1H$  (300 MHz, ppm): 1.061 (t, 3H,  $CH_3$ ), 2.84 (q, 2H,  $CH_2$ ), 4.041 (s, 1H, NH), 7.378-7.939 (m, 8H, Ar); RMN-  $^{13}C$  (75.5 MHz, ppm): 10.560 (Alif), 19.572 (Alif), 109.836 (Tiazol), 122.077-132.570 (Ar), 139.014 (C=N), 168.772 (Tiazol).



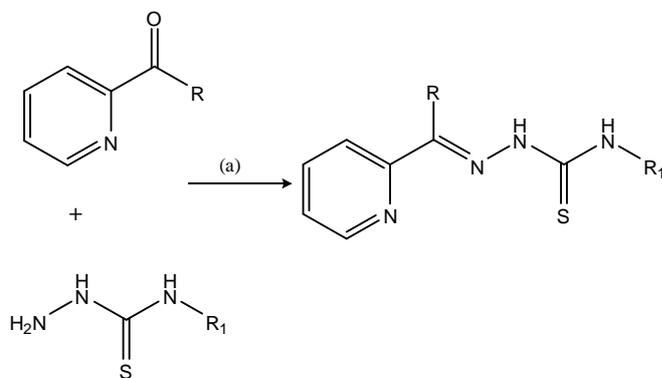
PA01: 2-(2-(2-(4-(clorometil)tiazol-2-il)hidrazona)etil)isoindolina-1,3-dione:  
 $C_{11}H_{11}ClN_4O_2S$ ; 334,78g/mol; Rend. 82%; IV (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3159.36 e 3113.44 (N-H), 1771.01 e 1717.67 (C=O), 1565.77 (C=N); RMN-  $^1H$  (300 MHz, ppm): 4.408 e 4.416

(d, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.528 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.761 (s, 1H, CH, tiazol), 7.32 (s, 1H, CH), 7.861-7.899 (m, 4H, CH Ar), 11.745 (s, 1H, NH); RMN- <sup>13</sup>C (75.5 MHz, ppm): 38 (Alif), 41.747 (Alif), 107.879 (Tiazol), 123.104 (Ar), 131.662 (Ar), 134.512 (Ar), 138.382 (Tiazol), 147.773 (C=N), 167.522 (C=O), 168.631 (C=O).

Síntese da série de hidrazonas piridínicas (EP).

A obtenção das hidrazonas foi realizada através de uma reação de condensação. Reagiu-se a acetil piridina com diferentes tiossemicarbazidas, em meio etanólico, acidificado cataliticamente, em temperatura ambiente, sob agitação durante 90 min (**Esquema 01**). Sendo necessária uma recristalização em meio hidroalcoólico para purificação do produto.

**Esquema 01:** Síntese dos compostos **EP1-3**: Reagentes e condições: (a): ácido acético, etanol, temperatura ambiente, 90 min.

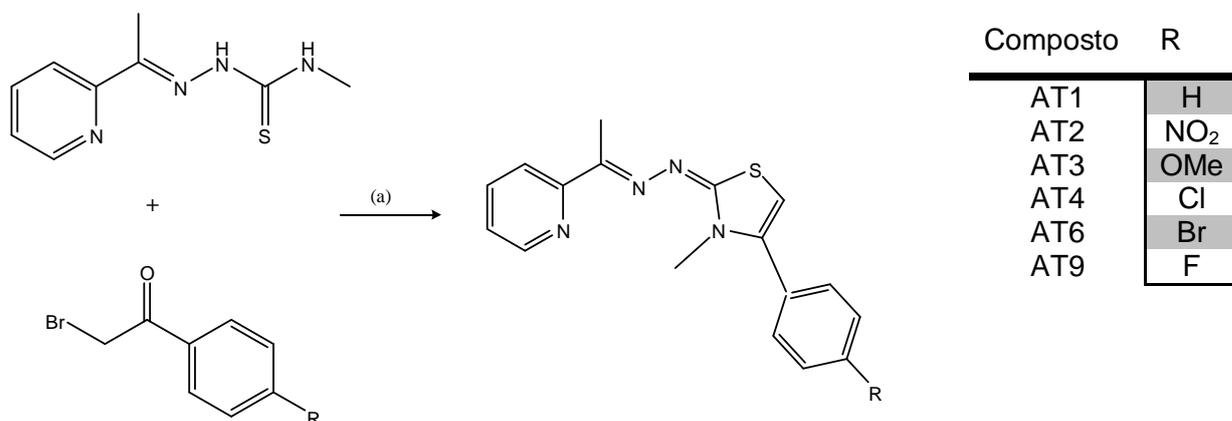


| Composto | R               | R <sub>1</sub>  |
|----------|-----------------|-----------------|
| EP1      | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub> |
| EP2      | H               | CH <sub>3</sub> |
| EP3      | CH <sub>3</sub> | Ph              |

### Síntese dos tiazóis acetilpiridínicos (AT1, AT2, AT3, AT4, AT6, AT9)

A obtenção dos tiazóis consistiu em uma reação de ciclização. Reagiu-se a acetilpiridina tiossemicarbazona (EP1) com diferentes  $\alpha$ -haloacetofenona em meio isopropanólico. O sistema foi submetido à irradiação por ultrassom, em banho-maria, durante 120 minutos (**Esquema 02**). Sendo necessária uma recristalização em meio hidroalcoólico para purificação do produto.

**Esquema 01:** Síntese dos tiazóis: Reagentes e condições: (a) isopropanol, irradiação por ultrassom, 120 min.



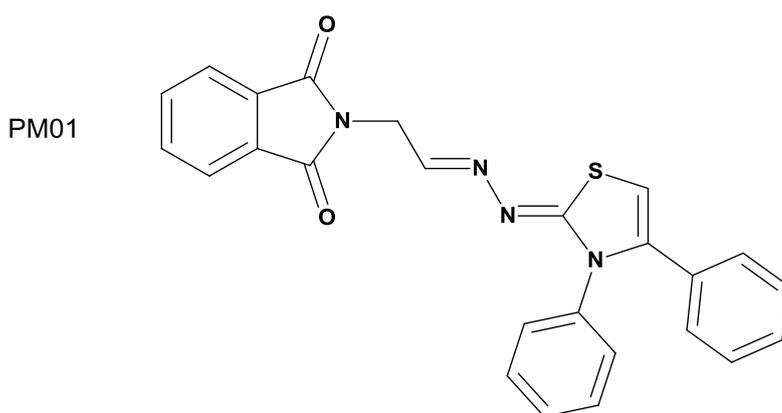
### Síntese das Ftalil-Hidrazona-Tiazol (PM, PM01, PM02, PM03, PM04, PM05, PM06, PM07, PM08, PM10)

Em balão de fundo redondo adicionou-se o Int3b, a respectiva cetona halogenada e isopropanol (q.s.p.s). A mistura reacional foi mantida em ultrassom por 1-2 horas. As reações foram acompanhadas por placa cromatográfica de camada delgada. O precipitado formado foi filtrado em funil sinterizado com água destilada, obtendo-se o produto puro.

- **PM01**= 1,14 mmol de Int3b, 1,14mmol de 2-bromo-acetofenona;
- **PM02**= 1,14 mmol de Int3b, 1,14mmol de 2-bromo-4'-metil-acetofenona;
- **PM03**= 1,14 mmol de Int3b, 1,14mmol de 2-bromo-4'-metoxi-acetofenona;
- **PM04**= 1,14 mmol de Int3b, 1,14mmol de 2-bromo-3'-nitro-acetofenona;
- **PM05**= 1,14 mmol de Int3b, 1,14mmol de 2-bromo-4'-nitro-acetofenona;

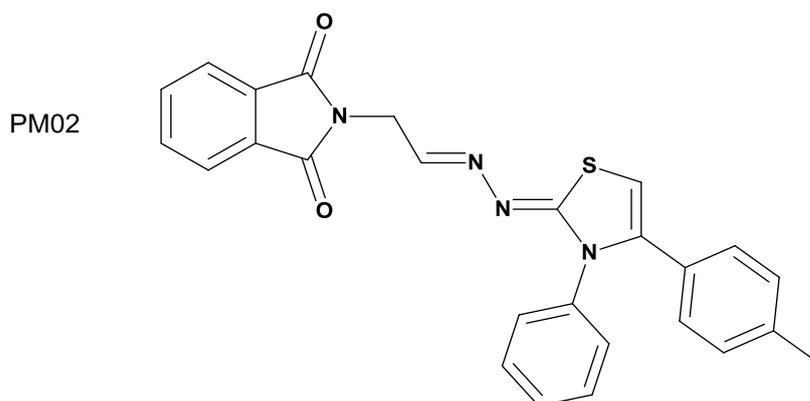
- **PM06**= 1,14 mmol de Int3b, 1,14mmol de 2-bromo-4'-cloro-acetofenona;
- **PM07**= 1,14 mmol de Int3b, 1,14mmol de 2,4'-dibromo-acetofenona;
- **PM08**= 1,14 mmol de Int3b, 1,14mmol de 2-bromo-4'-fluor-acetofenona;
- **PM10**= 1,14 mmol de Int3b, 1,14mmol de 2-bromo-3',4'-dicloro-acetofenona;

a) **PM01**: 2-(2-( (3,4-difeniltiazol-2(3H)-ilideno)hidrazona )etil)isoindolina-1,3-diona



$C_{25}H_{18}N_4O_2S$ . Rend: 56%. **RMN  $^1H$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )**,  $\delta$ : 4.419 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.450 (s, 1H, CH, tiazol), 7.091-7.320 (m, 10H, CH Ar), 7.442 (t, 1H, HC=N), 7.912-7.883 (m, 4H, CH Ar, ftalimida). **RMN  $^{13}C$  (75.5 MHz, DMSO- $d_6$ )**,  $\delta$  : 40.057 (CH<sub>2</sub>), 104.240 (Tiazol), 128.124-144.561 (CH, Ar), 148.239 (Tiazol), 165.965 (Tiazol), 167.514 (C=N), 169.987 (C=O).

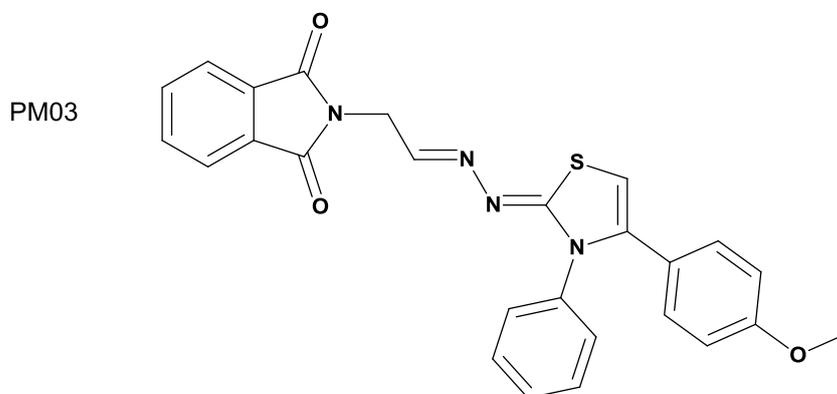
b) **PM02**: 2-(2-((3- fenil-4-(p-tolil)tiazol-2(3H)-ilideno)hidrazona)etil) isoindolina-1 ,3-diona



$C_{26}H_{20}N_4O_2S$ . Rend: 52%. Rf (6:4-Hexano:Acetato de etila): 0,7. PF: 154- 158°C.

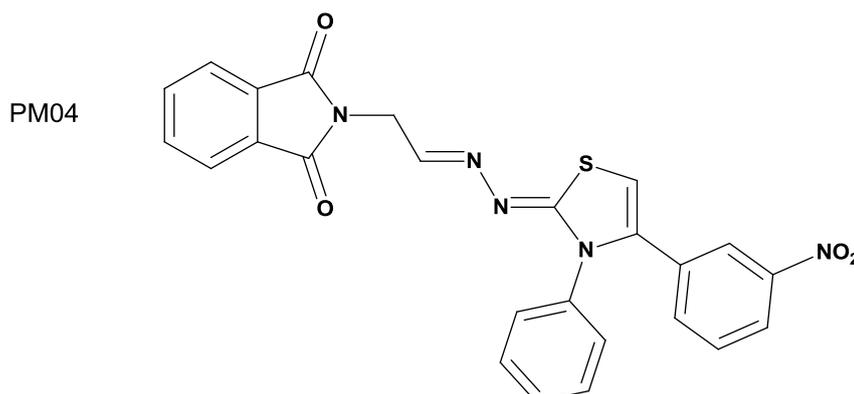
**I.V., principais absorções:** (KBr,  $cm^{-1}$ ): 1712.39 (C=O). **RMN  $^1H$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ :** 2.190 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.418 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.409 (s, 1H, CH tiazol), 6.945-6.986 (m, 4H, CH Ar), 7.167-7.445 (m, 6H, CH Ar), 7.881-7.948 (m, 4H, CH Ar ftalimida); **RMN  $^{13}C$  (75.5 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ :** 20.660 (CH<sub>3</sub>), 38.867 (CH<sub>2</sub>), 100.669 (CH, tiazol), 123.096-139.456 (CH, Ar), 148.208 (C=N).

c) PM03: 2-(2-((4-(4-metoxifenil)-3-feniltiazol-2(3H)-ilideno) hidrazona) etil)isoindolina-1,3-diona



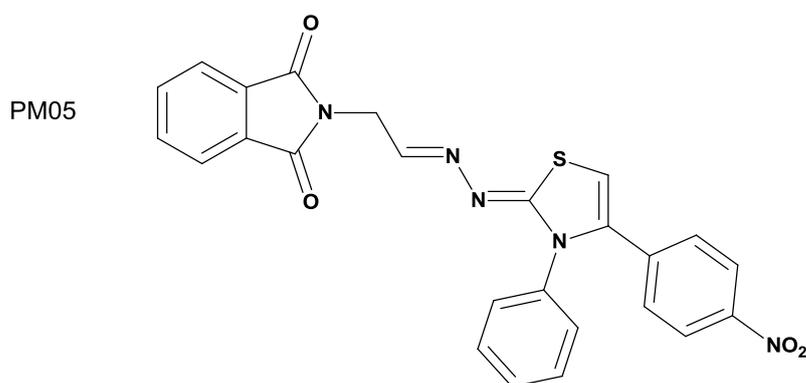
$C_{26}H_{20}N_4O_3S$ . Rend: 54%. PF: 173-175°C. **I.V., principais absorções:** (KBr,  $cm^{-1}$ ): 1713.83 (C=O). **RMN  $^1H$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ :** 4.177 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.436-4.446 (d, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.826-8.104 (m, 14H, Ar). **RMN  $^{13}C$  (75.5 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ :** 40.057 (CH<sub>2</sub>), 123.073-137.536 (Ar), 146.782(Tiazol), 167.492 (C=N), 169.643 (C=O).

d) PM04: 2-(2-((4-(3-nitrofenil)-3-feniltiazol-2(3H)-ilideno)hidrazona) etil) isoindolina-1,3- diona

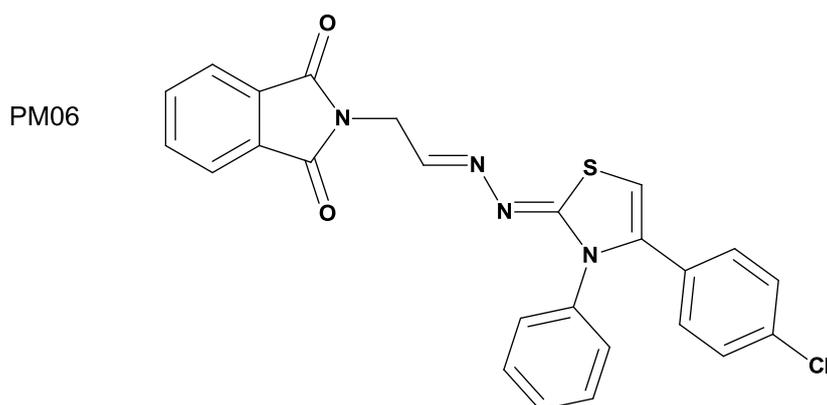


$C_{25}H_{17}N_5O_4S$ . Rend: 49%. Rf (6:4-Hexano:Acetato de etila): 0,64. PF: 154-154°C.

**I.V., principais absorções:** (KBr,  $cm^{-1}$ ): 1712.80 (C=O). **RMN  $^1H$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ :** 4.427-4.436 (d, 2H,  $CH_2$ ), 6.758 (s, 1H, CH tiazol), 7.250-7.377 (m, 5H, CH Ar), 7.477-7.511 (m, 3H, CH Ar), 7.859-7.947 (m, SR, CH Ar), 8.069 (t, 1H, HC=N).



e) PM05: 2-(2-((4-( 4-nitrofenil)-3-feniltiazol-2(3H)-ilideno)hidrazona)etil) isoindolina-1,3- diona  $C_{25}H_{17}N_5O_4S$ . Rend. 46%. Rf= (6:4-Hexano:Acetato de etila): 0,75. PF: 186-189°C. **I.V., principais absorções:** (KBr,  $cm^{-1}$ ): 1713.38 (C=O). **RMN  $^1H$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ :** 4.438 e 4.471 (d, 2H,  $CH_2$ ), 6.778-8.102 (m, 15H, Ar). **RMN  $^{13}C$  (75.5 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ :** 40.057 ( $CH_2$ ), 123.027- 146.689 ( $CH_2$ , Ar),



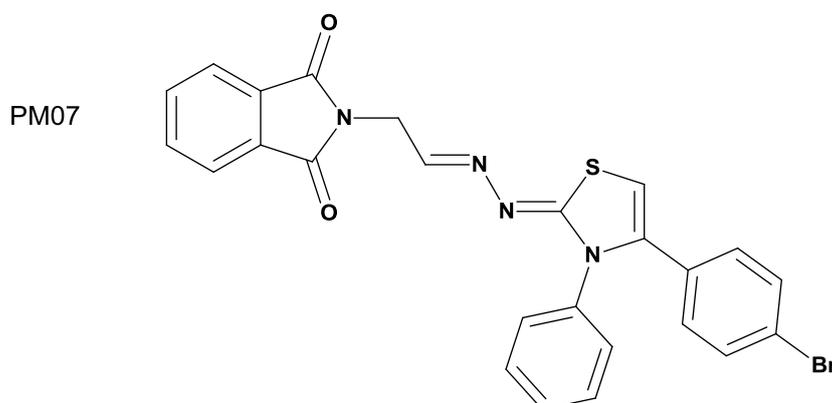
167.484 C=N, Tiazol), 169.605 (C=N), 175.748 (C=O).

f) PM06: 2-(2-((4-( 4-clorofenil)-3- fenil tiazol-2(3H)- iliden o )hidrazona ) etil)isoindolina-1,3- diona  $C_{25}H_{17}ClN_4O_2S$ . Rend. 58%. Rf= (6:4-Hexano:Aeetato de etila): 0,844. PF: 176-179°C. **I.V., principais absorções:** (KBr,  $cm^{-1}$ ): 1717.30 (C=O). **RMN  $^1H$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ :** 4.412 e 4.422 (d, 2H,  $CH_2$ ), 6.503-7.940 (m, 15H, Ar). **RMN**

$^{13}\text{C}$  (75.5 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ),  $\delta$ : 56.021 ( $\text{CH}_2$ ), 101.844 (Tiazol), 123.088-138.682 (Ar). 167.575 ( $\text{C}=\text{N}$ ), 169.888 ( $\text{C}=\text{O}$ ).

g) PM07: 2-(2-((4-(4-brómofenil)-3-feniltiazol-2(3H)-ilideno)hidrazona)etil) isoindolina- 1,3-diona

$\text{C}_{25}\text{H}_{17}\text{BrN}_4\text{O}_2\text{S}$ . Rend. 55%. Rf= (6:4-Hexano:Aeetato de etila): 0,73. PF: 189-193°C. I.V., principais absorções: (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1717.05 ( $\text{C}=\text{O}$ ).

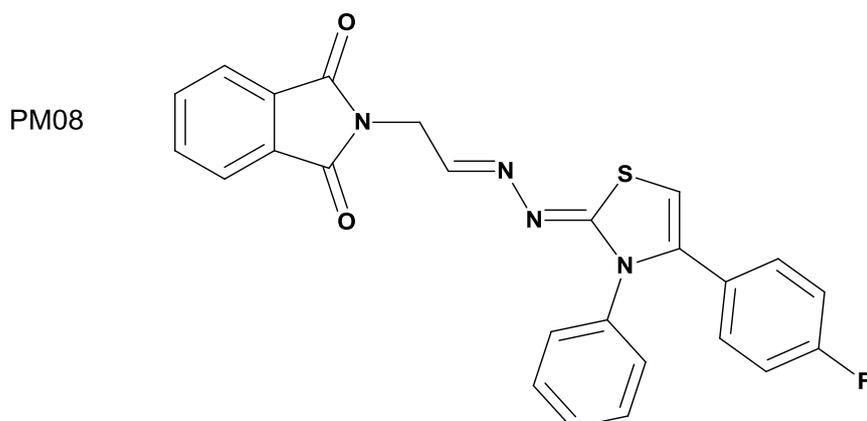


h) PM08: 2-(2-((4-(4-fluorofenil)-3-feniltiazol-2(3H)-ilideno )hidrazona)etil) isoindolina-1,3- diona

$\text{C}_{25}\text{H}_{17}\text{FN}_4\text{O}_2\text{S}$ . Rend. 50%. Rf= (6:4-Hexano:Acetato de etila): 0,63. PF: 176-179°C.

I.V., principais absorções: (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1714.47 ( $\text{C}=\text{O}$ ). RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ),  $\delta$ : 4.430 e 4.420 (d, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 6.465 (s, 1H, CH tiazol), 7.022-7.359 (m, 9H, CH Ar), 7.446 (t, 1H, CH), 7.860-7.947 (m, 4H, CH Ar ftalimida). RMN  $^{13}\text{C}$  (75.5 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ),  $\delta$ : 38.875 ( $\text{CH}_2$ ), 101.279 (CH tiazol),

115.060-138.304 (CH Ar), 148.323 ( $\text{C}=\text{N}$ ), 160.151 e 163.417 ( $\text{C}-\text{F}$ ), 167.583 ( $\text{C}=\text{O}$ ),



169.933 (S-C=N).

- i) PM10: 2-(2-((4-(3,4-diclorofenil)-3- feniltiazol- 2(3H)-ilideno)hidrazona)etil) isoindolina- 1,3-diona  $C_{25}H_{16}Cl_2N_4O_2S$ . Rend. 48%. Rf= (6:4-Hexano:Acetato de etila): 0,89. PF: 154- 157°C. I.V., principais absorções: (KBr,  $cm^{-1}$ ):1714.45 (C=O). RMN  $^1H$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ : 4.448 (s, 2H,  $CH_2$ ), 6.807-7.918 (m, 14H, Ar). RMN  $^{13}C$  (75.5 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ : 40.127 ( $CH_2$ ), 104.590 (Tiazol), 123.109-137.337 (CH, Ar), 149.249 (Tiazol), 167.489 (C=N), 169.619 (C=O).

