

Universidade Federal de Pernambuco
Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica
Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino – NUPIT SG
Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêutica- LINAT

Flaviana Alves dos Santos

**AVALIAÇÃO DE NOVAS MOLÉCULAS POTENCIALMENTE
ANTINEOPLÁSICAS NO MICROAMBIENTE TUMORAL**

RECIFE
2016

Flaviana Alves dos Santos

**AVALIAÇÃO DE NOVAS MOLÉCULAS
POTENCIALMENTE ANTINEOPLÁSICAS NO
MICROAMBIENTE TUMORAL**

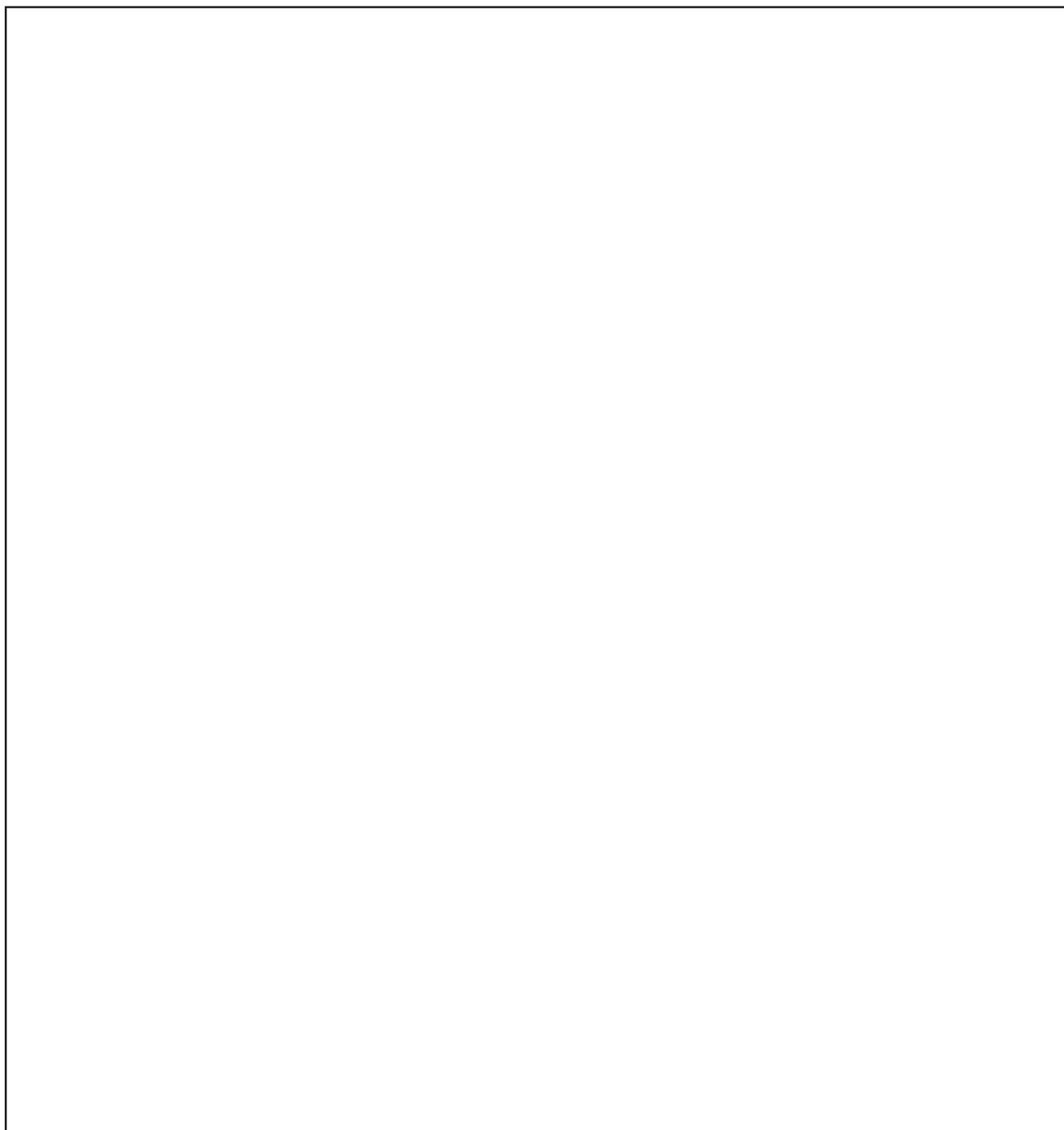
Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do Título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Orientadora Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta
Co-orientador Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

**Recife
2016**

Santos, F. A.	AVALLIAÇÃO DE NOVAS MOLÉCULAS POTENCIALMENTE ANTINEOPLÁSICAS NO MICROAMBIENTE TUMORAL		Mestrado PPGIT-UFPE 2016
---------------	---	--	--------------------------------

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

REITOR

Prof^o. Dr^o. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITORA

Prof^a. Dr^a. Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof^o. Dr^o. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof^a. Dr^a. Maria Eduarda Lacerda de Larrazábal

VICE- DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof^a. Dr^a. Oliane Maria Correia Magalhães

COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Prof^a. Dr^a. Maira Galdino da Rocha Pitta

VICE- COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Prof^o. Dr^o. Luiz Alberto Lira Soares

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

Santos, Flaviana Alves dos

Avaliação de novas moléculas potencialmente antineoplásicas no microambiente tumoral / Flaviana Alves do Santos. – Recife: O Autor, 2016.

94 f.: il.

Orientadores: Maria Galdino da Rocha Pitta, Moacyr Barreto de Melo Rêgo
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Biotecnologia. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, 2016.
Inclui referências e anexos

1. Câncer 2. Farmacologia I. Pitta, Maira Galdino da Rocha II. Rêgo, Moacyr Barreto de Melo III. Título.

616.994

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-127

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Santos, Flaviana Alves dos

Título: Avaliação de novas moléculas potencialmente antineoplásicas no microambiente tumoral

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica

Aprovada em: 07/03/2016

Banca Examinadora

Prof. Dr. Maira Galdino da Rocha Pitta.

Departamento de Bioquímica - UFPE

Assinatura: _____

Dr. Mardonny Bruno de Oliveira Chagas

Programa de pós-graduação em Inovação Terapêutica

Assinatura: _____

Profa. Dra. Mariana Brayner Cavalcanti Freire Bezerra

Departamento de Energia Nuclear -UFPE

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

À Deus, fonte de toda minha fé e força.

À minha mãe **Marleide** pelo amor, compreensão e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

À meu namorado **Marlon Neri**, pela relação de parceria e companheirismo.

À Profa. Dra. **Maira Galdino da Rocha Pitta** por sua orientação neste trabalho, pela confiança, e oportunidades.

Ao Prof. Dr. **Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo** pela orientação neste trabalho, pela confiança a mim dedicada. Muito obrigado pelo seu apoio e por toda sua dedicação e contribuição nesta jornada.

Às Profa. **Dra. Michelly Cristiny Pereira**, minha orientadora de coração por todo apoio e carinho a mim dedicado. Muito obrigada por toda força e toda ajuda. Espero um dia por retribuir todo esse carinho e dedicação.

Obrigada **Mi** e **Moa** por toda sua dedicação, apoio nestes momentos tão fundamentais tanto na minha vida acadêmica quanto para minha formação pessoal.

Ao meu **pai** e **avó** materna, por todo o carinho e amor dedicados a mim enquanto permaneceram em minha vida.

Agradeço imensamente aos amigos do Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas, mas de que uma vida compartilhada, por me aguentarem. Agradeço especialmente aos que mais próximos – **Michael Leal, Thiago Lins, Helena Neta, Mardonny Chagas, Antonio Félix, Kamila Melo, Wanessa Sena, Lidiane Vasconcelos, Valécia de Cassia, Thuanny Mayara, Mayara Souza** e a tanto outros não citadas mais muito amado-imprescindíveis para tornar possível a realização deste trabalho.

Aos amigos que nunca deixaram de acreditar em mim e me deram muito apoio, em especial- **Fagner Cardoso, Danillo Herny, Valeria Moura, Genilson Alves e David Albuquerque**, que levarei para vida.

A **Paulo Germano**, secretário do Programa de Pós-graduação em Inovação terapêutica por ser sempre prestativo e atencioso. Obrigado Paulo.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnol... para Inovação Farmacêutica (INCT_if), pelo apoio financeiro.

“A vitória cabe ao que mais persevera”

(Bonaparte, 2005, p. 44)

RESUMO

Santos, Flaviana. A. **AVALIAÇÃO DE NOVAS MOLÉCULAS POTENCIALMENTE ANTINEOPLÁSICAS NO MICROAMBIENTE TUMORAL**. 2016. 95 p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

O câncer se configura como uma das principais causas de morte no Brasil e no mundo. Apesar dos avanços científicos em relação aos tratamentos disponíveis, estes possuem ainda baixa seletividade e graves efeitos colaterais, além da possibilidade de desenvolvimento dos pacientes desenvolverem resistência a quimioterapia. O objetivo deste trabalho foi de avaliar a atividade anticâncer dos derivados tiofênicos SB-44, SB-83 e SB-200 e do derivado tiazacridínico LPSF/AA-29. Inicialmente avaliou-se o efeito citotóxico destes derivados na linhagem normal de fibroblastos (HFF-1) e em células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) provenientes de voluntários saudáveis, nas doses de 25, 50 e 75 μM , utilizando o método MTT. Posteriormente foi avaliada a citotoxicidade dos derivados em células tumorais de adenocarcinoma de mama (MCF-7) nas doses 1, 10, 25 50 e 75 μM . O efeito destes derivados na indução da morte, na interferência no ciclo celular e na migração também foi avaliado nas doses do IC_{50} . Ademais investigou-se o mecanismo de ação dos compostos que apresentaram maior atividade, na qual foi avaliado a clivagem das caspase 7 e a capacidade de inibição da enzima topoisomerase II. Os fármacos de referências utilizados foram a doxorrubicina e o etoposídeo. Como resultados, foi observado que os compostos SB-44 e SB-83 e LPSF/AA-29 apresentaram seletividade frente às células normais, pois eles só apresentaram atividade citotóxica frente as células tumorais ($\text{IC}_{50} < 75 \mu\text{M}$), enquanto que o derivado SB-200 mostrou-se citotóxico em células normais com IC_{50} 52,13 μM . Todos os compostos tiofênicos e o derivado tiazacridínico LPSF/AA-29 apresentaram atividade citostática frente a linhagem tumoral de mama. O composto SB-200 foi o que apresentou o menor IC_{50} , de 14,86 μM . Todos os derivados tiofênicos aumentaram significativamente a porcentagem de células na fase G0/G1 enquanto que o derivado LPSF/AA-29 não alterou significativamente o ciclo celular das células MCF-7. Somente os compostos SB-83 e LPSF/AA-29 inibiram significativamente a migração celular da linhagem MCF-7 nas doses do IC_{50} e IC_{25} , respectivamente. O composto SB-200 aumentou de 3,5% para 35,35% a porcentagem de células em apoptose comparado as células não tratadas ($p = 0,0002$), enquanto que o composto LPSF/AA-29 aumentou a porcentagem para 56,24% de células em apoptose ($p = 0,0015$). Ademais apenas o composto LPSF/AA-29 conseguiu induzir a clivagem das caspase 7 aumentando a porcentagem de células marcadas de 6,43% (células não tratadas) para 61%, na dose do IC_{50} . Adicionalmente, o composto tiazacridínico LPSF/AA-29 teve a capacidade de inibir a enzima topoisomerase II. Os compostos SB-200 e o LPSF/AA-29 também foram citotóxicos para as células de câncer de mama quando estas foram cultivadas em cultura tridimensional. Desta forma, os resultados obtidos indicam que os compostos SB-200 e LPSF/AA-29 apresentaram potencial atividade antitumoral frente à linhagem de câncer de mama MCF-7, com perspectivas para futuros ensaios in vivo.

Palavras chave: Câncer. Antitumoral. Tiofênicos. Tiazacridínico;

ABSTRACT

SANTOS, FLAVIANA A. **EVALUATION OF NEW POTENTIAL ANTINEOPLASTIC MOLECULES IN THE TUMOR MICROENVIRONMENT.** 2016. Masters dissertation. 95 p. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

Cancer is one of the leading causes of death in Brazil and in the world. Despite scientific advances in the available treatments, they still have low selectivity and serious side effects, besides the possibility of the development of chemotherapy resistance. The aim of this study was to evaluate the anticancer activity of thiophenic derivatives SB-44, SB-83 and SB-200 and the thiazacridine derivative LPSF/AA-29. The cytotoxic effect of these derivatives was evaluated in normal fibroblast cell line (HFF-1) and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy volunteers at doses of 25, 50 and 75 μM using the MTT method. Subsequently, the cytotoxicity of the derivatives was evaluated in breast adenocarcinoma tumor cells (MCF-7) at doses 1, 10, 25, 50 and 75 μM . The effect of these derivatives on cell death induction, cell cycle interference and migration were also evaluated using IC_{50} doses. Subsequently, the mechanism of action of the compounds with better activity was investigated, in which were evaluated caspase 7 cleavage and the ability to inhibit the enzyme topoisomerase II. Doxorubicin and etoposide were used as reference drugs. As results, SB-44 and SB-83 presented selectivity against normal cells, since they only showed cytotoxicity against tumor cells ($\text{IC}_{50} < 75\mu\text{M}$), while SB-200 derivative was cytotoxic in normal cells with $\text{IC}_{50} = 52.13 \mu\text{M}$. All thiophenic compounds and the thiazacridine derivative LPSF/AA-29 showed cytostatic activity against the breast tumor cell line. SB-200 compound had the lowest IC_{50} value (14.86 μM). All thiophenic derivatives significantly increased the percentage of cells in G0/G1 phase, while LPSF/AA-29 derivative did not significantly alter cell cycle progression of MCF-7 cells. Only SB-83 and LPSF/AA-29 significantly inhibited cell migration in MCF-7 cell line at IC_{50} and IC_{25} doses, respectively. The SB-200 compound increased from 3.5% to 35.35% the percentage of cells in apoptosis when compared to untreated cells ($p = 0.0002$). LPSF/AA-29 compound increased the percentage of cells in apoptosis to 56.24% ($p = 0.0015$). In addition, only LPSF/AA-29 induced caspase 7 cleavage by increasing the percentage of labeled cells from 6.43% (untreated cells) to 61% when treated at IC_{50} dose. In addition, the LPSF/AA-29 thiazacridine compound had the ability to inhibit the enzyme topoisomerase II. Compounds SB-200 and LPSF/AA-29 were also potential cytotoxic to breast cancer cells cultured in three-dimensional culture. Thus, results indicate that compounds SB-200 and LPSF/AA-29 showed antitumor activity against MCF-7 breast cancer cell line, with prospects for future *in vivo* trials.

Keywords: Cancer. Antitumor. Thiophenes. Thiazacridine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estágios do processo de carcinogênese tumoral.....	21
Figura 2 - Distribuição proporcional dos tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2016, por sexo, exceto pele não melanoma.	23
Figura 3 - Fatores de riscos associados ao desenvolvimento de câncer no Brasil e no Mundo.	24
Figura 4 - <i>Hallmaker</i> do câncer. Características adquiridas pelas células tumorais para conseguir dar origem as tumores.	28
Figura 5 - Comparação do modelo reducionista tumoral e modelo mais fidedigno de interação dos diversos componentes e células.	29
Figura 6 - Esquema que mostra as diversas funções da matriz extracelular.	30
Figura 7 - Comparação das vantagens do modelo bidimensional como o modelo tridimensional.	32
Figura 8 - Comparação da arquitetura tumoral no modelo bidimensional e no modelo tridimensional.	33
Figura 9 - Distribuição diferencial das células dependente da estrutura tridimensional.....	34
Figura 10 - Estrutura química das tiazacridinas	37
Figura 11 - Estrutura química do Raltitrexed.....	38
Artigo 1	
Figura 1 - Efeito dos derivados tiofênicos na migração celular da linhagem MCF-7.....	58
Figura 2 - Efeito do derivado tiofênico SB-200 na indução da apoptose em MCF-7	58
Figura 3 - Comparação do IC50 do modelo 2D e 3D em MCF-7.....	59
Figura 4 - S1- Indução da caspase 7 na linhagem MCF-7.....	59
Artigo 2	
Figura 1 - Efeito do derivado tiazacridínico na migração celular da linhagem MCF-7.....	74
Figura 2 - Porcentagem de células apoptóticas tratadas com LPSF/AA-29.....	75

Figura 3 - Indução da clivagem de caspase 7 em células tumorais de mama.....	75
Figura 4 - Comparação do IC50 do derivado LPSF/AA-29 do modelo 2D e 3D em MCF-7.....	76
Figura 5 - Inibição da enzima Topoisomerase II pelo derivado LPSF/AA-29.....	76
Figura 6- S1 - Indução da caspase 7 na linhagem MCF-7 tratadas com derivado LPSF/AA-29.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Estrutura química dos derivados testados.....40

Artigo 1

Tabela 1 – Tabela das estruturas químicas dos derivados tiofênicos.....56

Tabela 2 – Valores do IC50 da seletividade e da citotoxicidade dos derivados tiofênicos.....56

Tabela 3 – Efeito dos derivados tiofênicos no ciclo celular.....57

Tabela 4 – Efeito do derivado SB-200 na indução da clivagem de caspase 7.....57

Artigo 2

Tabela 1 – Tabela das estruturas químicas do derivado tiazacridínico LPSF/AA-29.....73

Tabela 2 – Valores do IC50 da seletividade e da citotoxicidade do derivado tiazacridínico...73

Tabela 3 – Efeito do derivado tiazacridínico LPSF/AA-29 no ciclo celular.73

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

AKT- Proteína quinase.

A375 - Linhagem de câncer de pulmão.

CO₂ - Gás carbônico.

DMSO - Dimetilsulfóxico.

DNA - Ácido desoxirribonucleico.

EF2 - Fator de crescimento 2.

EMT - Transição epitelio-mesenquimal.

FGF - Fator de crescimento de fibroblasto.

G0 - Intervalo celular 0.

G1 - Intervalo celular 1.

G2 - Intervalo celular 2.

HeLa - Linhagem de carcinoma de colón do útero.

HL-60 - Linhagem de leucemia aguda.

IC₅₀ - Concentração inibitória de 50%.

INCA– Instituto Nacional do Câncer.

Jurkat - Linhagem de leucemia aguda.

K562 - Linhagem de leucemia aguda.

LPSF - Laboratório de Síntese e Planejamento de Fármacos.

M - Mitose.

MCF-7 - Linhagem de adenocarcinoma de mama.

MDA-MB-231- Linhagem de cancer de mama.

MEC - Matriz Extracelular.

MMP - Metaloproteinases.

MTT - 3-(4,5-Dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide.

NSCLC - Linhagem de câncer de pulmão de não pequenas células.

OMS - Organização Mundial de Saúde.

p - Significância estatística.

PBMC - Células mononucleares do sangue periférico.

PBS - Tampão Salino Fosfato.

PI - Iodeto de Propídeo.

PI3 - Inositol Fosfato 3.

pH - Potencial hidrogeniônico.

PPAR - Receptor Ativado por proliferadores de peroxissomos.

PKB - Proteína quinase B.

RB - Proteína do retinoblastoma.

RAS - Gene da família das proteínas Ras.

S - Intervalo celular S.

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

TGF- β - Fator de crescimento de tumoral beta.

Topo - Topoisomerase.

UV - Ultra-violeta.

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular.

WHO - Organização mundial de Saúde.

XTT - Hidróxido de 2,3-bis- (2-Metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -2 H -Tetrazolium-5-carboxanilida.

3D - Tridimensional

2D - Bidimensional

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo Geral	20
2.1.1	Objetivos Específicos	20
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3.1	Aspectos gerais do câncer.....	21
3.2	Epidemiologia do e fatores de risco associados o Câncer	22
3.3	Bases moleculares do câncer	25
3.4	Microambiente e sua importância na carcinogênese	29
3.5	Comparação do modelo Bidimensional e Tridimensional.....	31
3.6.	Estratégias de tratamento do câncer	34
3.6.1	Derivados tiazacridínicos.....	36
3.6.2	Derivados Tiofênicos.....	37
4	METODOLOGIA.....	40
4.1	Delineamento Experimental	40
4.2	Derivados tiazacridínicos e tiofênicos	40
4.3	Cultivo e manutenção de linhagens	42
4.4	Ensaio de seletividade	42
4.5	Ensaio de citotoxicidade	42
4.6	Avaliação da inibição do Ciclo celular.....	43
4.7	Avaliação da inibição de migração celular da linhagem MCF-7.....	43
4.9	Avaliação da clivagem de caspase 7.....	44
4.10	Ensaio de citotoxicidade Tridimensional.....	45
4.11	Análise estatística	46
5	RESULTADOS	47
	Artigo 1- Artigo submetido	47
	Artigo 2.....	61
6	DISCUSSÃO	79
7	CONCLUSÃO.....	83
8	REFERÊNCIA.....	85
9	Anexos	94
	Anexo 01- Parecer do Comitê de ética humano UFPE-CEP/UFPE.....	94

1. INTRODUÇÃO

O câncer é caracterizado como uma doença progressiva na qual as células tumorais tendem a ser tornar agressivas e se multiplicarem de forma incontrolável dando origem a tumores malignos que podem ser espalhar para parte diferente do local de origem Anticancer Drug Development Unique Aspects of Pharmaceutical Development (ROSAS et al., 2013). Atualmente o câncer é entendido como um conjunto de células que são influenciadas e influenciam o microambiente no qual fazem parte, tanto células não-transformadas como transformadas. Esse microambiente influenciará o desenvolvimento, a progressão e a evasão das células tumorais. Essa visão mais abrangente do câncer aumenta consideravelmente a complexidade do evento neoplásico (HANAHAN; WEINBERG, 2011). O microambiente tumoral possui uma dinâmica diferenciada, sendo regulado pelas demandas das células tumorais que manipulam as células não-cancerígenas a modificar a homeostase tecidual em prol das células tumorais (HANAHAN; WEINBERG, 2000). O microambiente tumoral passa a ser agora entendido como um alvo terapêutico, para induzir a morte das células neoplásicas de forma indireta. Assim buscar moléculas que atuem na alteração do microambiente com a finalidade de desestruturar a rede de sustentação tumoral ganha notoriedade nos últimos anos (CHAMMAS; ONUCHIC, 2010).

No mundo cerca de 12, 7 milhões de pessoas são diagnosticadas com câncer por ano e 7,6 milhões morrem vítimas dessa doença (INCA, 2015). De acordo com dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), somente no Brasil, surgem cerca de 500 mil novos casos com aproximadamente 175 mil mortes anuais decorrentes de complicações ocorridas durante o percurso da doença ou do tratamento. O câncer é um problema de saúde pública em todo o mundo e uma das causas mais relevantes de morbimortalidade entre crianças e adultos (WHO, 2013). O câncer é definido como um conjunto de mais de 200 doenças que têm em comum o crescimento descontrolado de células que invadem os tecidos buscando microambientes que favorecerão a sua progressão e manutenção das células tumorais (ALMEIDA et al., 2005).

O principal método de tratamento para pacientes com câncer é a quimioterapia sistêmica difusa utilizando agentes citostáticos e citotóxicos que induzem a apoptose e ou inibem a progressão do ciclo celular. Os quimioterápicos citostáticos não agem seletivamente, e possuem um baixo índice terapêutico que levam a efeitos colaterais de leve a graves, incluindo a náuseas, mielotoxicidade e cardiotoxicidade (ALMEIDA et al., 2005). Estes efeitos limitam significativamente a utilização da quimioterapia e a falta de especificidade dos quimioterápicos é uma das causa do baixo desempenho dos fármacos de escolha existentes atualmente no

mercado. A eficácia dos fármacos antineoplásicos varia de acordo com o tipo de câncer, com as condições fisiológicas do paciente e com grau ou estágio em que se encontra o tumor (NARANG et al, 2009).

A busca de novos agentes que possam ser utilizados como novos quimioterápicos é relevante, principalmente para aos pacientes que não respondem aos tratamentos disponíveis. Assim o desenvolvimento de novos agentes mais seletivos e eficientes para os diferentes tipos de tumores é de fundamental importância (BARROS et al., 2012). A resistência às drogas contra o câncer é um dos maiores obstáculos que interferem significativamente na eficácia da quimioterapia frente às neoplasias, levando as células a desenvolverem adaptações aos agentes quimioterápicos (GONZÁLEZ-SÁNCHEZ et al., 2011).

A combinação de grupos farmacofóricos distintos em uma mesma entidade química, é denominado hibridização molecular, uma das mais importantes estratégias utilizadas pela Química Medicinal para obtenção de medicamentos mais potentes, eficazes, seguros e confiáveis (PITTA et al., 2013). Assim os derivados tiazacridínicos foram sintetizadas unindo os grupos farmacofóricos o anel tiazolidínico e o anel acridínico. A atividade antitumoral dos compostos da classe das acridinas vem sendo extensivamente estudadas ao longo das últimas décadas (CUI et al., 2016). As acridinas têm sido apontadas como fortes candidatas a fármacos antineoplásicos devido a sua capacidade de ligar-se ao DNA, intercalando-se entre os pares de bases, e inibindo as enzimas topoisomerase I e II, essenciais na divisão celular (KETRON et al., 2012). Esses mecanismos interferem na estrutura e na integridade funcional do genoma alterando ou impedindo o processo vital da progressão celular, promovendo a morte da célula maligna (DENNY, 2002). O anel tiazolidínico atua como agonista dos fatores de transcrição da família dos PPARs. O receptor PPAR γ quando ativado reduz a expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias (MANSURE et al., 2013). Atua assim nas células tumorais reduzindo a proliferação celular, diminuindo a progressão das células na fase G0 - G1 para a fase S, aumenta diferenciação celular e induz apoptose celular (ELROD; SUN, 2008). Os derivados tiofênicos são moléculas heterocíclicas que possuem como grupo farmacofórico o anel tiofênico. Este grupo farmacofórico possui atividade antibacteriana (MABKHOT et al., 2016), antifúngica (SOUZA ET AL, 2012), leishmanicida (RODRIGUES et al., 2015), imunomoduladora (BARROS et al., 2012), antiviral (JIANG et al., 2014) e antineoplásica (MOHAREB et al., 2015).

Para o melhor entendimento do microambiente tumoral o uso da cultura tridimensional vem se expandido nas últimas décadas em estudos de novos agentes anticâncer. Assim a busca de modelos *in vitro* para obtenção de resultados mais próximo dos encontrados *in vivo* servirá

de modelos mais fiéis para o *screening* de novas moléculas (GIRARD et al., 2013). O microambiente tumoral passa a ser agora entendido como um alvo terapêutico, para atingir e induzir a morte das células neoplásicas de forma indireta. Com o modelo tridimensional *in vitro* avalia-se influências que não podem e ser observadas no modelo tradicional bidimensional como, por exemplo, a penetração e difusão da droga no meio. As células dos organismos estão inseridas em um microambiente tridimensional (3D), rodeada por outras células e influenciado por fatores de crescimento e fatores de proliferação solúveis secretado no ambiente extracelular (HUYCK et al., 2012). Além disso, as culturas de células em 2D convencionais limita as comunicações intercelulares. Portanto, é fundamental desenvolver modelos *in vitro* que simulem com mais exatidão o microambiente *in vivo* (SUNG et al., 2013).

Desta forma a atividade antitumoral dos derivados tiofênicos e tiazacridínicos foram submetidos a ensaios de citotoxicidade *in vitro* frente a linhagens de células não tumorais e tumorais para avaliar suas propriedades citotóxica e seletiva. Posteriormente foram avaliados a influência no ciclo celular, na indução da morte celular, na migração celular, na inibição da atividade da enzima topoisomerase II. Também foi avaliada a atividade citotóxica frente ao microambiente tumoral mais mimético, utilizando a matrigel para obter um microambiente tridimensional.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade citotóxica e citostática de derivados tiofênicos e tiazacridínico, *in vitro*, frente células normais e tumorais mantidas sob um microambiente bidimensional e tridimensional.

2.1.1 Objetivos Específicos

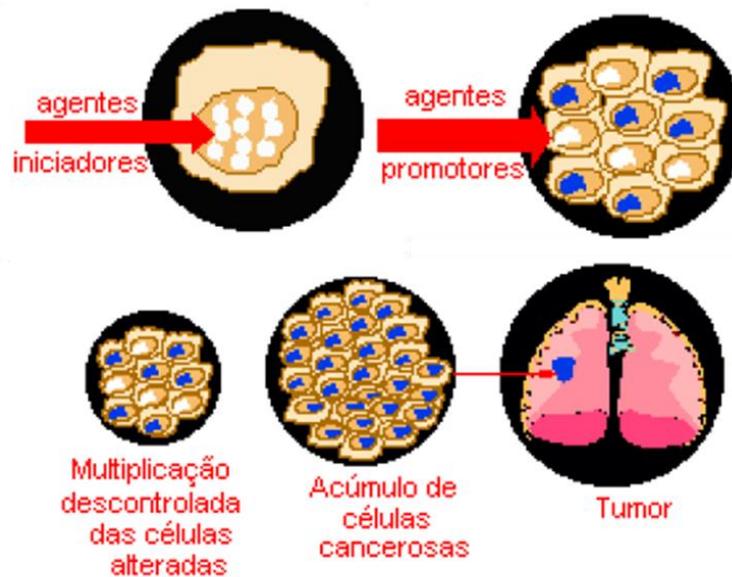
- Avaliar a citotoxicidade de derivados tiazacridínico em células mononucleares de sangue periférico de voluntários saudáveis e dos derivados tiofênicos frente a linhagem de fibroblastos humano não transformadas.
- Avaliar e comparar a citotoxicidade dos derivados tiofênicos e do derivado tiazacridínico células de câncer de mama em microambiente bidimensional e tridimensional.
- Avaliar o efeito dos derivados tiofênicos e tiazacridínico no ciclo celular de células neoplásicas de mama em microambiente bidimensional.
- Avaliar o efeito dos derivados tiofênicos e do derivado LPSF/AA-29 na migração celular das células de mama no microambiente bidimensional.
- Investigar o mecanismo de indução da morte celular dos derivado SB-200 e LPSF/AA-29 na linhagem de mama MCF-7 no microambiente bidimensional.
- Avaliar o efeito do derivado LPSF/AA-29 de inibição da enzima topoisomerase II.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Aspectos gerais do câncer

O câncer é uma denominação para mais de 200 doenças que tem em comum o crescimento descontrolado das células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (INCA, 2012). As células tumorais, em decorrência de alterações genéticas, sofrem modificações nos processos de proliferação e de morte celular, e passam a se dividir rapidamente favorecendo o desenvolvimento e a formação de tumores. O processo de carcinogênese é subdividido em três estágios são eles: iniciação, promoção e progressão como pode ser observado na Figura 1 (ALMEIDA et al., 2005).

Figura 1 - Estágios do processo de carcinogênese tumoral.



Fonte: adaptada de INCA,2015

O processo de iniciação tumoral é caracterizado pela alteração celular provocada por agentes carcinogênicos em genes, ocorre um acúmulo de mutações no DNA celular, em especial em genes que garantem a ordem dos eventos do ciclo celular (BELIZÁRIO, 2002). No entanto, dados recentes mostram que alterações epigenéticas, em lesões pré-neoplásicas em pulmão e cólon, como por exemplo, a metilação do DNA das regiões promotoras pode silenciar genes supressores de tumores esses processos estão ligados aos processos iniciais da carcinogênese (ILIOPOULO et al., 2010).

Na etapa de promoção as células iniciadas necessitam de um contato contínuo com o agente cancerígeno promotor, essa transformação é lenta e gradual. Para a expansão clonal das células iniciadas são necessários o acúmulo de duas a seis mutações para que as células iniciadas consigam alterar os processos de multiplicação, diferenciação e morte celular (ALMEIDA et al., 2005). O terceiro é o último estágio, a progressão tumoral, na qual a célula transformada se multiplica de forma descontrolada neste estágio o processo é irreversível. Nesse estágio o câncer já está instalado, evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença, desta forma já pode ser detectado em exames clínicos e de diagnóstico (CHAMMAS; ONUCHIC, 2010)

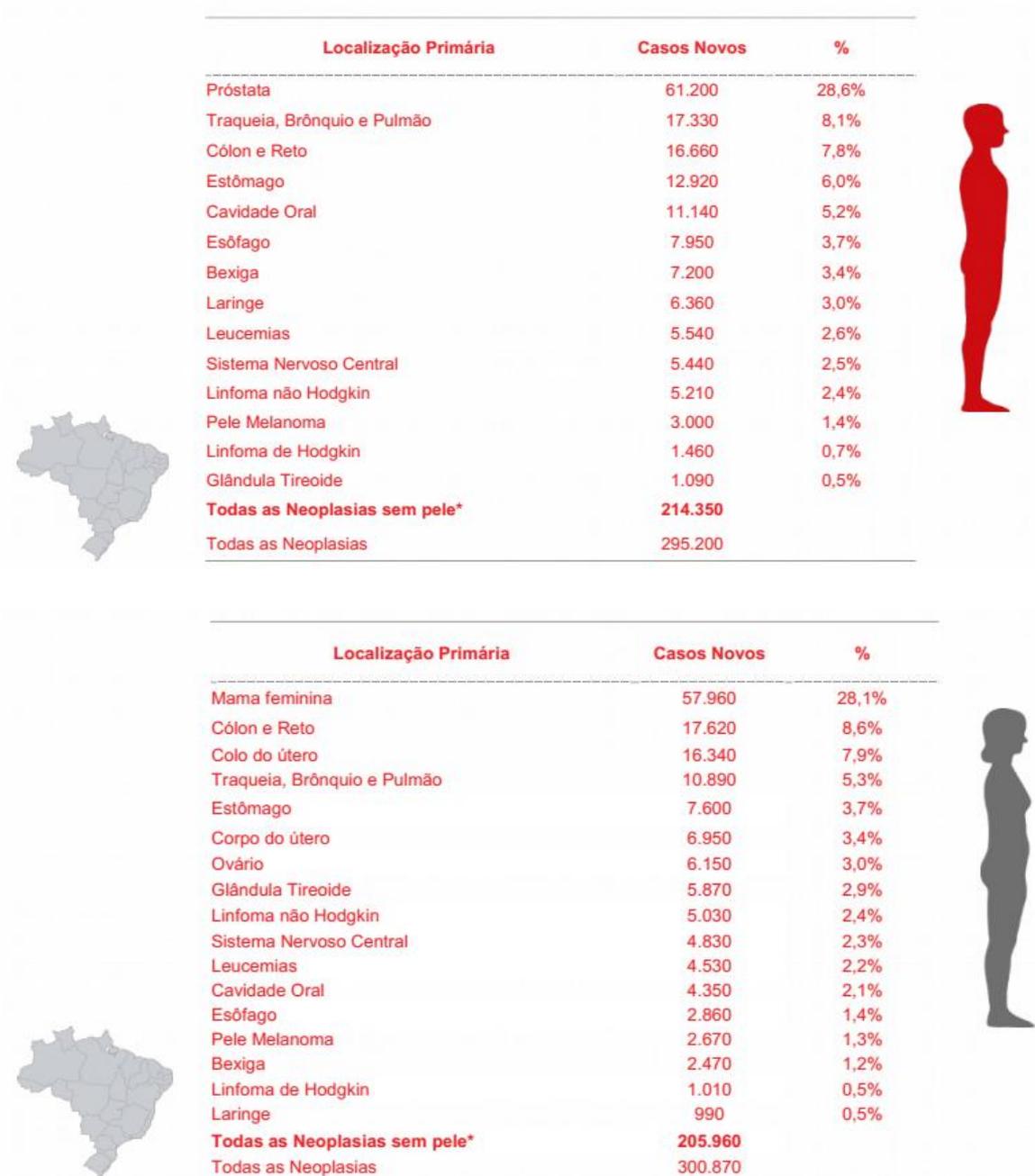
Nessa fase a célula tumoral expressa um fenótipo mais agressivo, podendo desenvolver a capacidade metastatizar, invadir e colonizar outros tecidos. Durante este processo alguns genes são super expressos como é o caso da família de genes RAS, esta mutação está aumentada em muitos tipos tumorais. A inativação de genes supressores tumorais ocorre concomitantemente a esse processo. Algumas mutações conferem às células tumorais uma vantagem de crescimento, bem como o aumento da invasibilidade regional e favorecimento da capacidade de migração das células tumorais para diferentes tecidos (ABEL et al., 2011).

3.2 Epidemiologia do e fatores de risco associados o Câncer

No mundo cerca de 8,7 milhões de pessoas morrem a cada ano em decorrência do desenvolvimento de neoplasias malignas, 13% da população mundial (WHO, 2013). Somente no Brasil, para o ano de 2016 o INCA estima que existirão 596.070 novos casos de câncer surgirão com aproximadamente 175 mil mortes anuais. Muitas das causas de morte no Brasil e no mundo são em decorrência de complicações ocorridas durante o percurso da doença ou do tratamento. O câncer é um problema de saúde pública em todo o mundo e uma das causas mais relevantes de morbimortalidade entre crianças e adultos (INCA, 2015).

Os cânceres mais incidentes no mundo são pulmão, mama, intestino e próstata, já no Brasil os tipos mais incidentes de acordo com o INCA para o ano de 2016/2017 serão entre homens os de próstata (61.200), pulmão (17.330), cólon e reto (16.660), estômago (12.920). Já entre as mulheres, as maiores incidências serão de cânceres de mama (57.960), cólon e reto (17.620), colo do útero (16.340), pulmão (10.860) esses dados podem ser observados na figura 2.

Figura 2 - Distribuição proporcional dos tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2016, por sexo, exceto pele não melanoma.

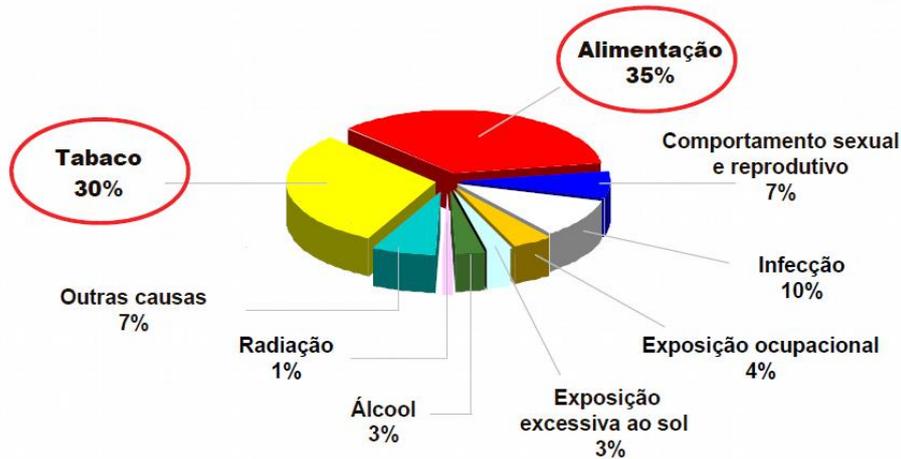


Fonte: INCA, 2015

O câncer é uma doença multifatorial na qual as células adquirem a capacidade de multiplicação e crescem descontroladamente. Os principais fatores externos que levam a essa desordem são os tabagismo, obesidade e hábitos alimentares, o uso de álcool e sedentarismo como demonstrado na Figura 3. O excesso de peso o consumo de carne vermelha e processada são fatores que estão associadas a fatores de riscos para o desenvolvimento de câncer no Brasil

e no mundo. Além de que no Brasil o aumento da expectativa de vida e concomitantemente o aumento da incidência de doenças crônicas levam a um aumento do número de novos casos de câncer (BOING et al., 2007).

Figura 3 - Fatores de riscos associados ao desenvolvimento de câncer no Brasil e no Mundo.



Fonte: Inca, 2015

Alguns tipos de câncer são mais incidentes em classes sócias mais pobres como é o caso do câncer de colo de útero e pênis. No caso do câncer de mama e próstata estes são comumente encontrado em pessoas de classes econômicas mais altas. Isso poderia ser explicado pelo fato de que as pessoas de classes mais elevadas são mais expostas aos fatores de risco como por exemplo, exposição a agentes químicos, físicos e biológicos, bem como a maior exposição a fatores relacionados às disparidades sociais, incluindo condições de trabalho e nutrição (ROSAS et al., 2013).

O câncer de mama é o mais incidente entre mulheres no Brasil, não considerando o câncer de pele não melanoma. O câncer de útero é o terceiro mais incidente no Brasil e a quarta causa de morte mais frequente em mulheres. No entanto no nordeste este câncer é o segundo mais incidente (BRITO et al., 2009). No mundo o câncer de pulmão superou o de mama como principal causa de morte entre as mulheres. Já em homens o câncer de próstata lidera os índices no Brasil e no nordeste, excluindo o câncer de pele não melanoma (TONON et al., 2009).

3.3 Bases moleculares do câncer

Em 2000 os pesquisadores Hanahan e Weinberg propuseram características cruciais para transformação das células normais em células tumorais, no qual as células transformadas adquirem características que favoreceriam o estabelecimento do câncer. Inicialmente foram sugeridas seis alterações essenciais na fisiologia celular que são elas: autosuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade aos sinais de inibição do crescimento, evasão da morte programada, potencial replicativo ilimitado, estímulo a angiogênese, e a invasão a outros tecidos (HANAHAN et al., 2000).

A autosuficiência a sinais de crescimento pode ser adquirida por três mecanismos diferentes que são eles: (i) produção autônoma dos sinais de crescimento, reduzindo assim a sua dependência da estimulação do seu microambiente; (ii) por alteração nos transdutores celulares desses sinais como mutações em participantes destas vias dessa forma eles estariam sempre ativos sem a necessidade de nenhum estímulo; (iii) aumento da expressão de receptores na superfície celular tornando as células mais sensíveis aos níveis normais de fatores de crescimento, que normalmente não provocaria aumento da proliferação celular (ALAHARI et al., 2015; MANTOVANI et al., 2010).

Os sinais antiproliferativos, são outra marca do câncer, e exercem o papel de manutenção da homeostase tecidual. Estes sinais incluem tanto inibidores como proliferadores de crescimento solúveis que podem ficar armazenados tanto na matriz extracelular como também nas membranas de células vizinhas. No entanto as células tumorais se tornam insensíveis aos sinais de inibição de crescimento a partir da inativação de proteínas que regulam o ciclo celular. Como, por exemplo, a proteína RB (Proteína do retinoblastoma) que é hipofosforilada alterando os fatores de transcrição EF2 que controlam a progressão do ciclo celular da fase G1 para a S fazendo com que a células entrem no ciclo celular (MIYATA et al, 2013).

A fuga da apoptose pode ser adquirida através de uma varias de estratégias, uma das formas é a inibição do gene supressor tumoral p53 através de mutações ou mesmo a deleção desse gene. Outra forma é a ativação de vias que inibam a apoptose como por exemplo a ativação da via PI3-quinase AKT/PKB, que transmite sinais de sobrevivência anti-apoptóticos podem estar envolvidos na inibição da apoptose em uma fração substancial dos tumores humanos. Esse desbalanço do mecanismo anti e pró-apoptótico é responsável pela inibição, pois a célula tumoral aumenta a expressão de proteínas anti-apoptóticas como a proteína BCL-2 , inibindo a morte celular das células tumorais (BESSA et al., 2011; SU et al., 2015).

O potencial replicativo e a proliferação desregulada são suficientes para permitir a geração de grandes populações de células tumorais. O evento tumorigênico somente pode ser completado violando a barreira da mortalidade e adquirindo o potencial replicativo ilimitado. O dispositivo de contagem para as gerações de células são os telômeros, que são uma sequência de 6 pares de bases do DNA que se repetem. O encurtamento dos telômeros é um mecanismo de controle do crescimento que leva a morte celular de forma natural. No entanto, as células tumorais superexpressam a enzima telomerase, que adiciona nucleotídeos repetidos sobre as extremidades de DNA, garantindo assim o potencial replicativo ilimitado (PERINI et al, 2008).

Outro mecanismo de sobrevivência das células tumorais são os estímulos para a formação de novos vasos ocorrendo com a liberação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e os fatores de crescimento de fibroblastos (FGF1/2) de forma autócrina e parácrina pelas células tumorais e não tumorais, principalmente as células inflamatórias, ativando assim a angiogênese local. A neovascularização é fundamental para o crescimento tumoral por permitir o aporte de nutrientes e oxigênio para as células em multiplicação. No entanto, os novos vasos formados possuem um arranjo estrutural escasso e por vezes esses vasos são tortuosos e não são eficientes para suprir a necessidade de oxigênio e nutrientes (HANAHAN et al, 1996; QIAN et al, 2010).

A capacidade de invadir tecidos e metastizar, outra característica do câncer, é observada em algumas células que fazem parte da massa tumoral elas podem gerar células pioneiras e mover-se para fora do nicho primário e invadindo tecidos adjacentes, além de colonizar locais distantes nos quais podem ter sucesso na criação de novas colônias. Esses assentamentos distantes do tumor original são a causa de 90% das mortes de câncer em humanos. Inúmeros genes das células precisam ser ativados e desativado para o sucesso das células invasoras, por exemplo, integrina e caderinas que participam da sinalização célula-a-célula e célula-matriz são essenciais para a aquisição da capacidade de invasão e metástase (GOITRE et al., 2012; CANEL et al., 2013).

Hanahan e Weinberg em 2011 publicaram outro artigo reiterando as seis características anteriormente citadas e mostrando que as células normais são recrutadas e formam um estroma associado ao tumor e elas participantes ativamente da tumorigênese. Estas células que fazem parte do estroma contribuem para a iniciação, promoção e progressão tumoral. As seis características do câncer citadas anteriormente por Hanahan e Weinberg permitem entender o crescimento do tumor e a disseminação metastática fornecendo uma base sólida para a compreensão da biologia do câncer. Eles descrevem no artigo lançado em 2011 quatro novas características cruciais para a aquisição das seis capacidades publicadas anteriormente. Novos

recursos da iniciação tumoral são adicionados tais como a sinalização do microambiente tumoral que são fatores cruciais para os diversos fenótipos celulares do câncer.

A uma grande reprogramação metabólica da energia celular, a fim de suportar o crescimento e proliferação celular contínua. Substituindo assim o programa metabólico que opera na maioria dos tecidos normais e alimenta as operações fisiológicas das células associadas (ZHENG, 2012). Outra característica envolve a evasão ativa das células do sistema imunológico no estroma tumoral. Tal capacidade destaca os papéis dualistas do sistema imunológico que tanto podem potencializar como reprimir o desenvolvimento tumoral. As células tumorais manipulam o sistema imunológico para que as células imunológicas favoreçam o desenvolvimento tumoral (PORTA et al., 2009).

A instabilidade genômica, outra marca do câncer, no qual células alteradas geneticamente possuem vantagem por seleção de subclones tumorais mais resistentes. A instabilidade gênica acarreta no desenvolvimento de células com genótipos diferentes dentro na mesma massa tumoral. Assim, a progressão do tumoral pode ser retratada como uma sucessão de expansões clonais, cada um dos quais é desencadeada pela aquisição de um genótipo mutante (LIU; RADISKY; BISSELL, 2005). Portanto, os defeitos de manutenção e reparo do genoma são processos vantajosos para a progressão do tumor causando mutações que podem acelerar o ritmo com que as células tumorais evoluem, pois elas podem acumular genótipos favoráveis para o desenvolvimento tumoral (BERDASCO et al, 2010).

A inflamação contribuir para os processos de iniciação tumoral através do fornecimento de moléculas bioativas para o microambiente do tumor. Estas moléculas incluem fatores de crescimento que sustentam sinalização proliferativa, fatores de sobrevivência, fatores angiogênico, enzimas modificadoras da matriz extracelular que facilitam a angiogênese e sinais de indução que levam à ativação de metástases (DENARDO et al, 2010). Todas as características citadas acima podem ser observadas na figura 4, estas características podem ser desenvolvidas pelas células tumorais em prol do desenvolvimento tumoral.

Figura 4 - Hallmaker do câncer. Características adquiridas pelas células tumorais para conseguir dar origem as tumores.



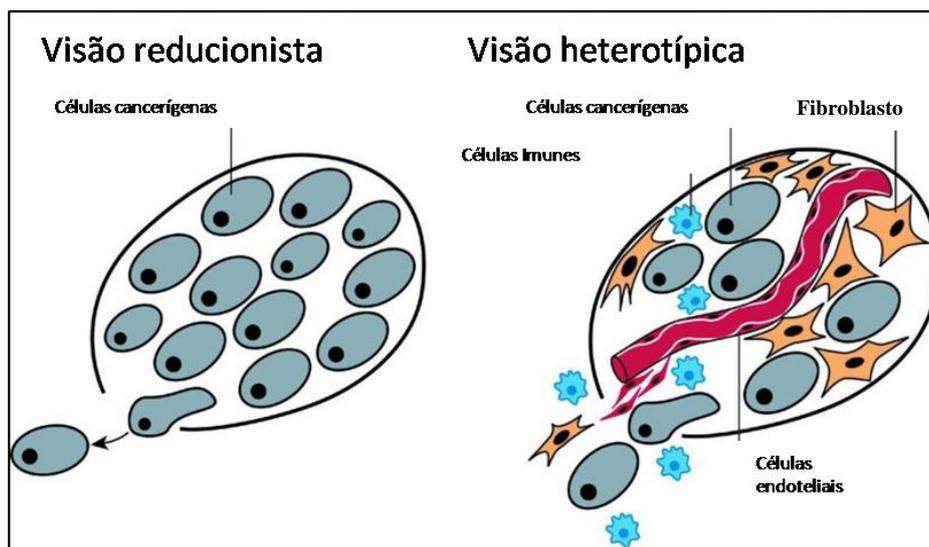
Fonte adaptada: Hanahan et. al., 2011.

As células inflamatórias podem liberar substâncias químicas como espécies reativas de oxigênio que são ativamente mutagênicas. Isto pode afetar as células cancerosas próximas, acelerando sua evolução genética para estados de malignidade aumentada. A inflamação pode conduzir a formas de clones tumorais mais agressivos por comprometer a homeostase do tecido através da acumulação de várias células do sistema imunológico, favorecendo assim a invasão das células tumorais (ATSUMI et al., 2014). Assim para que uma célula consiga realizar metástase são necessários a ativação de inúmeros fatores como: a degradação da matriz extracelular, a transição epitelio-mesenquimal (EMT), angiogênese tumoral, desenvolvimento de um microambiente inflamatório do tumor, além de defeitos no programa de indução de morte celular como também no sucesso no estabelecimento de um nicho metastático efetivo (SU et al., 2015).

Portanto é evidente que o crescimento dentro de um tumor só acontece com a participação de células auxiliares presentes em um tumor ou transientes. Aparentemente os fibroblastos e células endoteliais possuem papel chave na condução da proliferação de células

tumorais e essa interação célula a célula é importante na sinalização de crescimento. A visão reducionista considerava o câncer como um conjunto de células tumorais que se multiplicam descontroladamente atualmente foi revista e uma outra visão é mais aceita, na qual as células tumorais participam de uma complexa rede de ligações entre células tumorais e não tumorais dando origem ao microambiente interligado e altamente complexo (CHAMMAS et al, 2010), esta definições estão exemplificado na Figura 5.

Figura 5 - Comparação do modelo reducionista tumoral e modelo mais fidedigno de interação dos diversos componentes e células.



Fonte adaptada: Hanahan e Weinberg, 2011

3.4 Microambiente e sua importância na carcinogênese

Atualmente muitos artigos sugerem a importância do estroma constituído por macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, como também matriz extracelular e moléculas secretadas por células do estroma tumoral para a sustentação, promoção das células tumorais (ADJEI; BLANKA, 2015). Assim as células não cancerígenas interagem de forma direta ou indireta com as células neoplásicas através da liberação de citocinas ou moléculas sinalizadoras. As células neoplásicas manipulam as células normais que fazem parte do estroma fazendo elas com que adquiram fenótipos favoráveis ao crescimento tumoral, auxiliando assim a progressão tumoral (GANGULY et al, 2014).

A matriz extracelular (MEC) também participa ativamente do no desenvolvimento tumoral pois ela possui agrupamento de elementos intercelulares complexos de macromoléculas, dentre elas componentes fibrosos, proteínas e polissacarídeos que auxiliam

no crescimento tumoral. A MEC é variável dependo do tecido e do estado patológico do tecido, ela é constituída por proteínas e macromoléculas de polissacarídeos tais como o colágeno, elastina, fibronectina, lâminina. Ela é uma estrutura dinâmica constituída de substrato que serve como andaimes de adesão celular e como reservatório de várias proteínas, fatores de crescimento, e moléculas de sinalização como pode ser observado na Figura 6. A MEC não é meramente um suporte físico ela atua influenciando no desenvolvimento, na proliferação, e na migração das células ligadas a ela. Os glicosaminoglicanos, constituintes da MEC, podem atuar como co-fatores ou co-receptores entra a MEC e as células (ROZARIO et al, 2010).

Figura 6- Esquema que mostra as diversas funções da matriz extracelular.



Fonte adaptada; (Rozario et al 2009.)

A degradação da MEC, processo importante na transição epitélio-mesquimal, além de ter papel na remoção da barreira física também contribui com a clivagem do colágeno, que produzindo fragmentos biologicamente ativos, tais como endostatina e tumstatina. Estas moléculas regulam a migração, proliferação e sobrevivência celular. Com a degradação também podem ser liberadas moléculas de sinalização importantes, tais como o TGF- β (Fator de crescimento de tumoral beta), FGF (Fator de Crescimento de Fibroblasto), que atuam na

regulação da angiogênese. Assim na MEC ficam armazenados fatores solúveis funcionando como um reservatório de fatores de crescimento (ROZARIO et al, 2010).

O crescimento tumoral usa dessas ferramentas para estimular a remodelação da matriz extracelular, mediante a expressão de proteases que degradam a MEC, tais como as Metaloproteinase (MMPs). A digestão de componentes da matriz extracelular por MMPs é essencial para a invasão de células endoteliais. As interações das integrinas, moléculas presente na membrana celular, com proteínas da MEC podem potencializar a sinalização que são fundamentais para a angiogênese (KHAWAR et al, 2015). A degradação da MEC para o processo angiogênico também tem sido descrito, pois ocorre a liberação de fatores de crescimento, incluindo o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) (SAMPAIO et al., 2012).

3.5 Comparação do modelo Bidimensional e Tridimensional

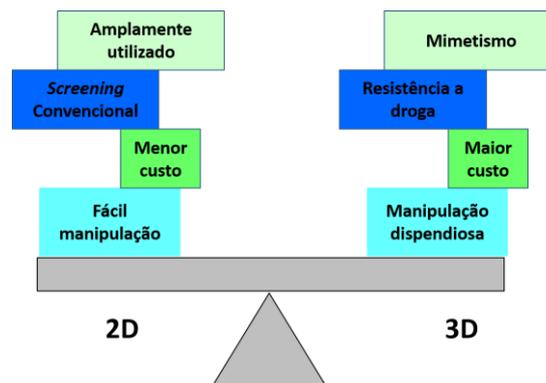
A busca de novas terapias para o tratamento do câncer é um esforço contínuo por investigadores que constituem tanto a indústria farmacêutica como o ambiente acadêmico. Para avaliar a doses terapêuticas, as culturas de células bidimensional (2D) convencionais são utilizadas antes do teste em modelos em animais. No entanto, os modelos de cultura de 2D não mimetizam a complexidade do microambiente tumoral (estroma tumoral). As interações entre as células e o seu microambiente regulam vários processos, tais como a diferenciação celular, proliferação e expressão de genes tanto para a iniciação como a para a progressão tumoral. Existe uma grande lacuna no conhecimento obtido utilizando o modelo 2D *in vitro* e os resultados obtido *in vivo* (HICKMAN et al., 2014).

Dados de modelos 2D raramente predizem a magnitude da eficiência terapêutica *in vivo*. Uma das explicações para estas discrepâncias, é o fato de que *in vivo* células estão dispostas em estruturas tridimensionais (3D). As culturas 3D é uma cultura onde as células são cultivadas em estruturas tridimensionais, que podem ser uma matriz extracelular que mimetiza a matriz MEC ou outra substâncias como alginato que propiciaram o crescimento tridimensional celular (EDMONDSON et al., 2014). A matrigel é uma dessas estruturas onde nela existe proteínas, glicoproteínas que estão presente no microambiente onde as células são cultivadas. As culturas *in vitro* tridimensionais proporcionam um passo adicional que pode fazer a ponte entre a cultura convencional 2D e os modelos animal. Alguns trabalhos demonstram que culturas *in vitro* 3D permitem uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares e celulares facilitando assim o desenvolvimento e rastreamento de novas drogas. O

modelo tridimensional permite não apenas uma maior interação célula-célula, mas também mimetizar os parâmetros biofísicos tais como o transporte de nutrientes e metabólitos e diferentes populações de células (JAGANATHAN et al., 2014).

Para reproduzir o fenótipo do tecido alvo em cultura de células é essencial a obtenção de informações biologicamente confiáveis. Dados acumulados ao longo dos últimos 30 anos demonstraram as limitações significativas de modelo tradicional de monocamadas de células em prever o comportamento das células quando comparadas aos organismos vivos. No entanto, devido ao fato dos modelos bidimensionais serem mais fáceis para manipulação e manutenção, eles ainda representam os modelos mais populares para os estudos *in vitro* utilizados atualmente (MAZZOLENI et al, 2009), figura 7.

Figura 7- Comparação das vantagens do modelo bidimensional como o modelo tridimensional.



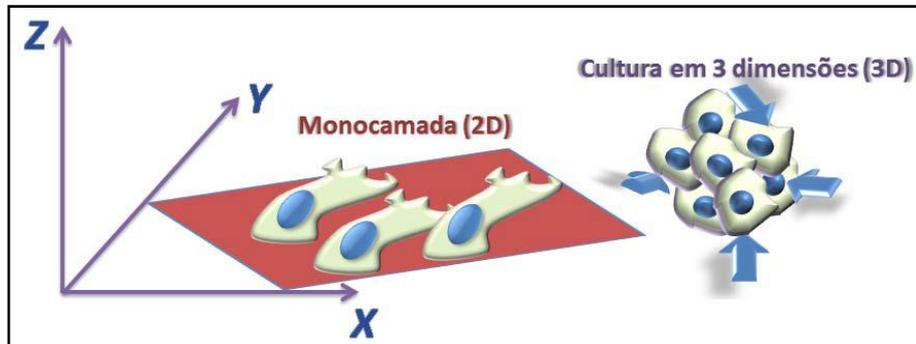
Fonte: Próprio autor.

Pioneiros nesse campo, como Bissell e colaboradores, mostraram que a MEC influencia a retomada da arquitetura original do tecido. Assim as células normais e tumorais respondem aos sinais do ambiente circundante de forma diferente dependendo do microambiente na qual elas estão inseridas (BISSELL, 2010; LO et al., 2012). Alteração no microambiente acarretam em várias modificações entre elas, mudança na estrutura nuclear, na transdução de sinal e na expressão do gene. Essas modificações são bastante distinta quando o mesmo tipo de células é cultivado em modelos 3D ou quando cultivado no modelo convencional em monocamadas (2D) (KENNY et al., 2007;MAZZOLENI et al., 2009).

Mesmo os modelos 2D mais complexos ainda ignoram um fato importante no qual as células de tumores sólidos crescem em três dimensões (Figura 8). A configuração 3D permite assim a mimetização de alterações fisiopatológicas que ocorrem *in vivo*. Ademais alguns estudos demonstraram que a cultura de células 3D de tumores *in vitro* induz um aumento de

células que expressam fenótipos resistentes aos medicamentos em comparação as células cultivadas em cultura 2D convencional (LEUNG et al., 2011).

Figura 8 - Comparação da arquitetura tumoral no modelo bidimensional e no modelo tridimensional.



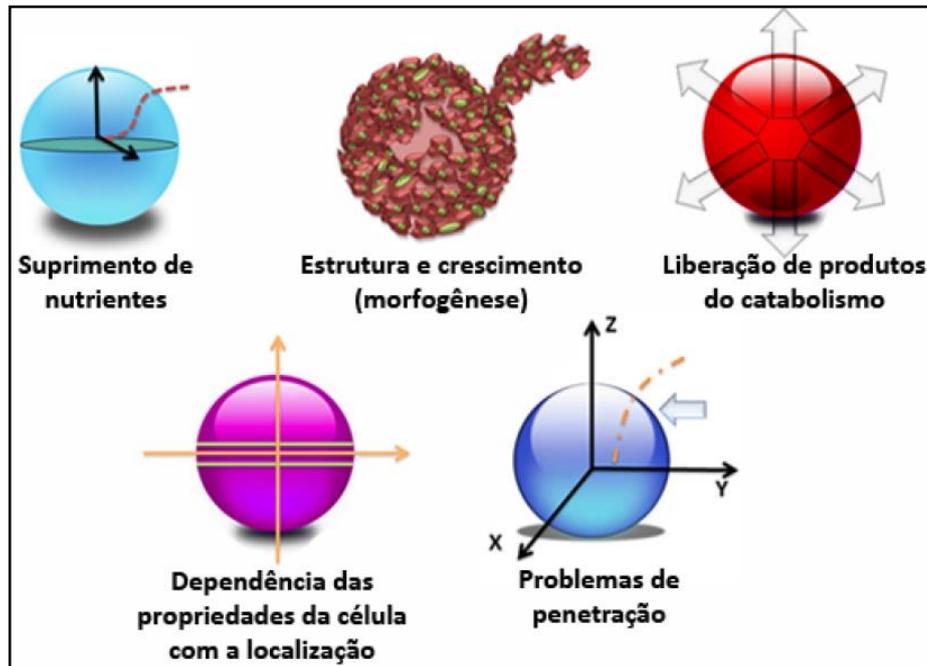
Fonte: Amaral et. al., 2010

No ambiente tridimensional 3D *in vitro* as células não são expostas de maneira semelhante aos diversos constituem o meio. Isso faz com que haja a formação de microambientes com diferentes taxas de nutriente, oxigenação e diferença de pH diferindo assim no interior dos esféricos para a periferia dos mesmos, como pode ser exemplificado na figura 8. Assim estes diversos estímulos presente neste microambiente propiciaram uma seleção de fenótipo. Trabalhos mostram que ambientes hipóxicos, por exemplo, possuem células mais resistentes a quimioterapia (STREHL et al., 2014). Assim muitos trabalhos utilizam a cultura tridimensional para avaliar a sensibilidade a fármacos. A literatura já relata que o crescimento celular e a sensibilidade a fármacos em uma cultura 3D não são necessariamente idênticas, quando comparados a células mantidas em uma cultura 2D, e essas diferenças não seguem um padrão previsível. Portanto uma triagem utilizando condições *in vitro* mais complexas mostra resultados fieis (HUYCK et al, 2012).

O modelo tridimensional traz inovações interessantes, visto que traz uma abordagem que possibilita o estudo tanto de pequenos tumores, pois são regiões avascularizadas, como também tumores de maior densidade celular por mimetizar diferentes graus de oxigenação, alimentação e multiplicação celular (HIRSCHHAEUSER et al., 2010). Nos tumores sólidos, assim como na periferia dos esféricos é o local de maior índice de proliferação celular e este grau de proliferação decai consideravelmente quando comparamos a periferia ao centro do esférico como pode ser evidenciado no esquema da figura 9. Assim a disposição celular no esférico faz com que células sejam exposta a diferentes no fluxo de liberação de catabólitos, tais

variações afetam diretamente a fisiologia celular tanto em esferóides quanto em tumores (AMARAL et al, 2011).

Figura 9- Distribuição diferencial das células dependente da estrutura tridimensional (Amaral et. al. 2010).



Fonte: Amaral et. al., 2010

A cultura de esferóides permite ainda aumentar a complexidade do sistema utilizando sistemas de co-cultivo com diferentes linhagens celulares esse tipo de esferóides é chamado heterólogos. Assim é possível utilizar o co-cultivo para que as células neoplásicas cresçam em associação com diversas outras células como, por exemplo, macrófago e fibroblastos células normais que já fazem parte do microambiente tumoral, desta forma aumentando ainda mais a complexidade do sistema de estudo. Propiciando assim o maior mimetismo tecidual e uma maior interação estroma-parênquima em condições *in vitro*, mimetizando assim características que são inerentes de um arranjo tecidual (MOUGEL et al., 2004;LIU et al., 2010;DU et al., 2015).

3.6. Estratégias de tratamento do câncer

O conhecimento sobre as neoplasias, desde os seus mecanismos iniciais da carcinogênese até os estágios finais desta doença vem se completando com o passar dos anos. No entanto, o

número de novos casos e a morbidade causada pelo câncer aumenta ano após ano consideravelmente. É inegável que as terapias antineoplásicas também evoluíram consideravelmente e atualmente são muito mais eficazes. No entanto, ainda é observada uma crescente taxa de mortalidade e resistência aos fármacos anticâncer e tudo isso sugere a necessidade da busca pelo aperfeiçoamento das terapias atuais e, principalmente, por novas abordagens terapêuticas (INCA, 2014).

A maioria dos agentes quimioterápicos não age exclusivamente em células neoplásicas, possuindo assim um efeito sistêmico podendo levar a diferentes graus de toxicidade, dependendo do tempo de exposição ao medicamento. Dessa forma, é um desafio constante a busca de medicamentos mais eficazes e menos tóxicos para o tratamento do câncer (HADDEN, 2003). O tratamento do câncer é baseado em procedimentos como a quimioterapia, radioterapia, cirurgia e terapia hormonal, e a escolha do procedimento dependerá do tipo de câncer, localização, extensão e das características individuais de cada paciente. A quimioterapia existente atualmente possui várias reações adversas, pois eles atingem células normais que se renovam constantemente como as células da medula óssea, de pelos e da mucosa digestiva. Além de causarem muitos efeitos tóxicos como mielossupressão, aplasia medular, náuseas vômitos entre outros (ADRIANO et al, 2009).

A quimioterapia é utilizada em cerca 60 a 70% dos pacientes com câncer, e na grande maioria das vezes o tratamento é a combinação da quimioterapia com outros procedimentos como a radioterapia. O uso clínico desses fármacos exige que os benefícios sejam confrontados com a toxicidade, na procura de um índice terapêutico favorável.

A maioria dos antitumorais disponíveis atua através da sua interação com proteínas da divisão celular e ou com o DNA diretamente. Na quimioterapia do câncer, tanto a resistência aos medicamentos antitumorais como os efeitos colaterais dos medicamentos atualmente disponíveis levam a contínua procura de novos compostos antineoplásicos. Dessa forma, é um desafio constante a busca de medicamentos mais eficazes e menos tóxicos para o tratamento do câncer (GONZÁLEZ-SÁNCHEZ et al., 2011).

Assim uma das estratégias adotadas por nosso grupo de pesquisa foi a combinação de núcleos farmacofóricos distintos em uma única entidade química, o que é denominado hibridização molecular, uma das mais importantes estratégias utilizadas pela Química Medicinal para obtenção de medicamentos mais potentes, eficazes, seguros e confiáveis (RÊGO et al., 2014).

3.6.1 Derivados tiazacridínicos

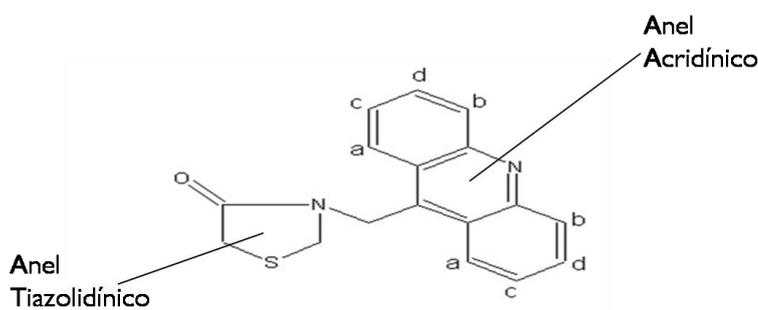
Os derivados tiazacridínicos são sintetizados a partir da ligação do anel tiazolidínico com o anel acridínico dando origem a uma classe de moléculas híbridas (BARROS et al., 2012). O anel tiazolidínico, figura 9, é um agonista sintético dos receptores da família do PPAR (receptores ativados por proliferadores de peroxissoma). Os agonista dos PPARs já são bem estudados em relação a sua atividade antiinflamatória e mais recentemente estão sendo estudados como potenciais alvos para o desenvolvimento de terapias seguras e eficazes para o câncer (HAN, 2010). Os PPARs são receptores citoplasmáticos que quando ativos translocam para o núcleo da célula e ativam diversos genes envolvidos no controle da homeostase energética e diferenciação das células, na proliferação, na apoptose e na inflamação (KESHAMOUNI et al, 2007).

O PPAR γ (Receptor Ativador de Proliferação de Peroxissoma gama) é um excelente alvo para quimioterapia do câncer, não só por causa de sua expressão elevada em vários tumores, mas também porque a ativação de PPAR γ resulta na diminuição da proliferação celular diminuindo a quantidade de células na fase G0-G1. Desta forma ele atua evitando que as células tumorais continuem o ciclo celular com consequência levando a indução da apoptose (KASSOUF et al., 2006; REVELANT et al., 2015).

Os derivados tiazacridínicos, figura 9, são sintetizados a partir da hibridização de dois anéis um anel tiazolidínico e outro anel acridínico. Os compostos que possuem o anel tiazolidínico podem atuar como agonistas do PPAR- γ . Alguns estudos mostram o papel antineoplásico deste receptor, pois, ele atua participando da indução da apoptose celular (ELROD; SUN, 2008). O anel acridínico por sua vez tem a capacidade, por ser uma estrutura planar, de se intercala no DNA impedindo a progressão do ciclo celular e consequentemente levando a morte celular (LIN et al., 2012). A série dos compostos acridínicos é uma das mais importantes classes de compostos heterocíclicos utilizada no tratamento do câncer. Amsacrina é uma aminoacridina bastante estudada, possui atividade citotóxica e é ativa no tratamento de leucemias agudas e linfomas refratários. Embora o seu mecanismo de ação não esteja completamente definido, a amsacrina intercala no DNA e inibe enzimas chaves do processo de divisão celular como a topoisomerase II e a telomerase, resultando em quebras na cadeia dupla do DNA, a parada do ciclo celular resultando na morte celular. A citotoxicidade deste agente é máxima durante a fase S do ciclo celular, quando os níveis de topoisomerase são maiores (KETRON et al., 2012).

A presença de anéis aromáticos fundidos constitui um arcabouço molecular que permite que moléculas intercalantes interajam com as bases nitrogenadas provocando um espaçamento devido ao volume molecular, formando um ângulo de aproximadamente 90° em relação ao eixo do DNA. A intercalação geralmente altera a estrutura do DNA, com o aumento no espaçamento entre as bases e formando assim um trímero constituído pelo intercalante, o DNA e a enzima topoisomerase II. Este trímero seria estabilizado e interromperia a separação das bases nitrogenadas do DNA, necessária à transcrição, induzindo assim a morte celular (ALMEIDA et al., 2005).

Figura 10. Estrutura química das tiazacridinas



Fonte: Próprio autor.

Atualmente, os análogos estruturais da acridina são conhecidos por apresentarem um amplo espectro de atividades biológicas como, por exemplo, apresentam atividade frente a bactérias e protozoários, frente a vírus, a doença de chagas, ao Alzheimer, ao lúpus eritematoso, sobretudo, em estudos de novas moléculas anticâncer (PITTA et al., 2013). Desta forma, a estratégia de fundir estas duas classes de moléculas tem potencial promissor para atuar em diferentes alvos moleculares e apresentar melhor efeito.

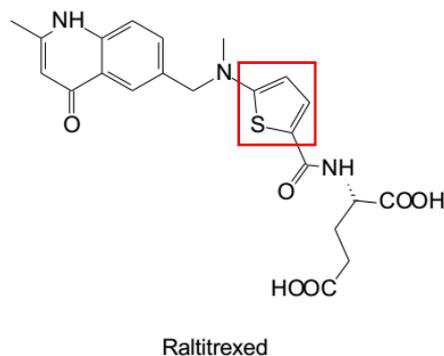
3.6.2 Derivados Tiofênicos

Os derivados tiofênicos fazem parte de uma grande classe de moléculas com muitas aplicações farmacológicas. Alguns medicamentos que possuem este anel, entre eles incluindo a dorlozamida, que é inibidora da anidrase carbônica que atua diminuindo a pressão ocular. A olanzapina e a quetiapina são antipsicóticos utilizados na clínica. O sertaconazol é um antifúngico utilizado em aplicações dermatológicas. Outros derivados que ainda estão em

estudos possuem o anel tiofênico e apresentam-se bastante promissores exibindo atividade anticâncer (MUDUDUDDLA et al., 2015).

Os derivados tiofênicos e entre outros apresentam importante atividade antifúngica, com atividade *in vivo* superior aos fármacos de referência como miconazol e clotrimazol frente à diversos isolados dos gêneros *Candida* e *Trichophyton* (MOURA et. al., 2014). O raltitrexed é um derivado tiofênico (Figura 10) utilizado na clínica como quimioterápico para o tratamento do câncer utilizado como segunda linha de atuação contra câncer de colo retal e de colon de útero (DESMOULIN ET L., 2012). Este quimioterápico é um novo inibidor à base de ácido fólico específico da enzima timidilato sintase e demonstrou eficácia antitumoral alternativamente ao uso do 5-fluorouracil em pacientes com câncer colorretal avançado (CUTSEM, 2002).

Figura 11. Estrutura química do Raltitrexed



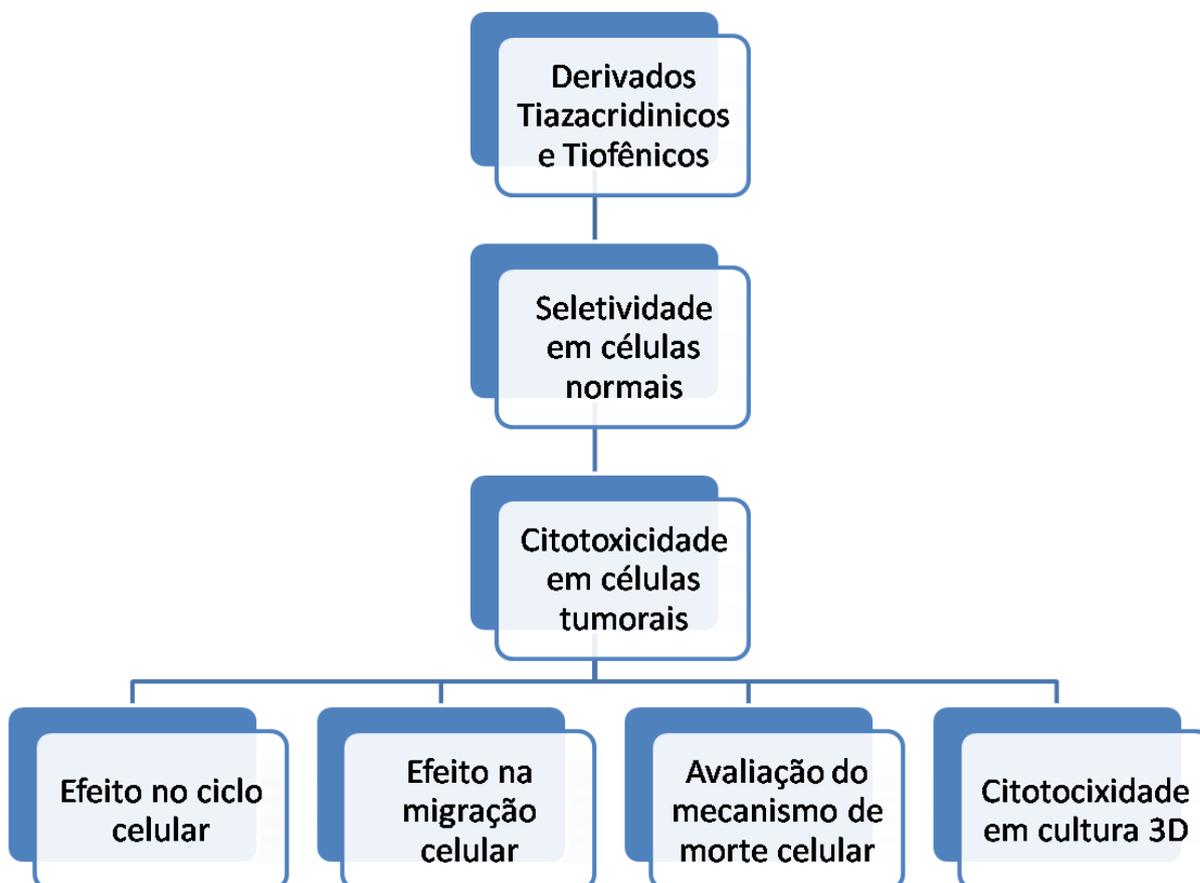
Fonte: Bento, 2013

Estudos *in vitro* mostram que raltitrexed é transportado ativamente para dentro das células e, em seguida, é rapidamente e extensamente metabolizado a uma série de poliglutamatos. Estes metabolitos são significativamente mais potentes na inibição da enzima timidilato sintase do que o fármaco original o 5-fluorouracil (5-FU). Ele fica retido intracelularmente, produzindo efeitos citotóxicos prolongados sem a necessidade de exposição contínua de droga. O raltitrexed é uma alternativa eficaz para a terapia à base de 5-FU em pacientes com câncer de colo retal avançado possuindo uma citotoxicidade a nível aceitável e, ao contrário de 5-FU (CUNNINGHAM, 1998).

Medicamento anticâncer por atuação antifolato são comumente utilizados para tratar uma variedade de tipos de câncer incluindo câncer da mama, de colo retal, bem como tumores da cabeça e pescoço. A resistência aos fármacos pode ser intrínseca ou adquirida durante o curso do tratamento por seleção de células de tumor resistentes, e é a base importante da falha na resposta a estes fármacos e de tanto outros agentes quimioterápicos. Durante o curso da quimioterapia, as células sensíveis a fármacos podem ser substituídas por populações de células tumorais resistentes a drogas (SMITH, 2012). E a resistência a fármacos é um grande problema de saúde pública tanto dentro do câncer como em outras doenças. Assim se faz necessário o estudo de novos fármacos que possam atuar frente as células resistentes tanto isolados como em associação com outros medicamentos (ECHEVERRI et al, 2008).

4. METODOLOGIA

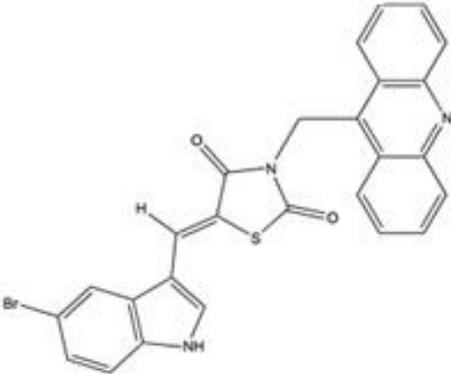
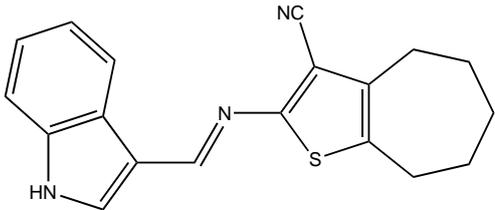
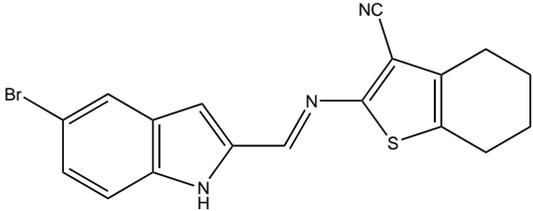
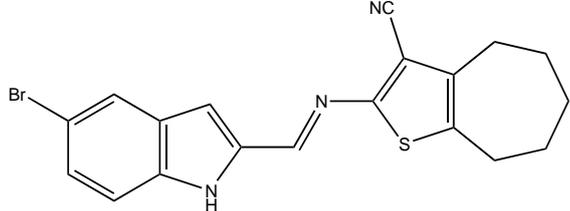
4.1 Delineamento Experimental



4.2 Derivados tiazacridínicos e tiofênicos

Os derivados tiazacridínicos e tiofênicos estudados no presente trabalho foram previamente sintetizados pelo grupo Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF) localizado no Departamento de Antibióticos e pelo Laboratório de Síntese e Vetorização de moléculas localizado na Universidade Federal da Paraíba (UFPB), respectivamente. Na tabela 1 podem ser observado a composição química dos compostos e a estrutura molecular dos derivados. Os derivados foram gentilmente cedidos pela profa. Maria do Carmo A. Lima, prof. Ivan da Rocha Pitta e pelo prof. Francisco Jaime. As respectivas estruturas químicas foram previamente caracterizadas pela pesquisadora Dra Marina Galdino da Rocha Pitta. A concentração final de DMSO, em todos os testes, incluindo os controles, foi no máximo de 0,2%.

Tabela 1: Novos agentes tiazacridínicos e tiofênicos com potencial atividade anticâncer.

Código	Nome químico	Fórmula molecular	Estrutura molecular
LPSF/AA-29	3-Acridina-9-ilmetileno-5-(5-bromo-1 <i>H</i> -indol-3-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona	$C_{26}H_{16}BrN_3O_2S$	
SB-44	1 <i>H</i> -Indol-3-ilmetileno)-(5-6,7,8-4 <i>H</i> -ciclohepta[b]tiofen-2-il)-amina	$C_{19}H_{17}N_3S$	
SB-83	2-[(5-bromo-1 <i>H</i> -indol-2-ilmetileno)-amino]-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[b]tiofeno-3-carbonitrile	$C_{18}H_{14}BrN_3S$	
SB-200	5-Bromo-1 <i>H</i> -Indol-3-ilmetileno)-(5,6,7,8-tetrahydro-4 <i>H</i> -ciclohepta[b]tiofen-2-il)-amina	$C_{19}H_{16}BrN_3S$	

4.3 Cultivo e manutenção de linhagens

As células da linhagem tumoral de mama MCF-7 foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino, 10 mM de HEPES e 1% U/mL de Penicilina/Estreptomicina. As células da linhagem não tumoral imortalizada de fibroblastos humanos (HFF-1) foram cultivadas em meio DMEN suplementado com 20 % de Soro Bovino Fetal, Bicarbonato de sódio e 1% U/mL de Penicilina/Estreptomicina. Todas as linhagens foram mantidas em estufa de CO₂ 5% a 37°C e foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ).

4.4 Ensaios de seletividade

Células mononucleares de sangue periférico (PBMC, do inglês *Peripheral blood mononuclear cells*) foram obtidas de voluntários saudáveis, não fumantes e que não haviam ingerido bebida alcoólica por pelo menos 2 dias antes da coleta e que não fazem uso de remédios de usos contínuo. As PBMCs foram isoladas através de método padrão de centrifugação por gradiente de densidade com Ficoll-Hypaque (GE Health Care). Após a separação por ficoll as células foram lavadas por 2 vezes e posteriormente contadas em Câmara de Neubauer, a viabilidade foi determinada pelo método de exclusão azul de tripan. Os ensaios prosseguiram apenas quando a viabilidade celular foi superior a 98%. As células foram plaqueadas em placa de 96 poços (10⁶ células/poço) e mantidas em estufa de atmosfera úmida a 37°C, com 5% de CO₂. Após 24 horas, foram adicionados o derivado LPSF/AA-29 nas concentrações de 1, 10, 25, 50, 75 e 100 µM. As placas incubadas por 48 horas e depois foi adicionado o sal de tetrazolium (MTT) após 3 horas de incubação em estufa úmida a 37°C, com 5% de CO₂ foi adicionado o detergente Lauril Sulfato de Sódio (SDS) e as placas foram novamente incubadas por no mínimo 18 horas para completa solubilização. A leitura das placas foi realizada utilizando o aparelho Biotek EL 808 na absorbância a 570 nm. Todos os voluntários assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE (CEP/CCS/UFPE N° 11006/12).

4.5 Ensaio de citotoxicidade

As células neoplásicas MCF-7 e HFF-1 foram plaqueadas na concentração de 10⁴ células/100µl. Os derivados tiofênico e o derivado tiazacridínico foram adicionadas nas

concentrações de 1, 10, 25, 50 e 75 μM e de Doxorrubicina nas concentrações de 500nM, 750nM, 1, 5, 10 e 25 μM . As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO_2 a 37°C submetidas ao método de MTT. Em seguida foi adicionado 20 μl da solução de MTT, e as placas foram incubadas por 3 horas. A absorbância em espectrofotômetro de placa a 570 nm foi lida após dissolução do precipitado com SDS. Em todos os ensaios, foram incluídos controles não tratados e contendo apenas DMSO o veículo de administração dos compostos, na mesma concentração presente nos compostos nas soluções finais (0,1% e 0,2%).

4.5.1. Cálculo do índice de seletividade

O cálculo do índice de seletividade foi calculado utilizando a fórmula $\text{IC}_{50} \text{ HFF-1} / \text{IC}_{50} \text{ Tumoral}$ avaliar o índice de a seletividade (IS) em uma linhagem de células normais. Cada avaliação da viabilidade dos compostos foi realizada em triplicata, e a média da viabilidade de cada experimento foi calculada com base no valor obtido para o controle contendo DMSO.

4.6 Avaliação da inibição do Ciclo celular

As células MCF-7 foram distribuídas em placas de 6 poços numa concentração de 5×10^5 células por poço e incubadas por 24 horas após esse período elas foram tratadas na concentração do IC_{50} . Após 48 horas de tratamento as células foram tripsinizadas e lavadas 2 vezes com PBS 1x e fixadas em álcool 70% por 2 horas a temperatura ambiente e armazenadas a -20°C. Em uma segunda etapa, as células foram lavadas 2 vezes com PBS 1x e marcadas com iodeto de propídeo (5 mg/mL)/ RNase A (0,25 mg/mL) em PBS 1x por 20 minutos no gelo e protegido da luz. O conteúdo de DNA celular foi quantificado através de citometria de fluxo utilizando o citômetro de fluxo Accuri C6, onde a porcentagem de DNA em cada fase do ciclo foi calculada utilizando o programa C6 software (Becton, Dickinson and Company, USA).

4.7 Avaliação da inibição de migração celular da linhagem MCF-7

As células foram distribuídas em placas de seis poços numa densidade de 5×10^4 por poço em placas de 24 poços e incubadas à 37 °C sob atmosfera de 5% de CO_2 por 24 horas. Após atingir a confluência de 90%, o meio foi aspirado e duas lavagens com PBS 1X foram

realizadas, em seguida, foram feitas duas linhas de marcação (estrias) perpendiculares utilizando uma pipeta P1000. Após o procedimento de marcação das estrias as células foram tratadas com meio completo, DMSO 0,1% (controle), SB-44, SB-83 e SB-200 nas concentrações previamente determinadas pelo IC₅₀. Para o derivado LPSF/AA-29 foi testados o IC₂₅ e o IC₅₀. Os poços forma fotografadas no microscópio invertido (t=0) e incubadas por 48 horas (t = 48) nas condições citadas acima. O tempo 48 horas foram escolhidos após um teste inicial pois, somente nesse tempo foi observado uma migração significativa entre os poços tratados e não tratados para a linhagem MCF-7 testadas nesse ensaio. Os dados do ensaio de migração foram calculados utilizando as fotos para obter o tamanho da área final e inicial utilizando o programa ImageJ (Versão 1.49) (NIH, USA).

4.8 Avaliação da indução de morte utilizando Laranja de acridina/DAPI

A indução de morte após o tratamento foi avaliada por dupla coloração de fluorescência com DAPI (Sigma) e laranja de acridina (AO). As células MCF-7 foram tratadas com os compostos SB-200 (IC₅₀=14,86 µM) e LPSF/AA-29 (IC₅₀= 40,76 µM) durante 48 horas e depois as células foram lavadas 2 vezes com PBS 1X e fixadas com paraformaldeído a 4% durante 20 minutos. Posteriormente as células foram coradas com AO (8,5 ug /ml) e o corante nuclear com DAPI (5 ug /ml) durante 15 min no escuro e lavadas novamente por 2 vezes com PBS 1x. Posteriormente as lâminas foram fotografadas com a objetiva ampliação de 10 vezes utilizando um microscópio de fluorescência. As células em apoptose exibem um núcleo verde-claro em que a condensação da cromatina foi observada como áreas em tons de verdes mais densas. As células que entraram e processos de morte celular que eram caracterizadas pela condensação da cromatina. As células foram contadas e foi calculado a razão de células com núcleos picnóticos e fortemente marcados em relação as células que não apresentavam essas características, ou seja, com o núcleo celular preservado após o tratamento. Foram contadas todas as células de 10 campos com o auxílio do programa ImageJ (Versão 1.49) (NIH, USA).

4.9 Avaliação da clivagem de caspase 7

As células MCF-7 foram cultivadas 5×10^5 por poço em placas de 6 poços e incubadas à 37 °C sob atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas. Posteriormente as células foram tratadas na

concentração do IC₅₀ com os compostos SB-200 e LPSF/AA-29e após 48 horas as células foram tripsinizadas e lavadas 2 vezes com PBS 1x. Posteriormente foram ressuspensas em meio completo e marcadas com o reagente Cell Event® Caspase 3/7 Green por 30 minutos e incubadas à 37 °C a 5% de CO₂ e marcada por 5 minutos com SYTOX® AADvanced para marcar as células necróticas. Após essa marcação as células foram analisadas no citômetro ATTUNE. E posteriormente os resultados foram analisados utilizando o software flowjow. O reagente Cell Event® Caspase 3/7 Green marca tanto a caspase 3 quanto a 7 clivadas no entanto a linhagem MCF-7 não expressa a proteína caspase 3 (JÄNIKE, 2008) assim nesta linhagem foi observados somente a indução do tratamento na clivagem de caspase 7.

4.10 Ensaio de citotoxicidade Tridimensional

A matrigel é matriz celular é obtida de uma linhagem de sarcoma de camundongo (Engelbreth-Holm-Swarm), que é tratada e vendida comercialmente. Para a utilização da matrigel antes do ensaio é necessário deixa na geladeira a 4°C por 14 horas para seu completo descongelamento. Para realização da cultura tridimensional, células foram cultivadas em monocamada até atingirem 80% de confluência. Em seguida, as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 2000 r.p.m por 3 minutos, o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas e contadas. Posteriormente, a suspensão de células foi misturada com o meio completo e 10% de Matrigel (BD Matrigel TM Matrix - BD Biosciences, Califórnia, EUA) e plaqueadas em placas com fundo cônico (formato em U). Em seguida, as placas contendo a células foram centrifugadas a 200g por 3 minutos a temperatura ambiente e em seguida levadas para a estufa a 37°C. A quantidade final de células foi 3x10³ células/poço. As células foram mantidas em estufa a 5 % de CO₂ a 37°C, com adição de meio suplementado com soro bovino fetal a cada 2 dias. Após 5 dias de crescimento as células foram tratadas durante 72 horas com o SB-200 nas concentrações de 0,05, 1, 5, 10 e 30 µM e para o LPSF/AA-29 e a Doxorubicina nas concentrações de 1, 10, 25, 50 e 75 µM. Após esse intervalo de tempo foi adicionado a adicionados 15 µl do reagente MTT por poço no escuro e a placa de voltou para a estufa a 37 °C por mais 24 horas. Posteriormente foi adicionado o detergente Lauril sulfato de sódio (SDS) a 37 ° C 150 µl por poço e novamente a placa volto a estufa para ser incubada por 24 horas a temperatura de 37 °C para completa solubilizar dos cristais de formazan. A placa foi lida em um leitor de placas Biotek EL 808 na absorbância a 570 nm.

4.11 Ensaio de inibição da atividade da enzima topoisomerase II

A avaliação da atividade de inibição da enzima topoisomerase II foi avaliada somente para o derivado LPSF/AA-29. Esta avaliação foi realizada utilizando o kit Topoisomerase II Drug Screening (plasmid based) (Topo GEN, EUA). O DNA (pHOT1 plasmídeo) super-enovelado, componente do kit, foi incubado com a enzima topoisomerase II humana (5 unidades) na presença e na ausência de LPSF/AA-29(50 e 100 μM) e dos controles do veículo (DMSO 0,2%) e do etoposídeo (50 μM) como controle positivo. A eletroforese em gel de agarose (1%) foi realizada com o tampão acetato de Tris-EDTA (TAE), com voltagem de 2V/cm por 50 minutos. Após a corrida, o gel foi corado com 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de brometo de etídio durante 15 minutos e fotografado sob a luz ultravioleta (UV). A análise quantitativa das bandas do gel foi realizada utilizando o programa ImageJ (Versão 1.49) (NIH, USA).

4.11 Análise estatística

Os cálculos de média, desvio padrão e viabilidade foram realizados utilizando o programa Excel. Os resultados de foram analisados por teste t (Student) e os gráficos foram feitos utilizando-se o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). A diferença estatística foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

6. Artigo 1- Artigo submetido

THIOPHENE DERIVATIVES INDUCED CELL CYCLE ARREST AND INHIBITED CELL MIGRATION IN BREAST CANCER MCF-7 CELLS

Flaviana Alves dos Santos^{a#}; Michelly Cristiny Pereira^{a*#}; Tiago Bento de Oliveira^b; Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior^c; Maria do Carmo Oliveira de Lima^b; Marina Galdino da Rocha Pitta^b; Ivan da Rocha Pitta^{a,b}; Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo^a; Maira Galdino da Rocha Pitta^a.

a - Laboratory for Immunomodulation and New Therapeutic Approaches, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil.

b - Laboratory for Planning and Drug Synthesis, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil.

c- Laboratory Synthesis and vectoring molecules, Department of Biological Sciences, State University of Paraíba(UFPB), João Pessoa, PB, Brazil.

The authors contributed equally.

**Corresponding author: Michelly Cristiny Pereira*

E-mail: michelly2305@yahoo.com.br

Address: Rua Tereza Amélia, s/n, Cidade Universitária, UFPE Cidade Universitária/50670-901. Recife, PE- Brazil.

Abstract: Substitutions in thiophene structure give rise new derivatives with different biological and pharmacological activities. The present study investigated the cytotoxicity activity of some thiophene derivatives in breast cancer cells maintained in two-dimensional (2D) or in three-dimensional (3D) culture and evaluate the anticancer mechanism of these compounds. Cytotoxicity assays were performed against untransformed cells and against breast cancer cell MCF-7. Apoptosis analysis and in vitro migration assay were also performed to elucidate the mechanism of anticancer activity. All thiophene derivatives reduced the cell viability in breast cancer cells, showing high cytotoxic activity (IC₅₀ lower than 30 µM) and SB200 compound showed the best selectivity index in MCF-7 cells compared to doxorubicin in 2D culture. All thiophene derivatives significantly induced G₀/G₁ phase cell cycle arrest, however only SB-83 treatment were effective against motility of MCF-7 cells in 2D culture (p=0.0059). The SB-200 derivative treatment induced an increased proportion of acridine orange/Hoechst double stained cells (35.35% versus 3.14%, p=0.0002) compared to non- treated cells, with apoptosis morphological alterations independent of caspase 7 activation (p>0.05). MCF-7 cells became less responsive to SB-200 and to doxorubicin in 3D culture compared to cells in 2D culture (higher IC₅₀ values) however, SB-200 showed a better cytotoxic effect compared to doxorubicin in tridimensional culture. Taken together, these results suggest the potential of thiophene derivatives for further in vitro and in vivo studies, and as prospect of new therapies to breast cancer.

Keywords: Anticancer, thiophene derivatives, cell cycle, migration, cell death.

1. INTRODUCTION

Breast cancer is the most incident cancer in women worldwide and it has an upward impact on public health. Thus, the design and synthesis of more efficient agents with less side effects are extremely essential (1).

Thiophenes are a class of heterocyclic compounds that contain sulphur and are found in both natural and synthetic products, displaying several different pharmacological properties (2); (Kobayashi et al., 1987); (Nahed et al., 2016) including anti-inflammatory and anti-ulcer (Nahed et al., 2016), antimicrobial (5); (6);(7), antifungal (8), antiglaucoma (9)and anticancer(Mohareb, and Abdo 2015); (11); (Romagnoli et al., 2013); (Ghorab, Bashandy, and Alsaïd, 2014); (14).

In cancer, thiophene derivatives have been shown cytotoxicity in several type of cancer cells, including leukemia, ovarian, glioma, renal and lung (Romagnoli, et al., 2013); (Ghorab, Bashandy, and Alsaïd, 2014). These studies have showed that thiophene derivatives induced cell cycle arrest, apoptosis and affected tubulin polymerization. The thiophene derivatives studied in this work were previously synthesized by Rodrigues and colleagues and had antileishmanial activity by apoptosis induction (14). Studies have shown that antiprotozoal compounds might have anticancer properties *in vitro* and animal experiments (TAKAHASHI et al., 2011)(14)

It is becoming increasingly evident that the tumor microenvironment can impact the success of chemotherapy and affect drug resistance (Nirmalanandhan, et al., 2010)(17); (Barbone et al., 2008). Direct contact with specific ECM (Extracellular Matrix) components seems to affect epithelial cancer cell behavior leading to an increasing apoptosis sensitivity(Nyga, Cheema and Loizidou, 2011). Many cells of normal and malignant origin lose some of their phenotypic properties when grown *in vitro* as monolayer cultures (2D model)(20); (21). In contrast, the tridimensional cell culture, in which breast cancer cells grown in ECM, provide cell-to cell and cell-to-ECM interactions and mimic with more fidelity *in vivo* characteristics (Weigelt et al., 2010).

In this context, the present study aimed to investigate the cytotoxic activity of thiophene derivatives in breast cancer cells in 2D and 3D models. The most promising compound (SB-200) was chosen for further studies to investigate cytotoxic mechanism.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. Chemistry

Thiophenes derivatives 2-[(1H-Indol-3-ylmethylene)-amino]-5,6,7,8-tetrahydro-4H-cyclohepta[b]thiophene-3-carbonitrile (SB-44), 2-[(5-Bromo-1H-indol-2-ylmethylene)-amino]-4,5,6,7-tetrahydro-benzo[b]thiophene-3-carbonitrile(SB-83) and 2-(((5-bromo-1H-indol-2-yl)methylene)amino)-5,6,7,8-tetrahydro-4H-cyclohepta[b]thiophene-3-carbonitrile (SB-200) were synthesized in Laboratory of Synthesis and Vectoring molecules (UFPB), as previously described in (14). Table 1 shows the chemical structures of SB-44, SB-83 and SB-200.

2.2. Cell culture conditions

MCF-7 cells (human breast cancer) and HFF-1 (Human Dermal Fibroblasts) were purchased from the Rio de Janeiro Tissue Cell Bank. MCF-7 cells were cultured in RPMI-1640medium (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco) while HFF-1 cells were maintained in DMEN medium (Gibco) supplemented with 20% fetal bovine serum (Gibco). Both media contained 10 mM HEPES (Gibco), 200 U/mL streptomycin and penicillin (Gibco). Cells were maintained in a humid atmosphere at 37°C with 5% of CO₂.

2.3. Cytotoxicity Assay in 2D culture

The cytotoxicity of the compounds was tested in MCF-7 and HFF-1 cells. For experiments, cells were seeded in 96-well plates (10^4 cells/well). Cells were treated with amino-thiophene derivatives at 0.1, 1, 10, 25, 50 and 75 μ M for 72 hours. Control groups received the same amount of DMSO (0,1%). Doxorubicin was used as a positive control at 0.1 to 25 μ M. At the end of 72h of incubation, 20 μ l of 0.5 mg/mL of MTT (Sigma Aldrich) were added in each well, and cells were incubated again at 37°C with 5% CO₂. Three hours later, the formazan product of MTT reduction was dissolved in 20% of SDS, and absorbance was measured using a multi-plate reader (EL808, Biotek, USA). Drug effect was quantified as the percentage of control absorbance of reduced dye at 570 nm. To evaluate the selectivity index (SI), the ratio between IC₅₀ of HFF-1 cells and IC₅₀ of MCF-7 cells were calculated (23).

2.4. Cell cycle analysis

Cells were plated (0.5×10^6 cells/well) in 6-well plates and after 24 h they were treated at IC₅₀ doses. After 48h, the cells were harvested, washed with PBS and fixed with ice-cold 70% EtOH overnight at -20 °C. Prior to analysis, cells were incubated with PI (5 μ g/ml)/ RNase A (100 μ g/ml) in PBS for 15 min on ice. Cellular DNA content was analyzed using an Accuri C6 (Becton, Dickinson and Company, USA) flow cytometer. The cell cycle profile was subsequently analyzed using the Accuri C6 software (Becton Dickinson and Company, USA).

2.5. In vitro scratch assay

MCF-7 cells were distributed in twenty-four well plates at a density of 5×10^4 /well and incubated at 37 °C in atmosphere of 5% CO₂ for 24 hours. After reaching the required confluence, growth medium was aspirated and washed with PBS 1X. Then, two perpendicular marking lines (scratch) were made using a p1000 pipet tip (24). After that, cells were treated with 0.1% DMSO (control group) or with amino-thiophene derivatives at concentration previously determined by the IC₅₀. Cells were photographed in inverted microscope (Leica, BZ) (t = 0h) and incubated for 48 hours (t = 48h). Data of migration assays were obtained from the analysis of the images using Image J software (NIH, USA) in relation to percentage of non-treated cells.

2.6. Analysis of cell death by Acridine Orange/DAPI staining

Apoptosis was also evaluated by double-fluorescence staining with DAPI (Sigma Aldrich) and Acridine Orange (AO) (Sigma Aldrich) (25). Briefly, MCF-7 cells were treated with SB-200 compound (at IC₅₀ dose 14.86 μ M) for 48 hours and after they were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 minutes. Cells were co-stained with AO (8.5 μ g/ml) and with nuclear dye DAPI (5 μ g/ml) for 10 min in the dark and examined under magnification X10 using a fluorescence microscope. Viewed by fluorescence microscopy Zeiss AXIO-Imager A2, apoptotic cells exhibit a bright green nucleus in which chromatin condensation, observed as dense green areas. Apoptotic cells were calculated as the ratio of apoptotic cells (with characteristic apoptotic morphology) to total cells. At least 10 fields were counted for each treatment, using the ImageJ Launcher software (Image Processing and Analysis in Java, National Institute of Health, USA).

2.7. Analysis of cell death by cleavage of caspase 7

Approximately 5×10^5 MCF-7 cells were cultured in 6-well plates and incubated for 24 hours at 37 °C in atmosphere of 5% CO₂. They were treated with SB-200 compound at IC₅₀ value and after 48 hours the cells were trypsinized and washed 2x with PBS. Subsequently they were resuspended in complete medium and marked with CellEvent® Caspase 3/7 Green reagent (Life Technologies, Carlsbad, California, EUA) and incubated for 30 minutes at 37°C in 5% of CO₂. Subsequently, cells were incubated with SYTOX® AADvanced reagent for 5 minutes to mark the necrotic cells. After cells were evaluated using an Attune cytometer (Life Technologies, Carlsbad, EUA) and analyzed using the flowjo Single Cell Analysis Software.

2.8. Cytotoxicity Assay in 3D culture

Briefly, 3×10^3 cells were plated in 96 well cell culture plates, U-bottom (Greiner Bio-one, Americana, Brasil) in RPMI 1640 supplemented with 10% of FBS and 10% of Matrigel (BD Matrigel™). Subsequently, the plate of cells was centrifuged at 200 xg for 3 minutes at room temperature. The plate was incubated at 37 °C for six 6 days to promote the formation and growth of spheroids. On day 0, it was added 50µl medium preheated to 37°C with SB-200 (1, 10, 25, 50 and 75 µM) compound and with Doxorubicin (1, 10, 30, 75 and 100 µM). Cells were incubated at 37°C for 3 days, and spheroids were photographed every 24 hours. At the end of the treatment, 15 µl of MTT reagent were added in each well and the plate returned to the incubator at 37°C for 24 hours. After, SDS 10% was added for 24 hours at 37°C for complete solubilization of the formazan crystals. The absorbance was measured using a multi-plate reader at 570nm (EL808, Biotek, USA).

2.9. Statistical analysis

All experiments were performed at least in triplicate from three independent experiments. IC₅₀ values and 95% confidence intervals were obtained by nonlinear regression with the OriginPro program (8.0, OriginLab, USA). Statistical significance was tested with two-tailed, unpaired Student's t-Test in relation to the untreated or positive controls and differences were considered significant when $p < 0.05$. Values were expressed as the mean \pm SD of three or more replicate experiments.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Cytotoxicity assay

Initially, the compounds were tested against non-tumoral human fibroblasts cells (HFF-1). It was observed that among amino-thiophene derivatives, only SB-200 derivative showed considerable cytotoxicity (IC₅₀ 52.13 µM), whereas SB-44 and SB-83 were nontoxic to normal fibroblasts (IC₅₀ > 75 µM) (Table 2). In contrast, the positive control doxorubicin showed high cytotoxicity against untransformed fibroblasts (IC₅₀ 2.78 µM). Next, we assayed the cytotoxicity of amino-thiophene derivatives against MCF-7 cells and we observed that all three derivatives reduced cell viability, with IC₅₀ lower than 30 µM (Table 2). We also evaluated the selectivity index (SI) of these derivatives, the ratio of IC₅₀ for HFF-1 to IC₅₀ for MCF-7 cells (23). Although SB-200 derivative exhibited some toxicity to untransformed cells, their selectivity index was higher in tumor cells compared to other derivatives (Table 2). Rodrigues

et al (14) also evaluated the toxicity of these derivatives in murine macrophages and human red blood cells and found low toxicity. Romagnoli et al (15) also evaluated the cytotoxicity of the 7-Methoxy-5-aminobenzo[b]thiophen-2-yl(3,4,5-trimethoxyphenyl)methanone in non-cancer cells and found low toxicity in cells tested.

In our study, we observed that all thiophene derivatives reduced cell viability in breast cancer cells, showing high cytotoxic effect. Romagnoli et al (15) demonstrated increased inhibitory effects of 5-substituted benzo[b] thiophene derivatives against cancer cells lines including Molt/4 and Hela cells, with IC₅₀ values of 0.78 to 19nM. In this work, the amino group at the C-5 position of the benzo[b]thiophene ring (7-Methoxy-5-aminobenzo[b]thiophen-2-yl)(3,4,5-trimethoxyphenyl)methanone caused a significant improvement in IC₅₀ values and they showed that these thiophene derivatives inhibited tubulin polymerization (15). Ghorab et al (13) also evaluated novel thiophene derivatives as potential anticancer agents. They reported cytotoxic effect against MCF-7 (9.39 – 10.25 $\mu\text{mol L}^{-1}$), specially compounds with sulfathiazole, sulfaphenazole, sulfadiazine, or benzothiazole moieties. Other work reported that N-(3-cyano-5,6-dihydro-4H-cyclopenta (b) thiophene derivatives showed good inhibitory activities against MCF7 cells, specially compounds with aromatic ring attached to NH fragment and a cyclopentathiophene core (hydrophobic region)(Said and Elshihawy, 2007). In our study, we observed that SB-200 compound showed the best cytotoxic activity in MCF-7 cells, suggesting that the cycloheptan nucleus and the Bromide substitution at position 5 of the indole ring was important.

3.2 Effect of derivatives thiophenes in cell cycle of breast cell lines

Then, we investigated the amino-thiophene derivatives effects on cell cycle of breast cancer cells. All compounds induced G₀-G₁ phase cell cycle arrest in MCF-7 cells (Table 3). A significant increase was found in the percentage of MCF-7 cells in the G₀-G₁ phase treated with SB-44 compared to untreated cells ($p=0.00138$) and compared to doxorubicin treated cells ($p=0.0079$). The SB-200 compound also induced an arrest in the G₀-G₁ phase compared to untreated ($p=0.0132$) and doxorubicin treated cells ($p=0.0061$). The SB-83 derivative also resulted in accumulation of cells in the G₀-G₁ phase compared to the untreated control ($p=0.0271$) and doxorubicin ($p=0.0100$). All the thiophenes derivatives significantly decreased the percentage of G₂-M cells compared to untreated cells ($p=0.0184$ to SB-44; $p=0.0156$ to SB-200 and $p=0.0202$ to SB-83). Doxorubicin treatment did not alter the cell cycle progression of breast cancer cells (Table 3). In contrast, in Romagnoli *et al.*(15), benzo[b]thiophene derivatives induced a G₂/M arrest in HeLa and Jurkat cells. The *N*-substituted-2-(thiophene-2-ylmethylene)-thiosemicarbazone derivatives was also evaluated in renal cell adenocarcinoma and it no modified cell cycle profile. These results suggest that interruption of specific cell-cycle phase may be due to different moieties of compounds and it depends on tumor specificity.

3.3 In vitro scratch assay

The effects of thiophene derivatives on migration of MCF-7 cells were also evaluated by the scratch assay. We observed that only SB-83 treatment during 48h were highly effective against motility of MCF-7 cells ($p=0.0059$) (Figure 1). The presence of cyclohexane in SB-83 molecule possibly interferes in migration process. Metastasis is the cause for high mortality of patients with cancer and represents a multi-step process, which include local tumor cell invasion, entry and exit from the circulation and colonization at the distal sites (Van Zijl, Krupitza and Mikulits, 2011). To find new drugs that inhibit migration and invasion is a major ongoing effort for breast cancer therapeutics. Towle et al reported that 4-substituted benzo[b]thiophene-2-

carboxamidines inhibited the Urokinase-type plasminogen activator (uPA), an mediator of cellular invasiveness(28).

3.4 Apoptosis morphological changes observed under fluorescent microscopy

To better elucidate anticancer activity of SB-200, we decided to investigate the cell death mechanism induced by this compound. Apoptosis, programmed cell death, is considered by a series of morphological actions such as reduction in the size of the cells and the nucleus, loss of adhesion to adjacent cells, chromatin compression and DNA disintegration[31-32]. A semi-quantitative analysis of the number of apoptotic cells was also performed by AO/Hoechst double labeling after SB-200 treatment for 48 hours. MCF-7 treated cells showed an increased proportion of AO/ Hoechst double-stained cells exhibiting condensed chromatin, nuclear fragmentation, nucleolar disappearance, increased nuclear fluorescence compared to cells untreated ($p=0.0002$) (Figure 2). Rodrigues et al (14) also showed that these derivatives induced apoptosis in promastigotes with phosphatidylserine externalization and DNA fragmentation. Our thiophenes compounds contain a lateral indole ring, that are also well known for its ability to induce cell death (apoptosis and mitotic catastrophe) in different cancer cell lines(Patil, Patil and Miller, 2012). Romagnoli *et al.* (31) showed that 2-amino-3-cyano-[2-(2,5-dimethoxyphenyl)ethyl] thiophene derivative caused a significant accumulation of positive apoptosis of cervix cancer cells.

3.5 Activation determination of caspase 7

To examine the molecular mechanisms underlying apoptosis process, we evaluated caspase 7 induction by cytometry. There were no significant changes in the activity of caspase 7 after the treatment of SB-200 in MCF-7 cells (Table 4). We also observed the compound did not induced necrosis in breast cancer cells. It has been widely reported that MCF-7 cells do not express detectable levels of caspase-3. Therefore, we examined whether the caspase-7 become activated in MCF-7 cells in response to SB-200 treatment. The results suggested that the SB-200 induced apoptosis independent of caspase-7 activation. Further tests will be needed to define the mechanism of cell death of these thiophene derivatives in MCF-7 cells and investigate if it is independent of caspases. Tor and colleagues (32) showed that the ethyl acetate extract of *D. suffruticosa* induced apoptosis in MCF-7 cells by oxidative-stress and by upregulation of Bax and Bcl-2 proteins mediators of apoptosis process, with caspase- independent mechanism.

3.6 Cytotoxicity of SB-200 derivative in 3D Culture

The traditional 2D cell culture has been known as the simplest model to screen new molecules. However this monolayer model could not provide proper tissue characteristics. The 3D culture system provide a better in vitro culture model for the evaluation of cytotoxicity and efficacy of anticancer drugs (33)(34)(Lovitt, Shelper and Avery, 2015). In a 3D cell culture model breast cancer cells grown in ECM (Matrigel®), allowing tumor-like colony formation (spheroids) as well cell-ECM interactions(Weigelt et al., 2010).To assess whether ECM have an impact on the sensitivity of human breast cancer cells to thiophene derivatives, we decided to investigate the cell viability of these cells in 3D culture. In our study we found that MCF-7 were less responsive to thiophene derivatives in 3D culture in comparison with those cells cultured in 2D conditions. We observed the same to doxorubicin, where cells showed higher resistance in 3D culture, displaying higher IC_{50} compared to cells treated in monolayer culture. Interestingly, in 3D culture, the SB-200 showed a better cytotoxicity effect in breast cancer ($IC_{50}=24,923\pm 6,197$)

compared to doxorubicin ($IC_{50} = 63,065 \pm 1,766$), the most common drugs used for early breast cancer chemotherapy.

Lovitt *et al* (35) demonstrated that the anthracycline epirubicin was more potent against MCF-7 cells grown in 2D conditions when compared to those cultured in a 3D culture (IC_{50} 2D: 192.4 ± 54 nM, IC_{50} 3D: 500 nM). Other study reported that cells grown in a 3D nanofibrous scaffold showed higher resistance to anticancer drugs compared to cells in 2D culture (37). Some factors have been associated to resistance to anticancer agents in 3D culture like EMC-mediated factors, altered signaling pathways and reduced proliferation rates(35)(37)(38);

In contrast, Gomes *et al.* (Gomes, Vessoni and Menck, 2015) reported that under 3D culture conditions, MCF-7 displayed elevated sensitivity to doxorubicin, by hindered autophagy induction. Several studies have reported resistance upon exposure to various anticancer agents, when tumor cells were cultured in 3D cell culture conditions compared to 2D cell culture(Weigelt *et al.*, 2010); (23).

4 CONCLUSION

The present study reports the anticancer activity of thiophene derivatives SB-44, SB-83 e SB-200 in breast cancer cells. All thiophene derivatives showed high cytotoxic effect in MCF-7 cells and SB-200 compound had the best selectivity index. All thiophene derivatives induced G0/G1 cell cycle arrest cell and only the SB-83 compound was able to inhibit migration of breast cancer cells. The SB-200 appeared to induce apoptosis of MCF- 7 by a caspase independent mechanism. In 3D culture, this derivative showed higher cytotoxicity compared to doxorubicin. Therefore, thiophene derivatives are potential breast anticancer agents and further studies should be conducted in order to understand the mechanism by which thiophene derivatives act on cancer cells.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the Brazilian National Research Council (CNPq), the Research Foundation of Pernambuco State (FACEPE), National Institute for Science and Technology in Pharmaceutical Innovation (INCT_if) and CAPES for student fellowships.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supportive/Supplementary material intended for publication must be numbered and referred to in the manuscript but should not be a part of the submitted paper. List all Supportive/Supplementary Material and include a brief caption line for each file describing its contents.

REFERENCES

1. Bregoli L, Movia D, Gavigan-Imedio JD, Lysaght J, Reynolds J, Prina-Mello A. Nanomedicine applied to translational oncology: A future perspective on cancer treatment. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* [Internet]. 2015;12(1):81–103. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1549963415001720>
2. Mabkhot YN. Antimicrobial Activity of Some Novel Armed Thiophene Derivatives and Petra/Osiris/Molinspiration (POM) Analyses. *Molecules*. 2016;21:1–16.
3. Jun'ichi Kobayashi, Jie-fei Cheng, Masami Ishibashi, Hideshi Nakamura YOM-K. PRIANOSIN A, A NOVEL ANTILEUKEMIC ALKALOID FROM THE OKINAWAN MARINE SPONGE *Prianos melanos*. *Tetrahedron Lett*. 1987;28(42):4939–42.
4. Nahed et al. The Knoevenagel reaction of cyanoacetylhydrazine with pregnenolone: Synthesis of thiophene, thieno[2,3-d]pyrimidine, 1,2,4-triazole, pyran and pyridine derivatives with anti-inflammatory and anti-ulcer activities. *Steroids* [Internet]. 2016;(2016). Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039128X15003293>
5. Mbaveng AT, Sandjo LP, Tankeo SB, Ndifor AR, Pantaleon A, Nagdjuj BT, et al. Antibacterial activity of nineteen selected natural products against multi - drug resistant Gram - negative phenotypes. *Springerplus*. 2015;
6. Chandna N, Jk K, Goyal V, Nk A, Km K, Vijjulatha M. Design, Synthesis and Antimicrobial Evaluation of Novel 1,3-Oxazolidin-2- one Derivatives. *Curr Top Med Chem* [Internet]. 2013;13(16):2062–75. Available from: <http://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/es/mdl-23895090>
7. Souza et al. Preliminary antifungal and cytotoxic evaluation of synthetic cycloalkyl[b]thiophene derivatives with PLS-DA analysis. *Acta Pharm* [Internet]. 2012;62(2):221–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22750820>
8. Ajdačić V, Senerovic L, Vranić M, Pekmezovic M, Arsic-arsnijevic V, Veselinovic A, et al. Synthesis and evaluation of thiophene-based guanylhydrazones (iminoguanidines) efficient against panel of voriconazole-resistant fungal isolates. *Bioorg Med Chem* [Internet]. 2016; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2016.01.058>
9. Leitans J, Sprudza A, Tanc M, Vozny I, Zalubovskis R, Tars K, et al. 5-Substituted-(1,2,3-triazol-4-yl)thiophene-2-sulfonamides strongly inhibit human carbonic anhydrases I, II, IX and XII: Solution and X-ray crystallographic studies. *Bioorganic Med Chem* [Internet]. 2013;21(17):5130–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2013.06.041>
10. Mohareb, R. M. Abdo NYM. Synthesis and Cytotoxic Evaluation of Pyran , Dihydropyridine and Thiophene Derivatives of 3-Acetylcoumarin. *Chem Pharm Bull*. 2015;63(9):678–87.
11. Oliveira et al. Synthesis of thiophene-thiosemicarbazone derivatives and evaluation of their in vitro and in vivo antitumor activities. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2015;104:148–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.09.036>
12. Romagnoli R, Baraldi PG, Lopez-cara C, Preti D, Tabrizi MA, Balzarini J, et al. Concise Synthesis and Biological Evaluation of 2 - Aroyl-5-Amino Benzo[b]thiophene Derivatives As a Novel Class of Potent Antimitotic Agents. *J Med Chem*. 2013;56:9296.
13. Ghorab MM, Bashandy MS, Alsaied MS. Novel thiophene derivatives with sulfonamide, isoxazole, benzothiazole, quinoline and anthracene moieties as potential anticancer agents. *Acta Pharm* [Internet]. 2014;64(4):419–31. Available from: <http://www.degruyter.com/view/j/acph.2014.64.issue-4/acph-2014-0035/acph-2014->

- 0035.xml
14. Rodrigues et al. 2-Amino-thiophene derivatives present antileishmanial activity mediated by apoptosis and immunomodulation in vitro. *Eur J Med Chem.* 2015;106:1–14.
 15. Romagnoli R, Baraldi PG, Salvador MK, Preti D, Tabrizi MA, Bassetto M, et al. Synthesis and Biological Evaluation of 2 - (Alkoxy carbonyl)-3- Anilinobenzo[b]thiophenes and Thieno[2,3 - b]pyridines as New Potent Anticancer Agents. *J Med Chem.* 2013;4.
 16. Nirmalanandhan VS, Duren A, Hendricks P, Vielhauer G, Sittampalam GS. Activity of anticancer agents in a three-dimensional cell culture model. *Assay Drug Dev Technol [Internet].* 2010;8(5):581–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20662735> <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/adt.2010.0276> <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/adt.2010.0276> http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/adt.2010.0276?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:
 17. Morin PJ. Drug resistance and the microenvironment: Nature and nurture. *Drug Resist Updat.* 2003;6(4):169–72.
 18. Barbone et al. Mammalian target of rapamycin contributes to the acquired apoptotic resistance of human mesothelioma multicellular spheroids. *J Biol Chem.* 2008;283(19):13021–30.
 19. Nyga A, Cheema U, Loizidou M. 3D tumour models: novel in vitro approaches to cancer studies. *J Cell Commun Signal [Internet].* 2011;5(3):239–48. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12079-011-0132-4>
 20. Kunz-Schughart L a. The Use of 3-D Cultures for High-Throughput Screening: The Multicellular Spheroid Model. *J Biomol Screen [Internet].* 2004;9(4):273–85. Available from: <http://jbx.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/1087057104265040>
 21. Hickman J a., Graeser R, de Hoogt R, Vidic S, Brito C, Gutekunst M, et al. Three-dimensional models of cancer for pharmacology and cancer cell biology: Capturing tumor complexity in vitro/ex vivo. *Biotechnol J [Internet].* 2014;9(9):1115–28. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/biot.201300492>
 22. Weigelt B, Lo AT, Park CC, Gray JW, Bissell MJ. HER2 signaling pathway activation and response of breast cancer cells to HER2-targeting agents is dependent strongly on the 3D microenvironment. *Breast Cancer Res Treat [Internet].* 2010;122(1):35–43. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10549-009-0502-2>
 23. Hafidh RR, Abdulmir AS, Bakar FA, Jalilian FA, Abas F, Sekawi Z. Novel molecular, cytotoxic, and immunological study on promising and selective anticancer activity of mung bean sprouts. *BMC Complement Altern Med [Internet].* 2012;12:208. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3522559&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 24. Valster A, Tran NL, Nakada M, Berens ME, Chan AY, Symons M. Cell migration and invasion assays. *Methods.* 2005;37(2):208–15.
 25. Abu N, Akhtar MN, Yeap SK, Lim KL, Ho WY, Zulfadli AJ, et al. Flavokawain a induces apoptosis in MCF-7 and MDA-MB231 and inhibits the metastatic process in vitro. *PLoS One.* 2014;9(10):1–12.
 26. Said M, Elshihawy H. Synthesis , anticancer activity and structure-activity relationship of some anticancer agents based on Cyclopenta (b) thiophene scaffold. *J Pharm Sci.* 2007;27(1):885–92.
 27. Van Zijl F, Krupitza G, Mikulits W. Initial steps of metastasis: Cell invasion and endothelial transmigration. *Mutat Res - Rev Mutat Res [Internet].* 2011;728(1–2):23–

34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.05.002>
28. Towle MJ, Lee A, Maduakor EC, Schwartz CE, Bridges AJ, Littlefield BA. Inhibition of urokinase by 4-substituted benzo[b]thiophene-2- carboxamidines: An important new class of selective synthetic urokinase inhibitor. *Cancer Res.* 1993;53(11):2553–9.
29. Liu J, Li Y, Ren W, Hu W-X. Apoptosis of HL-60 cells induced by extracts from *Narcissus tazetta* var. *chinensis*. *Cancer Lett [Internet]*. 2006;242(1):133–40. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383505009961>
30. Patil SA, Patil R, Miller DD. Indole molecules as inhibitors of tubulin polymerization: potential new anticancer agents. *Future Med Chem [Internet]*. 2012;4(16):2085–115. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23157240>
31. Romagnoli R, Baraldi PG, Lopez-Cara C, Salvador MK, Preti D, Tabrizi MA, et al. Design, synthesis and biological evaluation of 3,5-disubstituted 2-amino thiophene derivatives as a novel class of antitumor agents. *Bioorg Med Chem [Internet]*. 2014;22(18):5097–109. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089613010249>
32. Tor YS, Yazan LS, Foo JB, Wibowo A, Ismail N, Cheah YK, et al. Induction of apoptosis in MCF-7 cells via oxidative stress generation, mitochondria-dependent and caspase-independent pathway by ethyl acetate extract of *Dillenia suffruticosa* and its chemical profile. *PLoS One.* 2015;10(6):1–25.
33. Tarasewicz E, Hamdan R, Straehla J, Hardy A, Nunez O, Zelivianski S, et al. CDK4 inhibition and doxorubicin mediate breast cancer cell apoptosis through Smad3 and survivin. *Cancer Biol Ther.* 2014;15(10):1301–11.
34. Sodunke TR, Turner KK, Caldwell SA, McBride KW, Reginato MJ, Noh HM. Micropatterns of Matrigel for three-dimensional epithelial cultures. *Biomaterials.* 2007;28(27):4006–16.
35. Lovitt CJ, Shelper TB, Avery VM. Evaluation of chemotherapeutics in a three-dimensional breast cancer model. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2015;
36. Weigelt B, Lo AT, Park CC, Gray JW, Bissell MJ. HER2 signaling pathway activation and response of breast cancer cells to HER2-targeting agents is dependent strongly on the 3D microenvironment. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;122(1):35–43.
37. Girard YK, Wang C, Ravi S, Howell MC, Mallela J, Alibrahim M, et al. A 3D Fibrous Scaffold Inducing Tumoroids: A Platform for Anticancer Drug Development. *PLoS One [Internet]*. 2013;8(10):e75345. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0075345>
38. Muranen T, Selfors LM, Worster DT, Iwanicki MP, Song L, Morales FC, et al. Inhibition of PI3K/mTOR Leads to Adaptive Resistance in Matrix-Attached Cancer Cells. *Cancer Cell [Internet]*. 2012;21(2):227–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2011.12.024>
39. Gomes LR, Vessoni a T, Menck CFM. Three-dimensional microenvironment confers enhanced sensitivity to doxorubicin by reducing p53-dependent induction of autophagy. *Oncogene [Internet]*. 2015;1(May 2014):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2014.461>

Tables:

Table 1. Chemical structure of 2-[(1H-Indol-3-ylmethylene)-amino]-5,6,7,8-tetrahydro-4H-cyclohepta[b]thiophene-3-carbonitrile(SB-44), 2-[(5-Bromo-1H-indol-2-ylmethylene)-amino]-4,5,6,7-tetrahydro-benzo[b]thiophene-3-carbonitrile(SB-83) and 2-(((5-bromo-1H-indol-2-yl)methylene)amino)-5,6,7,8-tetrahydro-4H-cyclohepta[b]thiophene-3-carbonitrile(SB-200).

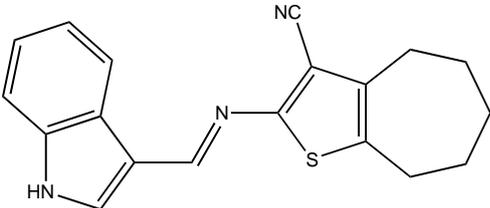
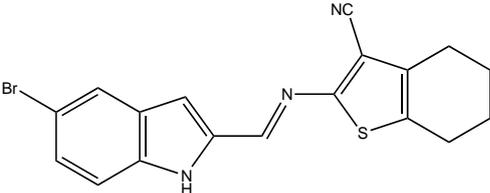
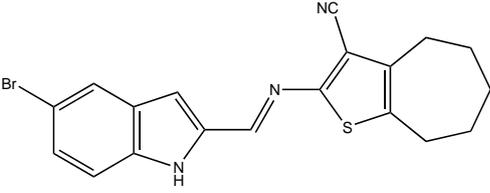
Code	ChemistryName	Molecular Formula	Molecular Structure
SB-44	2-[(1H-Indol-3-ylmethylene)-amino]-5,6,7,8-tetrahydro-4H-cyclohepta[b]thiophene-3-carbonitrile	C ₁₉ H ₁₇ N ₃ S	
SB-83	2-[(5-Bromo-1H-indol-2-ylmethylene)-amino]-4,5,6,7-tetrahydro-benzo[b]thiophene-3-carbonitrile	C ₁₈ H ₁₄ BrN ₃ S	
SB-200	2-(((5-bromo-1H-indol-2-yl)methylene)amino)-5,6,7,8-tetrahydro-4H-cyclohepta[b]thiophene-3-carbonitrile	C ₁₉ H ₁₆ BrN ₃ S	

Table 2. IC₅₀ values (μM) and Selective index (SI) of SB-44, SB-83, SB-200 and doxorubicin in normal fibroblasts (HFF-1) and in breast cancer cell MCF-7.

IC ₅₀ (μM)	HFF-1	MCF-7	SI*
SB-44	>75 μM	26.76 μM	2.80**
SB-83	>75 μM	27.62 μM	2.71**
SB-200	52.13 μM	14.86 μM	3.51
Doxorubicin	2.78 μM	6.51 μM	0.42

*SI = ratio of IC50 for HFF-1 to IC50 for MCF-7 cells.

** SI values for SB-44 and SB-83 are virtual because we use the value 75 μ M for Fibroblasts

Table 3. Effects of thiophene derivatives and doxorubicin on cell cycle progression of MCF-7 cells after 48 hours of treatment (NTC = non-treated cells). Data are presented as mean \pm SEM of three independent experiments.

	Sub-G0	G0/G1	S	G2/M
NTC	0.5 \pm 0.45	52.93 \pm 6.15	5.43 \pm 2.10	42.06 \pm 6.12
SB-44	0.40 \pm 0.26	74.03 \pm 6.59	2.83 \pm 1.21	22 \pm 6.15
SB-83	1.76 \pm 1.07	66.56 \pm 3.19	5.63 \pm 0.64	26.00 \pm 3.41
SB-200	0.96 \pm 1.33	72.26 \pm 4.95	3.23 \pm 1.72	23.70 \pm 4.27
doxorubicin	3.26 \pm 4.04	49.13 \pm 5.73	5.16 \pm 0.37	42.10 \pm 9.69

Table 4. Effect of SB-200 derivative in induction of caspase 7 in MCF-7 cells Percentage (%) of double negative, necrosis positive, caspase 7 positive and double positive in cells non treated (NTC) and treated with SB-200 derivative. Data are presented as mean \pm SEM of three independent experiments.

	Double negative	Necrosis	Caspase 7 positive cell	Double positive
NTC	89.35 \pm 2.61	4.22 \pm 3.23	4.15 \pm 4.01	2.28 \pm 1.89
SB-200	73.65 \pm 10.11	3.175 \pm 0.63	11.25 \pm 0.5	11.98 \pm 10.21

Figures

Figure 1. Effects of thiophene derivatives on cell migration after 48 hours of treatment in MCF-7 cells. SB-83 significantly reduced migration area when compared to control DMSO 0.1% $**p < 0.001$. Data are presented as mean \pm SEM of three independent experiments.

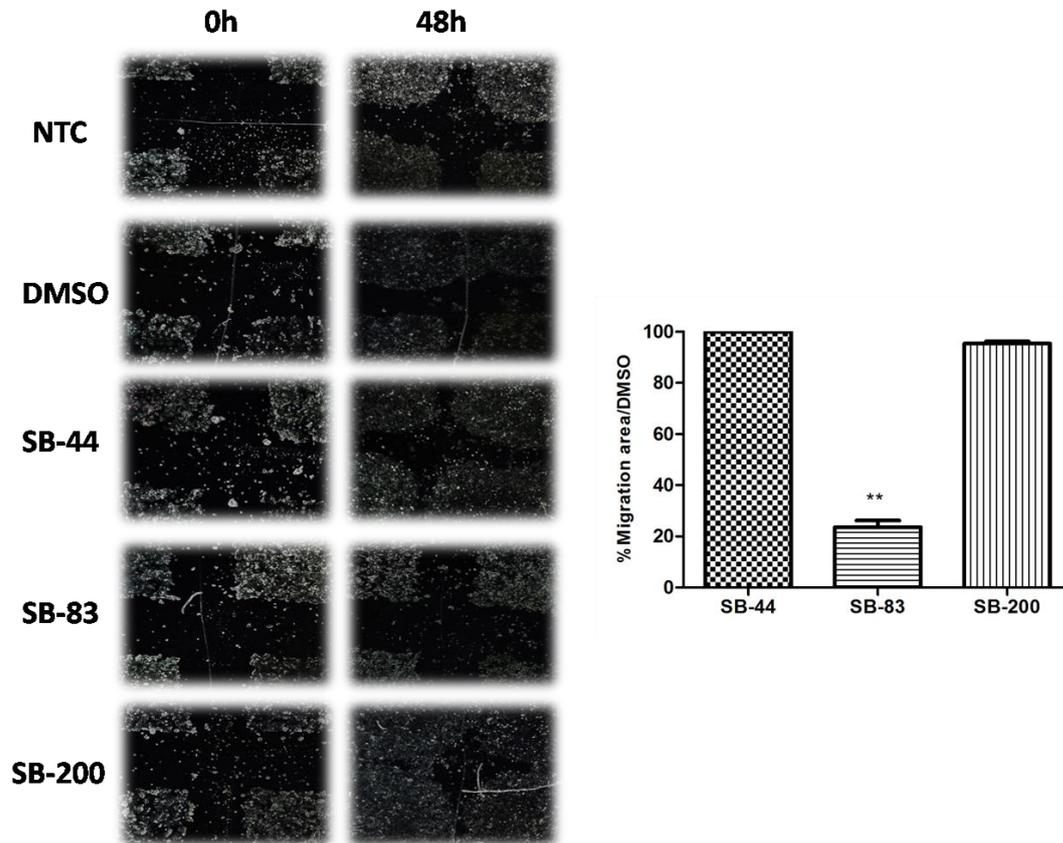


Figure 2. Effect of SB-200 derivative in apoptosis induction in MCF-7 cells. A semi-quantitative analysis of number of apoptotic cells was performed by AO/Hoechst double labeling after SB-200 treatment for 48h. (A) Nuclear morphology with was examined by fluorescence microscopy. (B) Quantification of double positive cells with abnormal nuclear morphology from 10 different areas using ImageJ software. Data are expressed as mean \pm SD of three experiments. *Statistically significant differences, $P \leq 0.05$. Dotted area represents zoom of cells in apoptosis.

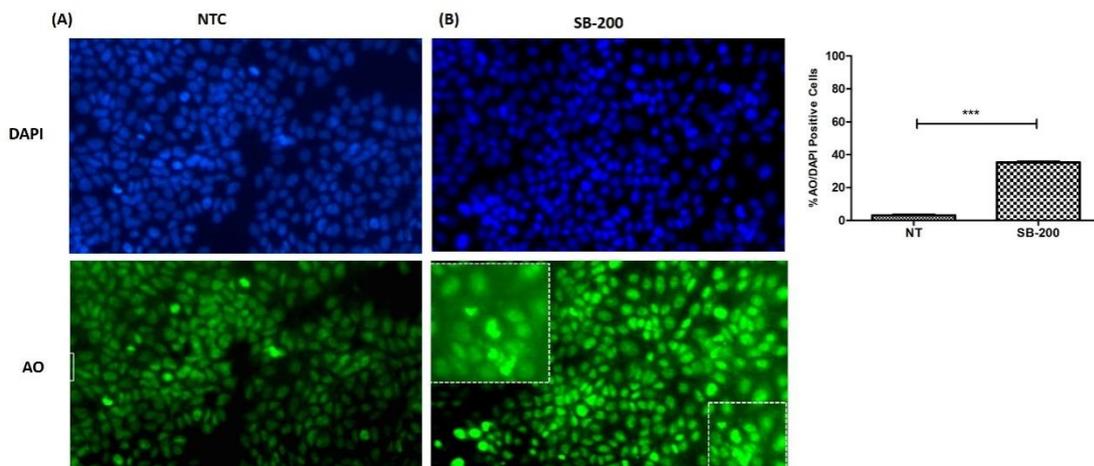
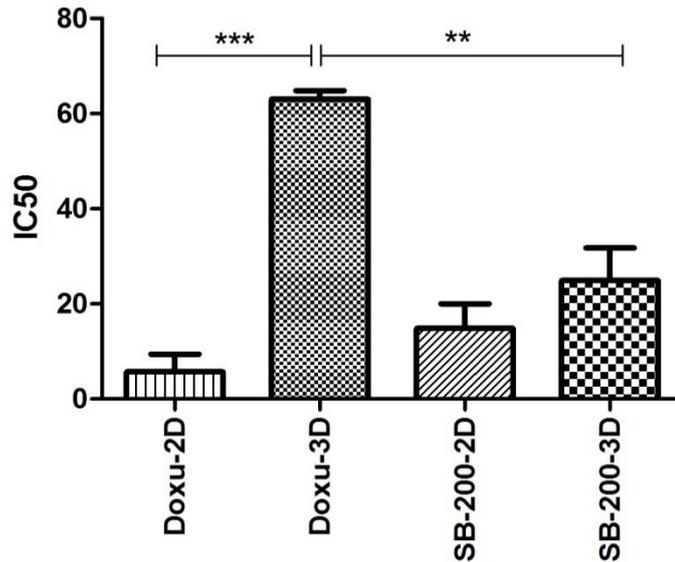
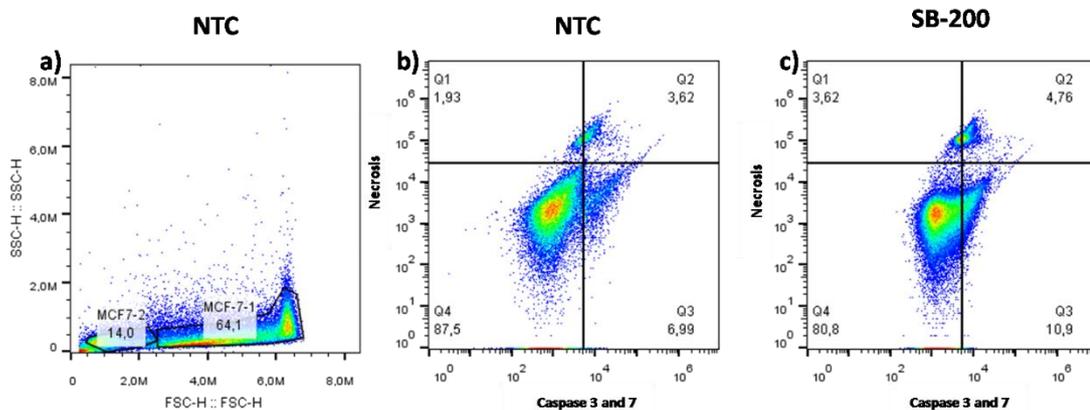


Figure 3. Comparison of SB-200 derivative cytotoxicity in MCF-7 cells maintained in bidimensional culture (2D) and tridimensional culture (3D). Data are IC50 values \pm SD of three experiments. ** $p < 0.001$ and * $p < 0.0001$.**



Supplementary

Figure S1: (a) (b) MCF-7 cells were untreated and treated with (c) SB-200 for 48 hours before labeling with the CellEvent® Caspase 3/7 Green Flow Cytometry kit. Stained samples were analyzed on the Attune® Cytometer for CellEvent® Caspase 3/7 Green Detection Reagent and for SYTOX® AADvanced™. Note that the treated cells have a percentage of apoptotic cells (c) than the basal level of apoptosis seen in the control cells (b).



7. Artigo 2

1 Introdução

O câncer se configura como uma doença de maior morbidade e mortalidade do mundo atingindo 14 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes relacionadas a neoplasia em 2012. Doença grave e considerada um problema de saúde pública em todo o mundo e é uma das causas mais relevantes de morbimortalidade entre crianças e adultos (INCA, 2015). Segundo a organização mundial de saúde (OMS) o número de casos novos deve aumentar em 70% nas próximas duas décadas (OMS, 2015). É uma doença multifatorial na qual as células adquirem a capacidade de multiplicação e crescem descontroladamente (1)(2).

Atualmente, o principal método de tratamento para pacientes com câncer é a quimioterapia sistêmica difusa. No entanto muitos pacientes desenvolvem resistência aos tratamentos e esse é um dos maiores obstáculos que interferem significativamente na eficácia da quimioterapia frente às neoplasias, levando as células a desenvolverem adaptações aos agentes quimioterápicos (3). Assim a busca de novos compostos é de grande importância. Uma estratégia da química medicinal, utilizada para a concepção e desenvolvimento de um novo medicamento, é a hibridização molecular. Essa técnica baseia-se na ligação de dois ou mais grupo farmacofóricos, que já tem atividade descrita, em uma mesma molécula. O objetivo da hibridização molecular é obter medicamentos mais potentes, eficazes, seguros e confiáveis(4).

Assim os derivados tiazacridínicos, surgem dessa abordagem, são derivados formados a partir da fusão de dois importantes farmacóforos o anel tiazolidínico e o anel acridínico. O anel tiazolidínico atua como agonista sintético dos receptores PPARs (receptores ativados por proliferador de peroxissoma). Alguns estudos recentes mostram o papel antineoplásico deste receptor, participando na indução da apoptose celular (5). Ligantes sintéticos do PPAR γ tem papel antitumoral frente a linhagens de câncer de pulmão (6), câncer esofágico (7) e leucemias entre outras neoplasias (8). O anel acridínico é uma moléculas que apresenta uma estrutura química tricíclica com três anéis fusionados e possuem a capacidade de se intercalar com o DNA e inibir enzimas como importante do processo de replicação celular como a topoisomerase I e II e a telomerase (9)(10).

Neste contexto, a descoberta de novos agentes com atividade anticâncer é emergente. Esse estudo tem como objetivo avaliar a atividade anticâncer de um composto híbrido a fim de identificar sua atividade anticâncer.

2 Metodologia

2.1 Derivado tiazacridínico

O composto LPSF/AA-29(3-Acridina-9- ilmetileno-5-(5-bromo- 1H-indol-3-ilmetileno)- tiazolidina-2,4-diona) foi sintetizado pelo grupo Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF). Na tabela 1 podem ser observado à composição química do composto e a estrutura molecular. O derivado foi gentilmente cedido pela profa. Maria do Carmo A. Lima e pelo prof. Ivan da Rocha Pitta. A respectiva estrutura química foi previamente caracterizada pela pesquisadora Dra Marina Galdino da Rocha Pitta. Para os experimentos subsequentes o derivado foi diluído em DMSO (Sigma). As diluições mais baixas foram feitas diretamente no meio de cultura. A concentração final de DMSO, em todos os testes, incluindo os controles, foi no máximo de 0,2%.

2.2 Cultivo de células

As células da linhagem tumoral de mama MCF-7 foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino, 10 mM de HEPES e 1% U/mL de Penicilina/Estreptomicina. Todas as linhagens foram mantidas em estufa de CO₂ 5% a 37°C e foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro.

2.3 Ensaios de seletividade

Células mononucleares de sangue periférico (PBMC, do inglês *Peripheral blood mononuclear cells*) foram obtidas de doadores saudáveis, não fumantes e que não haviam ingerido bebida alcoólica ou consumido drogas por pelo menos 3 dias antes da coleta. As PBMCs foram isoladas através de método padrão de centrifugação por gradiente de densidade com Ficoll-Hypaque (GE Healthcare). As células foram contadas em Câmara de Neubauer, e a viabilidade foi determinada pelo método de exclusão azul de tripan. Os ensaios prosseguiram apenas quando a viabilidade celular foi superior a 98%. As células foram plaqueadas em placa de 96 poços (10⁶ células/poço) e mantidas em estufa de atmosfera úmida a 37°C, com 5% de CO₂ (v/v). Após 24 horas, foram adicionados (25, 50 e 75µM) dos compostos avaliados. As placas incubadas por dois dias (48 horas). Após esse período, os procedimentos foram realizados como descritos no item 2.4. Todos os doadores assinaram um termo de

consentimento livre e esclarecido (TCLE), e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE (CEP/CCS/UFPE N° 11006/12).

2.4 Ensaios de citotoxicidade em células tumorais

O teste de citotoxicidade *in vitro* foi realizado nas células neoplásicas e normais com diferentes concentrações dos derivados tiazacridínicos. A citotoxicidade celular foi quantificada pelo método colorimétrico 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT). Este consiste em um método sensível que possui a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas desidrogenases mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. As células foram distribuídas em placas de 96 poços com 1×10^4 por poço. Após 24h diferentes concentrações do derivado LPSF/AA-29(1, 10, 25, 50 e $75\mu\text{M}$) foram adicionadas posteriormente as placas incubadas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO_2 por 48 h e 72h para as células normais e neoplásicas, respectivamente. Passado o período de incubação foram adicionados 20 μL da solução de MTT (3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) na concentração de 5 mg/mL diluída em PBS, as placas foram então protegidas da luz e incubadas mais uma vez em estufa úmida a 37°C e 5% de CO_2 por um período de 3h. Foram adicionados 130 μL de SDS 20% por poço e densidade óptica medida após 24 horas no comprimento de onda de 560 nm. A leitura foi realizada em um leitor de microplacas (EL808 - Biotek®). A determinação do potencial citotóxico dos compostos testados foi calculada em relação ao controle tratado com o veículo DMSO a 0,01%. Para determinação da concentração de composto necessária para 50% de inibição *in vitro* (IC₅₀) foram realizados três ensaios independentes de redução do MTT. O IC₅₀ de cada ensaio foi calculado com o auxílio do programa OriginPro 8 (Originlab Corporation®, Northampton, MA, EUA).

2.5 Análise do Ciclo celular

As células foram distribuídas em placas de 6 poços numa concentração de $0,5 \times 10^6$ células por poço e tratadas na concentração do IC₅₀ e após 48 horas as células foram tripsinizadas e lavadas 2x com PBS e fixadas em álcool 70 % à $4-6^\circ\text{C}$, em seguida, as células

foram incubadas por 24 horas à - 20 °C. Em uma segunda etapa, as células foram marcadas com iodeto de propídeo (5 mg/mL) / RNase A (0,25 mg/mL) em PBS por 30 minutos sobre o gelo e protegido da luz. O conteúdo de DNA celular foi quantificado através de citometria de fluxo utilizando o citômetro de fluxo Accuri C6, onde a porcentagem de DNA em cada fase do ciclo foi obtida pelo programa C6 software (Becton, Dickinson and Company, USA).

2.6 Ensaio de *Would Healing*

As células foram distribuídas em placas de seis poços numa densidade de 5×10^5 por poço em placas de 24 poços e incubadas à 37 °C sob atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas. Após atingir a confluência necessária, o meio de crescimento foi aspirado e duas lavagens com PBS 1X foram realizadas, em seguida, com o auxílio de uma régua metálica foram feitas duas linhas de marcação (estrias) perpendiculares utilizando uma pipeta P1000. Após o procedimento de marcação das estrias as células foram tratadas com meio completo (controle), DMSO 0,1% e LPSF/AA-29, nas concentrações previamente determinadas pelo IC₅₀, fotografadas no microscópio invertido (t = 0) e incubadas por 48 horas (t= 48) nas mesmas condições acima. Os dados do ensaio de migração foram obtidos a partir da análise das imagens através do programa ImageJ (Versão 1.49) (NIH, USA).

2.7 Análise da indução de morte celular

A apoptose também foi avaliada por dupla coloração de fluorescência com DAPI (Sigma) e laranja de acridina (AO) (AO/DAPI). As células MCF-7 foram tratadas com o composto LPSF/AA-29 (IC₅₀= 40,76 µM) durante 48 horas e depois as células foram lavadas 2 vezes com PBS 1X e fixadas com paraformaldeído a 4% durante 20 minutos. As células foram coradas com AO (8,5 ug /ml) e o corante nuclear com DAPI (5 ug /ml) durante 15 min no escuro e lavadas novamente por 2 vezes com PBS 1x. Posteriormente as lamínas foram analisadas sob uma ampliação de X10 utilizando um microscópio de fluorescência. As células em apoptose exibem um núcleo verde-claro em que a condensação da cromatina era observada pela presença de áreas verdes densas. As células apoptóticas foram calculadas como a razão de células apoptóticas (células com características apoptóticas) para o total de células. Foram contados 10 campos com o auxílio do programa ImageJ (Versão 1.49) (NIH, USA).

2.8 Avaliação da clivagem de caspase 7

As células MCF-7 foram cultivadas 5×10^5 por poço em placas de 6 poços e incubadas à 37 °C sob atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas. As células foram tratadas na concentração do IC₅₀ com os compostos LPSF/AA-29e após 48 horas as células foram tripsinizadas e lavadas 2x com PBS. Posteriormente foram ressuspensas em meio completo e marcadas com o reagente Cell Event® Caspase 3/7 Green por 30 minutos e incubadas à 37 °C a 5% de CO₂. E durante 5 minutos marcado com SYTOX® AADvanced para marcar as células necróticas. Sendo lido utilizando o citômetro ATTUNE. E posteriormente os resultados foram analisados utilizando o software flowjow. O kit utilizando não distingue as caspases efetora 3 e 7 no entanto a células de mama MCF-7 possui o gene da caspase 3 truncado, desta forma não expressão esse proteína (11)(12).

2.9 Ensaio de inibição da atividade da enzima topoisomerase II

A avaliação da atividade de inibição da enzima topoisomerase II em LPSF/ AA-29foi realizada utilizando o kit Topoisomerase II Drug Screening (plasmid based) (TopoGEN, EUA). O DNA (pHOT1 plasmídeo) super-enovelado foi incubado com a topoisomerase II humana (5 unidades) na presença ou ausência de LPSF/AA-29(50 e 100 µM). O solvente DMSO (0,2%) foi utilizado como controle do veículo e etoposídeo (50 µM) como controle positivo. A eletroforese em gel de agarose (1%) foi realizada com o tampão acetato de Tris-EDTA (TAE), com voltagem de 2V/cm por um período de 50 minutos. Após a corrida, o gel foi corado com 0,5 µg/mL de brometo de etídio durante 15 minutos e fotografado sob a luz ultravioleta (UV). A análise quantitativa das bandas do gel foi realizada utilizando o programa ImageJ (Versão 1.49) (NIH, USA).

2.10. Ensaio de citotoxicidade em células neoplásicas: MTT Tridimensional

Ao início de cada experimento era avaliada a viabilidade das células por azul de tripan das células antes delas serem plaqueadas. As células foram lavadas duas vezes com PBS 1x estéril e depois tripsinizadas até que as células se dissociem do fundo da garrafa de cultura. A tripsina foi inativada utilizado meio completo. As células foram transferidas para um tubo cônico e centrifugadas a 2000 rpm por 3 minutos para, o meio foi desprezado e as células

ressuspendidas. Foram plaqueadas 3×10^3 por poço. Posteriormente após adição do matrigel com células a placa foi centrifugada a 200g durante 3 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente a placa foi incubada a 37 °C por 6 dias para promover a formação e o crescimento do esferóide. No dia 0 foi adicionado 50 µL de meio previamente aquecido a 37 °C com o composto, LPSF/LPSF/AA-29. A placa foi incubada a 37 °C durante 3 dias. Ao final das 72 horas de tratamento foram adicionados 15 µl do reagente MTT por poço no escuro e a placa de voltou para a estufa a 37 °C por mais 24 horas. Após esse período foi adicionado o detergente SDS a 37 °C 150 µl por poço e novamente a placa voltou a estufa para ser incubada por 24 horas a temperatura de 37 °C para completa solubilizar dos cristais de formazan. A placa foi lida em um leitor de placas Biotek EL 808 na absorbância a 570 nm.

2.11. Análise estatística

Os resultados foram analisados por teste t (Student), utilizando-se o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) considerado estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

3. Resultados e Discussão

3.1. Atividade in vitro em células normais

O derivado tiazacridínico foi inicialmente avaliado frente a células de PMBCs para analisar sua seletividade frente a células normais. O derivado tiazacridínico LPSF/AA-29 não apresentou citotoxicidade frente as células normais nas doses até $>75 \mu\text{M}$ como pode ser observado na Tabela 2. Em contraposição a Doxorubicina, controle antitumoral, apresentou baixa seletividade frente PBMCs com IC_{50} de $7,2 \mu\text{M}$. Desta forma o derivado tiazacridínico LPSF/AA-29 demonstrou ser seletivo frente a as células tumorais, diferentemente da droga utilizada no estudo como controle, doxorubicina. As células PBMCs são comumente utilizadas para avaliação de novos frente a células normais (tabela 2) (3). Barros e colaboradores em 2012, que também estudavam derivados tiazacridínicos e demonstraram também a seletividade desses derivados (13). A seletividade frente a células normais é uma importante característica para o desenvolvimento de um novo fármaco(14)(15).

3.2. Citotoxicidade in vitro em células tumorais

Frente às linhagens tumorais de mama (MCF-7) o composto LPSF/AA-29 exibiu atividade citotóxica com IC_{50} de 40,75 μ M tabela 2. Os derivados acridínicos são derivados amplamente estudados e vindo sendo utilizados desde o início do século 20 como agente antibacteriano local. No entanto somente em 1970 começaram a ser utilizados no tratamento do câncer. Os resultados de Pitta e colaboradores (2013) encontraram que derivados tiazacridínicos também apresentou atividade anti-proliferativa contra células de câncer de cólon e melanoma(8). A doxorubicina faz parte da família antraciclina e é utilizada para o tratamento carcinoma de mama, de ovário, de próstata, de bexiga, de cabeça e pescoço além de linfomas e leucemias também no entanto ela apresenta-se bastante tóxica(1)(16).

3.3. *Efeitos sobre o ciclo celular da linhagem tumoral de mama MCF-7*

O derivado tiazacridínico LPSF/AA-29 induziu um aumento da porcentagem de células na fase G₀/G₁ de 52,93% para 60,2% quando comparado a condição não tratada na linhagem MCF-7, mas não significativamente estatístico (tabela 3). A indução da alteração no ciclo celular pode levar às células tumorais a morte. Muitos agentes antiproliferativos interferem na maquinaria do ciclo celular e para podem reter as células em diversas fases do ciclo celular (17)(18). O anel tiazolidínico pode estar envolvido no mecanismo de indução do arrasto do ciclo celular. Trabalhos mostram que a Troglitazona, é uma molécula da família das tiazolidinodionas, induz o arrasto no ciclo celular em linhagens de carcinoma de próstata (PC-3) (19)(5). Fajas e colaboradores também demonstraram a capacidade do Troglitazona induzir arrasto no ciclo celular na fase G₁ em células de hepatocarcinoma celular (HLF)(20). González-Sánchez et al (2011) também encontraram alteração no ciclo celular, fase G₂/M em células de leucemia (K562) tratada com um derivado acridínico, 9-anilinoacridines (3). O derivado LPSF/AA-29 possui o anel 5-Bromo-indol na sua estrutura química. Esse grupamento químico pode ter aumentando capacidade citotóxica desse derivado. Alguns artigos sugerem que esse grupamento aumenta a atividade citotóxica frente a células de câncer de bexiga, câncer colón retal, de câncer de mama (21),(22),(23). Adicionalmente Romagnoli e colaboradores (2013) destacaram que o substituinte indol aumenta a inibição do crescimento de células de câncer de mama MCF-7(24).

3.4. *Efeitos do derivado LPSF/AA-29 sobre a migração da célula MCF-7*

Foi observado que o tratamento com o derivado LPSF/AA-29 inibiu migração celular na linhagem MCF-7 utilizando o método de *Wound Healing* (figura 1). O derivado LPSF/AA-29 inibiu significativamente a migração das células MCF-7 na concentração do IC_{50} , quando

comparado ao não tratado ($p= 0,0147$) e quando comparada ao veículo DMSO ($p=0,0147$). Ademais também foi observado a diminuição da migração celular na dose de IC_{25} quando comparada tanto ao não tratado ($p=0,0364$) e ao DMSO ($p=0,0323$) como pode ser observado na figura 1. A migração celular tornar-se aberrante na maioria das células tumorais e pode levar a invasão maligna nos tecidos adjacentes e vasos sanguíneos. Um agente quimiopreventivo potente implica na inibição da migração de células cancerosas principalmente em estágios avançados da doença maligna (11). A migração celular é um estágio primordial para o desenvolvimento de metástases (25). Como a migração é um pré-requisito para o desenvolvimento de metástases, e elas levam a 90% das mortes por tumores sólidos, inibir a migração celular é uma estratégia interessante para avaliar o desempenho de um novo derivado anticâncer (26). Em células de câncer de pulmão de não pequenas células (NSCLC) a troglitazona inibiu a migração e também causou arrasto no ciclo celular(27).

3.5. Efeito do derivado LPSF/AA-29 na indução de morte

A análise semi-quantitativa do número de células apoptóticas marcadas com Laranja de acridina/DAPI em células MCF-7 tratadas derivado tiazacridínico LPSF/AA-29 mostrou um aumento significativo quando comparada as células sem tratamento ($p= 0,0015$). O número de células da linhagem MCF-7 que exibiram alterações com característica morfológica de apoptose, como contração nuclear, fragmentação da cromatina e membrana citoplasmática íntegra com um aumento de 3,14% para 56,24% quando comparada ao controle não tratado, esses dados podem ser observados na figura 2. Esses resultados sugerem que o derivado LPSF/AA-29 induz a apoptose celular. O D3CLP e outros derivados tiazacridínicos induziram o aumento de células apoptóticas (3). As células tumorais ativam várias vias de sobrevivência celular como genes envolvidos na supressão tumoral, induzir a apoptose celular é uma ferramenta terapêutica valiosa no desenvolvimento de novos fármacos (28).

3.6. Avaliação da clivagem de caspase 7

Avaliamos a clivagem da caspase efetora 7 elas é uma proteínas que permanecem inativa no citoplasma celular, mas durante o processo de morte celular, elas são clivadas e se tornam ativas tento a função de desmontar todo o aparato nuclear e o citoesqueleto (26). Observamos que o derivado tiazacridínico LPSF/AA-29 foi capaz de induzir o aumento significativo da porcentagem de células marcadas para clivagem da caspase 7 efetora. Como pode ser observado na figura 4 o LPSF/AA-29 induziu um aumento de 4,15% células não tratadas para 23,6% somente para a marcação com caspase efetora 7 e aumentou de 2,28% para 38,12% duplamente

marcadas. Mostrando assim que o mecanismo de indução da apoptose é dependente de caspase. Não foi observado indução da clivagem da caspase 7 efetora na concentração de 25 μM em 48 horas de tratamento com o controle etoposídeo. Adicionalmente, diversos estudos têm relatado que os agonistas de PPAR γ apresentam atividade anticâncer para diferentes tipos tumorais induzindo a apoptose destas células (6)(8). Salem e colaboradores (2016) encontraram que derivados acridínicos induziram apoptose significativamente em células de HL-60. Cui et al 2016 encontrou derivados acridínicos apresentaram boa citotoxicidade em células tumorais K562 e HepG-2 *in vitro*. Cock e colaboradores (1998) demonstraram que o mecanismo de indução da apoptose do etoposídeo é via indução da clivagem de caspase 8 (29).

3.7. Avaliação do derivado LPSF/AA-29 no microambiente tridimensional

Avaliamos também a atividade citotóxica do derivado LPSF/AA-29 utilizando a cultura tridimensional onde as células MCF-7 crescem em formato de esferóides (figura 5). Observamos que o derivado LPSF/AA-29 apresentou um IC₅₀ menor no modelo tridimensional do que no modelo tradicional bidimensional apresentando o IC₅₀ de 35,2 μM ($\pm 6,20$) e de 40 μM ($\pm 8,22$) respectivamente. Peng e colaboradores (2013) também encontraram um aumento da morte celular no modelo tridimensional maior do que no modelo bidimensional em células de câncer de bexiga (T24) (30).

3.8. Avaliação da inibição da Topoisomerase II

Avaliamos a capacidade de inibição da enzima topoisomerase II pelo derivado LPSF/AA-29 nas concentrações de 50 e 100 μM . A Figura 6 mostra que o derivado LPSF/AA-29 reduziu os níveis de DNA relaxado quando comparado ao controle com DMSO a 0,2%. Opegard e colaboradores (2009) demonstraram que os derivados de 9-aminoacridinas inibiram a proliferação das células tumorais pancreáticas além de inibir a atividade catalítica da enzima topoisomerase II (31). As acridinas e seus derivados apresentam atividade antitumoral decorrentes da sua estrutura química capaz de intercalar na dupla fita de DNA além de inibir as enzimas topoisomerasas e telomerasas, desencadeando morte celular ou parada do ciclo celular(9)(32). González-Sánchez e colaboradores (2011) demonstraram que o derivado tiazolidinodiona D3CPL se intercala com o DNA e inibe o enzima topoisomerase II em células de leucemia (K-562)(3). Como também Janochava et al (2015) demonstraram que novos

derivados acridínicos inibiram as enzimas topoisomerase I e II frente a linhagem de leucemia humana (HL-60)(33).

4. Conclusão

O derivado tiazacridínico LPSF/AA-29 não foi citotóxicos frente as células normais de pacientes sadios, já a doxorubicina foi citotóxica. Além disso ele inibiu o crescimento de células tumorais induzindo um arrasto no ciclo celular. Ele também inibiu a migração das células MCF-7, além de induzir apoptose na linhagem de câncer de mama. O derivado também inibiu o crescimento da linhagem MCF-7 em um microambiente tridimensional. A enzima topoisomerase II também foi inibida pelo derivado LPSF/AA-29.

5. Referencias

1. Almeida VL, Leitão A, Barrett Reina LDC, Montanari CA, Donnici CL, Lopes MTP. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. *Quim Nova*. 2005;28(1):118–29.
2. Rosas MSL., Silva BNM., Pinto RGMP., Silva BV., Silva R a ., Guerra LR., et al. Incidence of Cancer in Brazil and the Potential Use of Isatin Derivatives in Experimental Oncology. *Rev Virtual Química*. 2013;5(2).
3. González-Sánchez I, Solano JD, Loza-Mejía M a., Olvera-Vázquez S, Rodríguez-Sotres R, Morán J, et al. Antineoplastic activity of the thiazolo[5,4-b]quinoline derivative D3CLP in K-562 cells is mediated through effector caspases activation. *Eur J Med Chem [Internet]*. 2011;46(6):2102–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0223523411001917>
4. Mohareb, R. M. Abdo NYM. Synthesis and Cytotoxic Evaluation of Pyran , Dihydropyridine and Thiophene Derivatives of 3-Acetylcoumarin. *Chem Pharm Bull*. 2015;63(9):678–87.
5. Elrod H a., Sun S-Y. PPAR γ and Apoptosis in Cancer. *PPAR Res [Internet]*. 2008;2008:1–12. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/ppar/2008/704165/>
6. Han SW. Anticancer actions of PPAR γ ligands: Current state and future perspectives in human lung cancer. *World J Biol Chem [Internet]*. 2010;1(3):31. Available from: <http://www.wjgnet.com/1949-8454/full/v1/i3/31.htm>
7. Sawayama H, Ishimoto T, Watanabe M, Yoshida N, Sugihara H, Kurashige J, et al. Small Molecule Agonists of PPAR- Exert Therapeutic Effects in Esophageal Cancer. *Cancer Res [Internet]*. 2014;74(2):575–85. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-13-1836>
8. da Rocha Pitta MG, Souza ÉS, Barros FWA, Moraes Filho MO, Pessoa CO, Hernandes MZ, et al. Synthesis and in vitro anticancer activity of novel thiazacridine derivatives.

- Med Chem Res [Internet]. 2013;22(5):2421–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00044-012-0236-2>
9. Denny W a. Acridine derivatives as chemotherapeutic agents. *Curr Med Chem*. 2002;9(18):1655–65.
 10. Ketron AC, Denny W a, Graves DE, Osheroff N. Amsacrine as a topoisomerase II poison: Importance of drug-DNA interactions. *Biochemistry* [Internet]. 2012;51(8):1730–9. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi201159b>
 11. Kumar DRN, George VC, Suresh PK, Kumar RA. ACCELERATION OF PRO-CASPASE-3 MATURATION AND CELL MIGRATION INHIBITION IN HUMAN BREAST CANCER CELLS BY PHYTOCONSTITUENTS OF RHEUM EMODI RHIZOME EXTRACTS. *EXCLI J*. 2013;12:462–78.
 12. Tor YS, Yazan LS, Foo JB, Wibowo A, Ismail N, Cheah YK, et al. Induction of apoptosis in MCF-7 cells via oxidative stress generation, mitochondria-dependent and caspase-independent pathway by ethyl acetate extract of *Dillenia suffruticosa* and its chemical profile. *PLoS One*. 2015;10(6):1–25.
 13. Barros FW a., Silva TG, da Rocha Pitta MG, Bezerra DP, Costa-Lotufo L V., de Moraes MO, et al. Synthesis and cytotoxic activity of new acridine-thiazolidine derivatives. *Bioorg Med Chem* [Internet]. 2012;20(11):3533–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968089612002829>
 14. Hafidh RR, Abdulmir AS, Bakar FA, Jalilian FA, Abas F, Sekawi Z. Novel molecular, cytotoxic, and immunological study on promising and selective anticancer activity of mung bean sprouts. *BMC Complement Altern Med* [Internet]. 2012;12:208. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3522559&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 15. Ma X, Wang Z. Anticancer drug discovery in the future: an evolutionary perspective. *Drug Discov Today* [Internet]. 2009;14(23–24):1136–42. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644609003316>
 16. Papagiannaros A, Hatziantoniou S, Dimas K, Papaioannou GT, Demetzos C. A liposomal formulation of doxorubicin, composed of hexadecylphosphocholine (HePC): Physicochemical characterization and cytotoxic activity against human cancer cell lines. *Biomed Pharmacother*. 2006;60(1):36–42.
 17. Kim S-H, Hwang C-I, Juhnn Y-S, Lee J-H, Park W-Y, Song Y-S. GADD153 mediates celecoxib-induced apoptosis in cervical cancer cells. *Carcinogenesis* [Internet]. 2007;28(1):223–31. Available from: <http://www.carcin.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/carcin/bgl227>
 18. Karthik S, Sankar R, Varunkumar K, Ravikumar V. Romidepsin induces cell cycle arrest, apoptosis, histone hyperacetylation and reduces matrix metalloproteinases 2 and 9 expression in bortezomib sensitized non-small cell lung cancer cells. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2014;68(3):327–34. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332214000055>
 19. HAI ZHU1,2, XIAOJING PAN4, HAIYAN QI2, XUECHUN WANG3, SICHUAN

- HOU2, BAOJIAN HAN5 ZL and LX. Troglitazone attenuates epidermal growth factor receptor signaling independently of peroxisome proliferator- activated receptor in PC-3 cells. *Oncol Rep.* 2010;25:81–90.
20. Fajas L, Egler V, Reiter R, Miard S, Lefebvre A-M, Auwerx J. PPAR γ controls cell proliferation and apoptosis in an RB-dependent manner. *Oncogene* [Internet]. 2003;22(27):4186–93. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.onc.1206530>
 21. Kassouf WSC, Maen Abdelrahim GN, Safe S, Kamat AM. Inhibition of Bladder Tumor Growth by 1,1-Bis(3'-Indolyl)-1-(p-Substitutedphenyl)Methanes: A New Class of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Agonists. *Cancer Res* [Internet]. 2006;66(1):412–8. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-05-2755>
 22. Mansure JJ, Nassim R, Chevalier S, Szymanski K, Rocha J, Aldousari S, et al. A Novel Mechanism of PPAR Gamma Induction via EGFR Signalling Constitutes Rational for Combination Therapy in Bladder Cancer. *PLoS One* [Internet]. 2013;8(2):e55997. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0055997>
 23. Revelant G, Huber-villaume S, Dunand S, Kirsch G. Synthesis and biological evaluation of novel 2-heteroarylimino-1,3-thiazolidin-4-ones as potential anti-tumor agents. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2015;94:102–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.02.053>
 24. Romagnoli R, Baraldi PG, Salvador MK, Preti D, Tabrizi MA, Bassetto M, et al. Synthesis and Biological Evaluation of 2 - (Alkoxy carbonyl)-3- Anilinobenzo[b]thiophenes and Thieno[2,3 - b]pyridines as New Potent Anticancer Agents. *J Med Chem.* 2013;4.
 25. Abu N, Akhtar MN, Yeap SK, Lim KL, Ho WY, Zufadli AJ, et al. Flavokawain a induces apoptosis in MCF-7 and MDA-MB231 and inhibits the metastatic process in vitro. *PLoS One.* 2014;9(10):1–12.
 26. Xu W-S, Li T, Wu G-S, Dang Y-Y, Hao W-H, Chen X-P, et al. Effects of Furanodiene on 95-D Lung Cancer Cells: Apoptosis, Autophagy and G1 Phase Cell Cycle Arrest. *Am J Chin Med* [Internet]. 2014;42(1):243–55. Available from: <http://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/S0192415X14500165>
 27. Keshamouni VG, Han S, Roman J. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Lung Cancer. *PPAR Res* [Internet]. 2007;2007:1–10. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/ppar/2007/090289/abs/>
 28. Hanahan D, Weinberg R a. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* [Internet]. 2011;144(5):646–74. Available from: <http://www.cell.com/article/S0092867411001279/fulltext>
 29. Boesen-de Cock JG, de Vries E, Williams GT, Borst J. The anti-cancer drug etoposide can induce caspase-8 processing and apoptosis in the absence of CD95 receptor-ligand interaction. *Apoptosis.* 1998;3(1):17–25.
 30. Peng C-C, Chyau C-C, Wang H-E, Chang C-H, Chen K-C, Chou K-Y, et al. Cytotoxicity of ferulic Acid on T24 cell line differentiated by different

microenvironments. *Biomed Res Int* [Internet]. 2013;2013:579859. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3662181&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

31. Oppegard LM, Ougolkov A V., Luchini DN, Schoon R a., Goodell JR, Kaur H, et al. Novel acridine-based compounds that exhibit an anti-pancreatic cancer activity are catalytic inhibitors of human topoisomerase II. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2009;602(2–3):223–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299908011916>
32. Ketron AC, Denny WA, Graves DE, Osheroff N. *Interactions*. 2012;
33. Janočková J, Plšíková J, Kašpárková J, Brabec V, Jendželovský R, Mikeš J, et al. Inhibition of DNA topoisomerases i and II and growth inhibition of HL-60 cells by novel acridine-based compounds. *Eur J Pharm Sci*. 2015;76(May):192–202.

Tabelas

Tabela 1. Estrutura química do derivado tiazacridínico LPSF/AA-29.

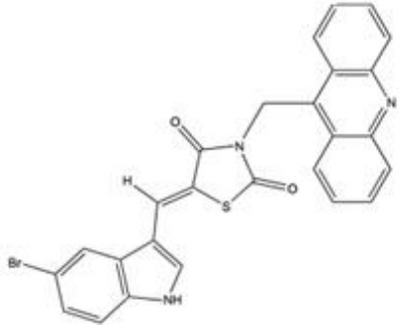
Código	Nome químico	Fórmula molecular	Estrutura molecular
LPSF/AA-29	3-Acridina-9-ilmetileno-5-(5-bromo-1 <i>H</i> -indol-3-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona	C ₂₆ H ₁₆ BrN ₃ O ₂ S	

Tabela 2. Concentração inibitória de 50% (IC₅₀) do derivado tiazacridínico LPSF/AA-29 em PBMCs e em células tumorais de mama (MCF-7).

IC ₅₀ (μM)	PBMCs	MCF-7
LPSF/AA-29	>75μM	40,76 μM
Doxurrubicina	7,2μM	6,51μM

Tabela 3. Efeito do derivado LPSF/AA-29 nas fases do ciclo celular das células MCF-7

	Sub-G0	G0/G1	S	G2/M
NT	0,5 ±0,45	52,93±6,15	5,43±2,10	42,06±6,12
LPSF/AA-29	1,7±1,56	60,2±0,14	4,85±4,85	32,75±3,46

Figuras

Figura 1. Efeito do derivado LPSF/AA-29 na migração celular após 48 horas de tratamento, nas doses do IC₅₀ e IC₂₅. O derivado LPSF/AA-29 reduziu significativamente a área ocupada após 48 horas quando comparado ao não tratado (NT) e a veículo utilizado DMSO.

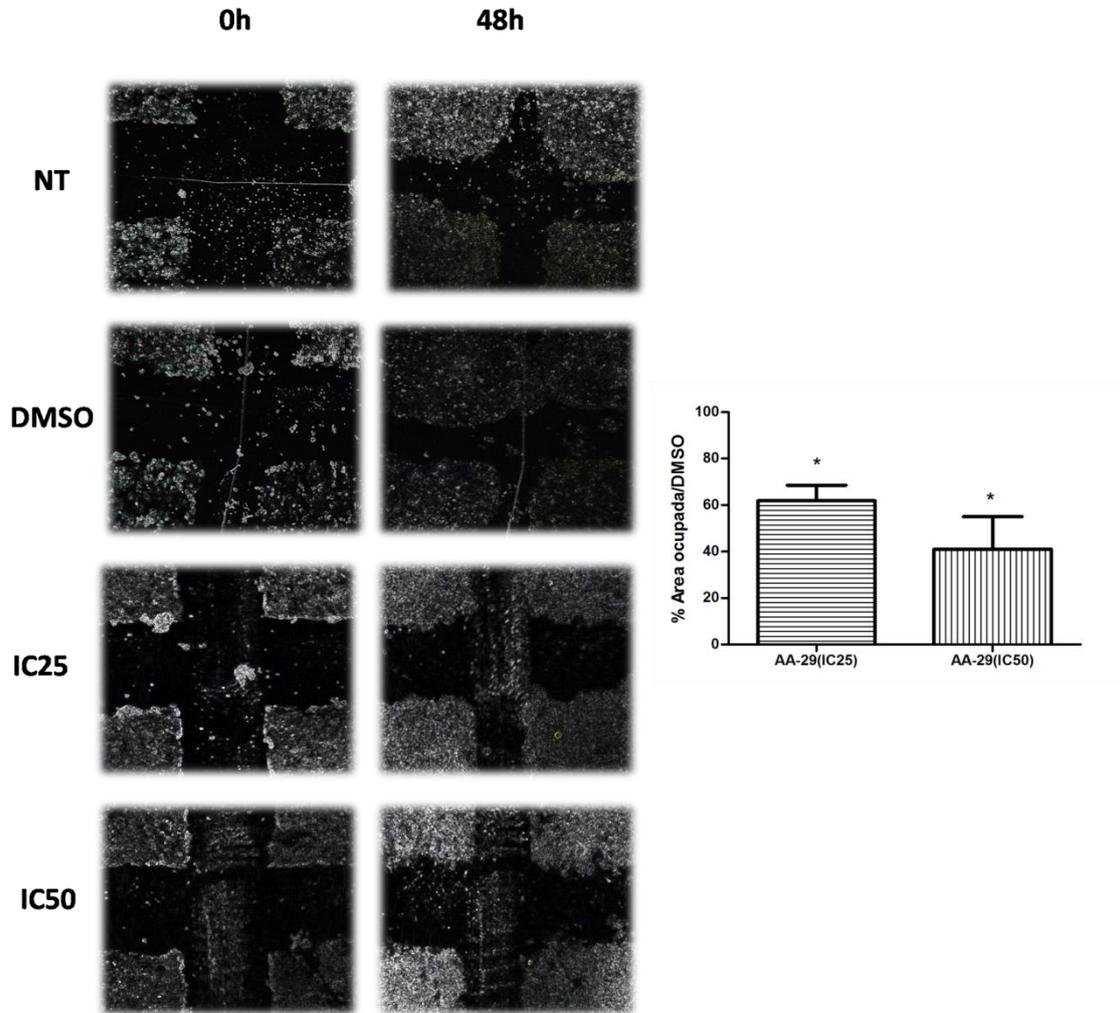


Figura 2. Efeito do derivado LPSF/AA-29 na apoptose das células MCF-7 utilizando a marcação com laranja de acridina/DAPI

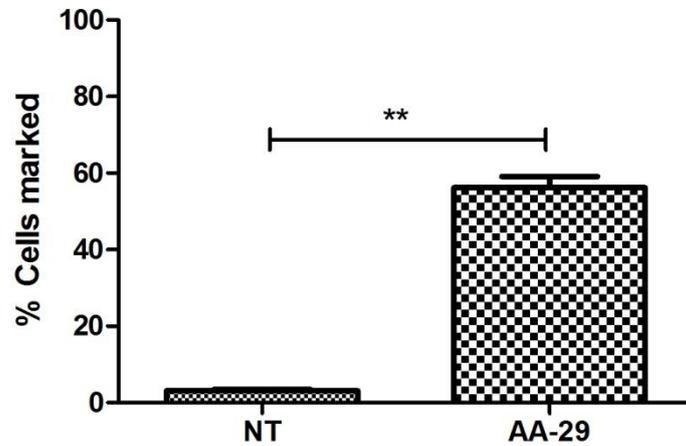


Figura 3. Análise da indução de caspase 7 em células de adenocarcinoma de mama após tratamento com o derivado LPSF/AA-29. O controle antitumoral etoposídeo foi utilizado como fármaco referência. Os asteriscos representam os valores de p inferiores a 0,005. DN= Duplamente negativo e DP= Duplamente positivo.

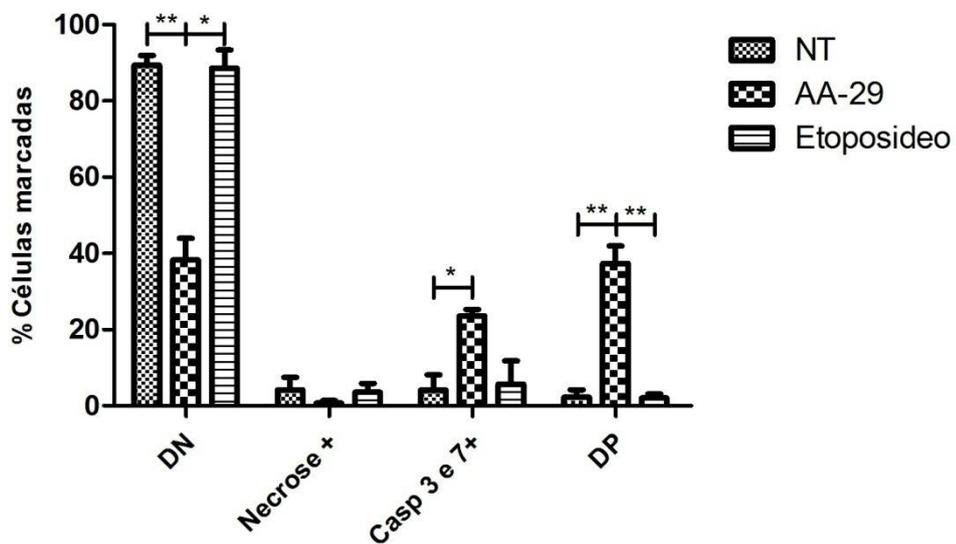


Figura 4. Efeito citotóxico do derivado tiazacridínico LPSF/AA-29 em células de adenocarcinoma de mama crescidas em um modelo de cultura tridimensional. As barras representam os IC50s obtidos no modelo bidimensional e tridimensional

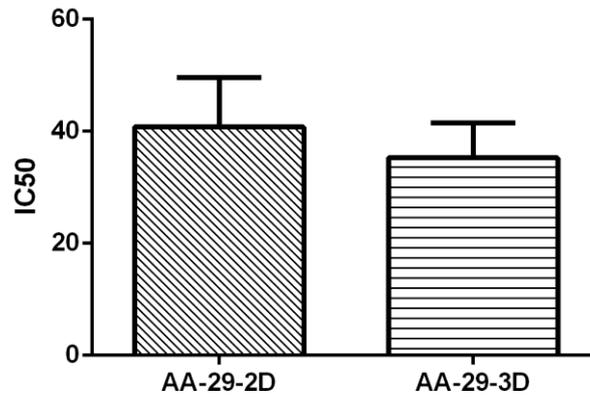
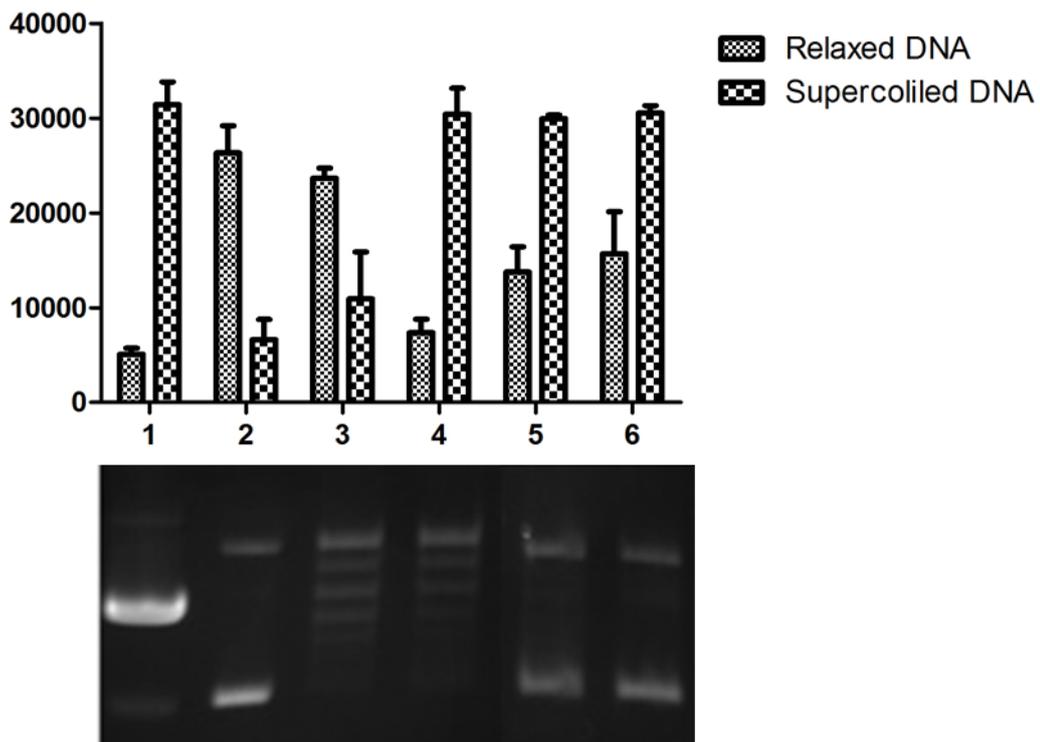
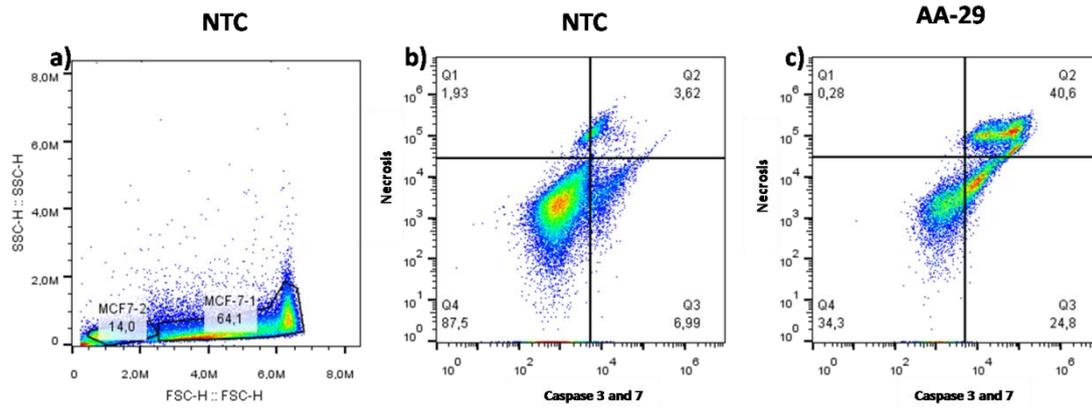


Figure 5. Análise semi-quantitativa do derivado LPSF/AA-29 mostrando os efeitos sobre da topoisomerase II sobre o DNA plasmidial relaxado humano pOHT-1. O tratamento do derivado LPSF/AA-29 reduziu significativamente o relaxamento do DNA quando comparado ao veículo (DMSO) indicado pela inibição da topoisomerase II. [1 - DNA pOHT-1; 2- DNA pOHT-1 + topo II; 3- DNA pOHT-1 + topo II + DMSO 0,2%; 4- DNA pOHT-1 + topo II + Etoposídeo 50 μ M; 5-6- DNA pOHT-1 + topo II + LPSF/AA-29 50 e 100 μ M, respectivamente]



Suplementar

Figura S1: Efeito do derivado LPSF/AA-29 na expressão das caspases 7, em células de mama MCF-7 não tratadas (b) e tratadas com LPSF/AA-29(c) por 48 horas. (a) gráfico do tamanho por granulidade das células MCF-7.



8. DISCUSSÃO

Observamos que os compostos SB-44, SB-83 e SB-200 apresentaram boa seletividade nas células normais comparado às células tumorais ($IC_{50} > 75 \mu M$), somente o SB-200 apresentou citotoxicidade em células normais apresentando IC_{50} $52,13 \mu M$. Todos os compostos tiofênicos e o derivado tiazacridínico LPSF/AA-29 apresentaram atividade citostática frente a linhagem MCF-7. O composto SB-200 foi o derivado que apresentou o menor IC_{50} de $14,86 \mu M$, nesta linhagem. Todos os derivados tiofênicos aumentaram significativamente a porcentagem de células na fase G0/G1 enquanto que o derivado LPSF/AA-29 também alterou o ciclo celular das células MCF-7. Somente os compostos SB-83 e AA-29 inibiram significativamente a migração celular da linhagem MCF-7 nas doses do IC_{50} e IC_{25} , respectivamente. No entanto, o composto SB-200 aumentou de 3,5% para 35,35% a porcentagem de células em apoptose comparado as células não tratadas. Enquanto que o composto LPSF/AA-29 aumentou a porcentagem para 56,24% de células em apoptose.

Os derivados tiofênicos e o derivado LPSF/AA-29 que apresentaram atividade frente linhagens tumorais possuem o anel indol na sua estrutura química. Dentre os derivados tiofênicos, os que possuíram melhor atividade foram o SB83 e o SB-200, ambos possuíam o 5-Bromo-indol como substituinte. Desta forma esse grupamento químico pode ter aumentando capacidade citotóxica desses derivados. Alguns artigos sugerem que esse grupamento aumenta a atividade antineoplásicas em células de câncer de bexiga, câncer colón retal, de câncer de mama (KASSOUF, 2006; MANSURE et al., 2013; REVELANT et al., 2015). Adicionalmente Romagnoli e colaboradores (2013) destacaram que o substituinte indol aumenta a atividade citotóxica e a inibição no crescimento de células de câncer de mama MCF-7 (ROMAGNOLI et al., 2013).

Todos os derivados tiofênicos e o derivado tiazacridínico LPSF/AA-29 induziram o arrasto no ciclo celular na linhagem de mama MCF-7. A indução da alteração no ciclo celular pode levar às células tumorais a morte. Muitos agentes antiproliferativos interferem na maquinaria do ciclo celular e para podem reter as células em diversas fases do ciclo celular (KIM et al., 2007; KARTHIK et al., 2014). O anel tiazolidínico que está presente na moléculas dos derivados tiazacridínicos pode estar envolvido nos mecanismo de indução do arrasto do ciclo celular. Trabalhos mostram que a Troglitazona, é uma molécula da família das tiazolidinodionas, que exibe atividade hipoglicemiante, induz o arrasto no ciclo celular em linhagens de carcinoma de próstata (PC-3) (ZHU et al., 2010). Fajas e colaboradores também demonstraram a capacidade

do Troglitazona induzir arrasto no ciclo celular na fase G1 em células de hepatocarcinoma celular (HLF) (FAJAS et al., 2003).

Os derivados tiofênicos apresentaram o anel tiofênicos como grupo farmacofóricos e todos induziram o arrasto no ciclo celular. Doris Kaufmann et al 2007 reportaram que derivados tiofênicos diminuíram o crescimento e induziram um arrasto no ciclo celular na fase G2/M na linhagem de mama MDA-MB-231(KAUFMAN et al, 2007). O presente estudo encontrou um arrasto na fase G0/G1 assim como Romeo Romagnoli et al., 2013, que testaram derivados benzo[b]tiofênicos induziram arrasto na fase G2/M em células de HeLa e Jurkat. Estes estudos sugerem que a interrupção nas fases do ciclo celular pode ser células específica e composto específica também. Estudos tem mostrados que compostos sintéticos e naturais induzem arrasto no ciclo celular e promovem a morte celular, demonstrando assim que a parada do ciclo também está associada com mecanismos de morte celular (CONSTANT et al., 2013).

As metástases são a maior causa de morte em pacientes com câncer, as células tumorais precisam migrar para poder invadir outros tecidos (TUNG et al., 2015). Inibir a migração é um alvo terapêutico interessante para o desenvolvimento de novas drogas anticâncer (XU et al., 2014). Nos encontramos que somente o derivado tiofênico SB-83 e derivado tiazacridínico LPSF/AA-29 inibiram a migração das células de mama MCF-7. Estudos mostram que a troglitazona inibe a migração e causa uma arrasto no ciclo celular em células de câncer de pulmão de não pequenas células (NSCLC) (KESHAMOUNI et al, 2007).

Os derivados SB-200 e LPSF/AA-29 induziram alterações na cromatina das células MCF-7 tratadas com esses compostos. Essas alterações também foram observadas por Karthik e colaboradores (2014) que também encontrou alterações nucleares em células de câncer de pulmão (A549) tratadas com romidepsin e bortezomib tanto tratadas individualmente como em associação induzindo assim as células a apoptose celular (KARTHIK et al., 2014). A apoptose, morte celular programada, induz alterações morfológicas, como a diminuição nuclear, redução da adesão entre as células e fragmentação nuclear (LIU et al., 2006). Romagnoli et al, 2014 reportaram que os derivados 2-amino-3-ciano-tiofenico causam significativa acumulação de células apoptóticas de câncer cervical.

Avaliamos também se alterações nucleares se davam pela clivagem de caspase. Somente o derivado LPSF/AA-29 induziu o aumento da marcação para caspase 7. A linhagem MCF-7 possui o gene da caspase 3 truncando desta forma ela não expressa essa proteína (JÄNIKE, 2008). A apoptose é um mecanismo fundamental para manutenção da homeostase tecidual, no entanto no câncer esse mecanismo esta desregulado (HANAHAN et al 2011). Sawayama (2013) e colaboradores demonstraram os efeitos antiproliferativos na indução do PPAR γ em

células câncer de esôfago, tanto em vivo como em vitro, utilizando a Efatutazone, uma tiazolidina agonista deste receptor. Rêgo e colaboradores (2014) encontro um aumento da indução da apoptose em células de leucemia, linfoma, glioblastoma e hepatocarcinoma tratadas com derivados tiazolidinicos. Cock e colaboradores (1998) demonstraram que o mecanismo de indução da apoptose do etoposideo é via indução da clivagem de caspase 8 (COCK et al., 1998). O derivado SB-200 não induziu um aumento da clivagem da caspase 7 efetora e serão necessários mais experimento para elucidação do seu mecanismo de indução de morte celular.

O derivado tiofênico SB-200 teve o IC_{50} maior no modelo tridimensional apresentado uma concentração de quase 2 vezes do IC_{50} quando comparado o modelo bidimensional (14,86 μM) ao modelo tridimensional (24,92 μM). No entanto a doxorrubicina teve seu IC_{50} aumentados em quase 10 vezes quando comparado o IC_{50} obtido no modelo em monocamada (6,51 μM) em comparação com o modelo tridimensional (63,06 μM). Esses resultados corroboram com o Huyck e colaboradores em 2012 que utilizaram o método colorimétrico XTT em linhagens de mama assim ele encontraram que o 5-fluorouracil exibiu atividade citostática duas vezes mais elevada utilizando o modelo 3D versus do que em culturas em monocamada com as mesmas linhagens celulares testadas (HUYCK et al, 2012).

Leung e colaboradores em 2010 destacaram que as células de tumorais cultivadas em frascos de cultura de tecido padrões são expostas a um microambiente estrutural drasticamente alterado em comparação com *in vivo* e assim apresentar naturalmente alterações na função de células e da resposta ao tratamento. Corroborando como os resultados encontrados por Leung encontraram que as células que são mantidas em um ambiente tridimensional elas apresentam uma maior resistência ao quimioterápico doxorrubicina quando cultivada no modelo tridimensional em comparação ao modelo bidimensional (LEUNG et al., 2011).

O derivado LPSF/AA-29 teve seu IC_{50} diminuído quando comparamos os resultados do IC_{50} bidimensional (40,761 μM) e tridimensional (35,290 μM). Corroborando com os resultados encontrados por Chiung-Chi e colaboradores em (2012) o ácido ferúlico na linhagem de câncer de bexiga (T24) observou que no modelo tridimensional citotoxicidade e indução de proteína pró-apoptóticas como Bax e caspases 3 e 9 clivadas do que no modelo bidimensional (PENG et al., 2013).

O derivado LPSF/AA-29 também inibiu a atividade da enzima topoisomerase II. Oppegard e colabodores (2009) demonstraram que os derivados de 9-aminoacridinas inibiram a proliferação das células tumorais pancreáticas além de inibir a atividade catalítica da enzima topoisomerase II (OPPEGARD et al., 2009). As acridinas e seus derivados apresentam

atividade antitumoral decorrentes da sua estrutura química capaz de intercalar na dupla fita de DNA além de inibir as enzimas topoisomerases e telomerasas, desencadeando morte celular ou parada do ciclo celular (DENNY, 2002;KETRON et al., 2012). González-Sánchez e colaboradores (2011) demonstraram que o derivado tiazolidinodiona D3CPL se intercala com o DNA e inibe a enzima topoisomerase II em células de leucemia (K-562). Como também Janočková et al (2015) demonstraram que novos derivados acridínicos inibiram as enzimas topoisomerase I e II frente a linhagem de leucemia humana (HL-60).

9. CONCLUSÃO

- Os derivados tiofênicos SB-44 e Sb-83 não apresentaram citotoxicidade na linhagem de fibroblasto humano, já o derivado SB-200 apresentou citotoxicidade IC_{50} de 52,13 μM .
- O derivado tiazacridínicos LPSF/AA-29 não foram citotóxicos frente a células normais de PBMCs de doadores saudáveis.

Todos os derivados tiofênicos exibiram significativamente atividade antitumoral frente a linhagem de câncer de mama MCF-7 no entanto o derivado SB-200 exibiu menor IC_{50} .

- Os derivados SB-200 e LPSF/AA-29 apresentou considerável citotoxicidade frente a linhagens tumorais de câncer de mama MCF-7 tanto no modelo bidimensional quanto no modelo tridimensional. Em uma análise comparativa foi observado que as células de câncer de mama no modelo 3D se mostraram menos responsivas ao derivado SB-200. No entanto o derivado mostrou melhor citotoxicidade (IC_{50} de 24,92 μM) no modelo tridimensional comparado ao fármaco de referencia doxorrubicina (IC_{50} de 64,06 μM).
- O derivado tiazacridínico LPSF/AA-29 também apresentou melhor citotoxicidade no modelo tridimensional (IC_{50} de 35,29 μM) do que no modelo bidimensional (IC_{50} de 40,76 μM).
- Todos os derivados tiofênicos SB-44, 83 e 200 e o derivado tiazacridínico LPSF/AA-29 induziram o arrasto no ciclo celular na fase G0/G1 da linhagem de mama MCF-7, indicando que estes compostos possuem atividade citostática.
- Os derivados SB-83 e LPSF/AA-29 inibiram significativamente a migração celular da linhagem MCF-7.
- Os derivados SB-200 e LPFS/AA-29 induziram alterações nucleares características de apoptose e também induziram significativamente a clivagem de caspase 7 nas células de câncer de mama MCF-7.
- O derivado LPSF/AA-29 inibiu a atividade da enzima topoisomerase II.

6. PERSPECTIVAS

- Finalizar os experimentos com o derivado LPSF/AA-29 e submeter o artigo 2 a uma revista científica.
- Elucidar o mecanismo de indução de morte dos derivados tiofênicos em cultura 2D e 3D.
- Avaliar a atividade dos derivados tiofênicos e do derivado tiazacridínico LPSF/AA-29 *in vivo*.

10. REFERÊNCIA

- ABEL, E. L.; DIGIOVANNI, J. Multistage carcinogenesis. **Current Cancer Research**, v. 6, n. February, p. 27–51, 2011.
- ABU, N. et al. Flavokawain a induces apoptosis in MCF-7 and MDA-MB231 and inhibits the metastatic process in vitro. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. 1–12, 2014.
- ADJEI, I.; BLANKA, S. Modulation of the Tumor Microenvironment for Cancer Treatment: A Biomaterials Approach. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 6, n. 1, p. 81–103, 2015.
- AJDAČIĆ, V. et al. Synthesis and evaluation of thiophene-based guanylhydrazones (iminoguanidines) efficient against panel of voriconazole-resistant fungal isolates. **BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY**, 2016.
- ALAHARI, S. V; DONG, S.; ALAHARI, S. K. Are Macrophages in Tumors Good Targets for Novel Therapeutic Approaches? **Molecules and Cells**, v. 38, n. 2, p. 95–104, 2015.
- ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.
- AMARAL, J. B. DO; MACHADO-SANTELLI, G. M. A cultura de células em 3 dimensões e a sua aplicação em estudos relacionados a formação do lúmen. **Naturalia**, v. 34, p. 1–20, 2011.
- ATSUMI, T. et al. Inflammation Amplifier, a New Paradigm in Cancer Biology. **Cancer Research**, v. 74, n. 1, p. 8–14, 2014.
- BARBONE, ET AL. Mammalian target of rapamycin contributes to the acquired apoptotic resistance of human mesothelioma multicellular spheroids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 19, p. 13021–13030, 2008.
- BARROS, F. W. A. et al. Synthesis and cytotoxic activity of new acridine-thiazolidine derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 11, p. 3533–3539, 2012.
- BELIZÁRIO, J. E. O Próximo Desafio: Reverter o Câncer. **Ciência hoje**, v. 31, n. 184, p. 51–57, 2002.
- BERDASCO, M.; ESTELLER, M. Aberrant Epigenetic Landscape in Cancer: How Cellular Identity Goes Awry. **Developmental Cell**, v. 19, n. 5, p. 698–711, 2010.
- BOESEN-DE COCK, J. G. et al. The anti-cancer drug etoposide can induce caspase-8 processing and apoptosis in the absence of CD95 receptor-ligand interaction. **Apoptosis : an international journal on programmed cell death**, v. 3, n. 1, p. 17–25, 1998.
- BOING, A. F.; VARGAS, S. A. L.; BOING, A. C. A carga das neoplasias no Brasil: mortalidade e morbidade hospitalar entre 2002-2004. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 53, p. 317–322, 2007.
- BREGOLI, L. et al. Nanomedicine applied to translational oncology: A future perspective on cancer treatment. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 12, n. 1, p. 81–103, 2015.

- BRITO, C.; PORTELA, M. C.; DE VASCONCELLOS, M. T. L. Sobrevida de mulheres tratadas por câncer de mama no estado do Rio de Janeiro. **Revista de Saude Publica**, v. 43, n. 3, p. 481–489, 2009.
- CANEL, M. et al. E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. **Journal of cell science**, v. 126, n. Pt 2, p. 393–401, 2013.
- CHAMMAS, R.; ONUCHIC, A. C. Câncer e o microambiente tumoral Cancer and the tumor microenvironment. **Revista Médica**, v. 89, n. 1, p. 21–31, 2010.
- CHANDNA, N. et al. Design, Synthesis and Antimicrobial Evaluation of Novel 1,3-Oxazolodin-2- one Derivatives. **Curr Top Med Chem**, v. 13, n. 16, p. 2062–2075, 2013.
- CONSTANT ANATOLE, P. et al. Ethyl acetate fraction of *Garcinia epunctata* induces apoptosis in human promyelocytic cells (HL-60) through the ROS generation and G0/G1 cell cycle arrest: A bioassay-guided approach. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 36, n. 3, p. 865–874, 2013.
- CORREA DE SAMPAIO, P. et al. A Heterogeneous In Vitro Three Dimensional Model of Tumour-Stroma Interactions Regulating Sprouting Angiogenesis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e30753, 2012.
- CUI, Z. et al. Design, synthesis and evaluation of acridine derivatives as multi-target Src and MEK kinase inhibitors for anti-tumor treatment. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 2, p. 261–269, 2016.
- D., C.; CUNNINGHAM, D. Mature results from three large controlled studies with raltitrexed ('Tomudex'). **British Journal of Cancer**, v. 77, n. SUPPL. 2, p. 15–21, 1998.
- D.M., F. A. F.; ADRIANO. Agentes alquilantes: hematológicas reações adversas e complicações. **AC & T Científica**, n. 44, p. 1–12, 2009.
- DA ROCHA PITTA, M. G. et al. Synthesis and in vitro anticancer activity of novel thiazacridine derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, n. 5, p. 2421–2429, 2013.
- DE BESSA GARCIA, S. A.; PEREIRA, M. C.; NAGAI, M. A. Expression Pattern of the Pro-apoptotic Gene PAR-4 During the Morphogenesis of MCF-10A Human Mammary Epithelial Cells. **Cancer Microenvironment**, v. 4, n. 1, p. 33–38, 2011.
- DENARDO, D. G.; ANDREU, P.; COUSSENS, L. M. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro-versus anti-tumor immunity. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 29, n. 2, p. 309–316, 2010.
- DENNY, W. A. Acridine derivatives as chemotherapeutic agents. **Current medicinal chemistry**, v. 9, n. 18, p. 1655–1665, 2002.
- DESMOULIN ET L. The human proton-coupled folate transporter: Biology and therapeutic applications to cancer. **Cancer Biology and Therapy**, v. 13, n. March 2015, p. 1355–1373, 2012.
- DORIS KAUFMANN, MICHAELA POJAROVA, SUSANNE VOGEL, RENATE LIEBL, R. G.; DIETMAR GROSS, TSUYUKI NISHINO, T. P. AND E. VON A. Antimitotic activities of 2-phenylindole-3-carbaldehydes in human breast cancer cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 1, p. 5122–5136, 2007.

DU, H. et al. Cross-talk between endothelial and tumor cells via basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor signaling promotes lung cancer growth and angiogenesis. **Oncology Letters**, p. 1089–1094, 2015.

ECHEVERRI R, N. P.; MOCKUS S, I. Nuclear factor kB (NF-KB): signalosoma and its importance in cancer and inflammatory diseases. **Revista de la Facultad de Medicina**, v. 56, n. 2, p. 133–146, 2008.

EDMONDSON, R. et al. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. **Assay and drug development technologies**, v. 12, n. 4, p. 207–18, 2014.

ELROD, H. A.; SUN, S.-Y. PPAR γ and Apoptosis in Cancer. **PPAR Research**, v. 2008, p. 1–12, 2008.

FAJAS, L. et al. PPAR γ controls cell proliferation and apoptosis in an RB-dependent manner. **Oncogene**, v. 22, n. 27, p. 4186–4193, 2003.

GANGULY, S. S.; LI, X.; MIRANTI, C. K. The Host Microenvironment Influences Prostate Cancer Invasion, Systemic Spread, Bone Colonization, and Osteoblastic Metastasis. **Frontiers in Oncology**, v. 4, n. December, p. 1–16, 2014.

GHORAB, M. M.; BASHANDY, M. S.; ALSAID, M. S. Novel thiophene derivatives with sulfonamide, isoxazole, benzothiazole, quinoline and anthracene moieties as potential anticancer agents. **Acta Pharmaceutica**, v. 64, n. 4, p. 419–431, 2014.

GIRARD, Y. K. et al. A 3D Fibrous Scaffold Inducing Tumoroids: A Platform for Anticancer Drug Development. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e75345, 2013.

GOITRE, L. et al. Molecular Crosstalk between Integrins and Cadherins: Do Reactive Oxygen Species Set the Talk? **Journal of Signal Transduction**, v. 2012, p. 1–12, 2012.

GOMES, L. R.; VESSONI, A T.; MENCK, C. F. M. Three-dimensional microenvironment confers enhanced sensitivity to doxorubicin by reducing p53-dependent induction of autophagy. **Oncogene**, v. 1, n. May 2014, p. 1–12, 2015.

GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, I. et al. Antineoplastic activity of the thiazolo[5,4-b]quinoline derivative D3CLP in K-562 cells is mediated through effector caspases activation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 6, p. 2102–2108, 2011.

HADDEN, J. W. Immunodeficiency and cancer: Prospects for correction. **International Immunopharmacology**, v. 3, n. 8, p. 1061–1071, 2003.

HAFIDH, R. R. et al. Novel molecular, cytotoxic, and immunological study on promising and selective anticancer activity of mung bean sprouts. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 12, p. 208, 2012.

HAI ZHU^{1,2}, XIAOJING PAN⁴, HAIYAN QI², XUECHUN WANG³, SICHUAN HOU², BAOJIAN HAN⁵, Z. L. AND L. X. Troglitazone attenuates epidermal growth factor receptor signaling independently of peroxisome proliferator- activated receptor in PC-3 cells. **Oncology reports**, v. 25, p. 81–90, 2010.

HAN, S. W. Anticancer actions of PPAR γ ligands: Current state and future perspectives in human lung cancer. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 1, n. 3, p. 31, 2010.

HANAHAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**, v. 86, n. 3, p. 353–364, 1996.

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

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

HICKMAN, J. A. et al. Three-dimensional models of cancer for pharmacology and cancer cell biology: Capturing tumor complexity in vitro/ex vivo. **Biotechnology Journal**, v. 9, n. 9, p. 1115–1128, 2014.

HIRSCHHAEUSER, F. et al. Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again. **Journal of Biotechnology**, v. 148, n. 1, p. 3–15, 2010.

HUYCK, L.; AMPE, C.; VAN TROYS, M. The XTT Cell Proliferation Assay Applied to Cell Layers Embedded in Three-Dimensional Matrix. **ASSAY and Drug Development Technologies**, v. 10, n. 4, p. 382–392, 2012.

ILIOPOULOS, D.; HIRSCH, H. A; STRUHL, K. An epigenetic switch involving NF- κ B, Lin28, let-7 microRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation Dimitrios. **Biological Chemistry**, v. 139, n. 4, p. 693–706, 2010.

JAGANATHAN, H. et al. Three-Dimensional In Vitro Co-Culture Model of Breast Tumor using Magnetic Levitation. **Scientific Reports**, v. 4, p. 6468, 2014.

JÄNIKE, R. U. MCF-7 breast carcinoma cells do not express caspase-3. **J Cell Sci**, v. 117, n. Pt 2, p. 219–221, 2008.

JANOČKOVÁ, J. et al. Inhibition of DNA topoisomerases i and II and growth inhibition of HL-60 cells by novel acridine-based compounds. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 76, n. May, p. 192–202, 2015.

JIANG, M. et al. Genotypic and phenotypic analyses of hepatitis C virus variants observed in clinical studies of VX-222, a nonnucleoside NS5B polymerase inhibitor. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 9, p. 5456–5465, 2014.

JUN'ICHI KOBAYASHI, JIE-FEI CHENG, MASAMI ISHIBASHI, HIDESHI NAKAMURA, Y. O. M.-K. PRIANOSIN A, A NOVEL ANTILEUKEMIC ALKALOID FROM THE OKINAWAN MARINE SPONGE Prianos melanos. **Tetrahedron Letters**, v. 28, n. 42, p. 4939–4942, 1987.

KARTHIK, S. et al. Romidepsin induces cell cycle arrest, apoptosis, histone hyperacetylation and reduces matrix metalloproteinases 2 and 9 expression in bortezomib sensitized non-small cell lung cancer cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 68, n. 3, p. 327–334, 2014.

KASSOUF, W. S. C. et al. Inhibition of Bladder Tumor Growth by 1,1-Bis(3'-Indolyl)-1-(p-Substitutedphenyl)Methanes: A New Class of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Agonists. **Cancer Research**, v. 66, n. 1, p. 412–418, 2006.

KENNY, P. A et al. The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. **Molecular oncology**, v. 1, n. 1, p. 84–96, 2007.

- KESHAMOUNI, V. G.; HAN, S.; ROMAN, J. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Lung Cancer. **PPAR Research**, v. 2007, p. 1–10, 2007.
- KETRON, A. C. et al. Amsacrine as a topoisomerase II poison: Importance of drug-DNA interactions. **Biochemistry**, v. 51, n. 8, p. 1730–1739, 2012.
- KHAWAR, I. A.; KIM, J. H.; KUH, H.-J. Improving drug delivery to solid tumors: Priming the tumor microenvironment. **Journal of Controlled Release**, v. 201, p. 78–89, 2015.
- KIM, E.-K. et al. Induction of G1 arrest and apoptosis by *Scutellaria barbata* in the human promyelocytic leukemia HL-60 cell line. **International journal of molecular medicine**, v. 20, n. 1, p. 123–8, 2007.
- KUMAR, D. R. N. et al. ACCELERATION OF PRO-CASPASE-3 MATURATION AND CELL MIGRATION INHIBITION IN HUMAN BREAST CANCER CELLS BY PHYTOCONSTITUENTS OF RHEUM EMODI RHIZOME EXTRACTS. **EXCLI Journal**, v. 12, p. 462–478, 2013.
- KUNZ-SCHUGHART, L. A. The Use of 3-D Cultures for High-Throughput Screening: The Multicellular Spheroid Model. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 9, n. 4, p. 273–285, 2004.
- LEITANS, J. et al. 5-Substituted-(1,2,3-triazol-4-yl)thiophene-2-sulfonamides strongly inhibit human carbonic anhydrases I, II, IX and XII: Solution and X-ray crystallographic studies. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 17, p. 5130–5138, 2013.
- LEUNG, M. et al. Chitosan-Alginate Scaffold Culture System for Hepatocellular Carcinoma Increases Malignancy and Drug Resistance. **Pharm Res**., v. 27, n. 9, p. 1939–1948, 2011.
- LIN, C.-J. et al. Inhibition of Mitochondria- and Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Autophagy Augments Temozolomide-Induced Apoptosis in Glioma Cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. e38706, 2012.
- LIU, H.; RADISKY, D. C.; BISSELL, M. J. Proliferation and polarity in breast cancer: untying the Gordian knot. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 4, n. 5, p. 646–9, 2005.
- LIU, J. et al. Apoptosis of HL-60 cells induced by extracts from *Narcissus tazetta* var. *chinensis*. **Cancer Letters**, v. 242, n. 1, p. 133–140, 2006.
- LIU, T.; LIN, B.; QIN, J. Carcinoma-associated fibroblasts promoted tumor spheroid invasion on a microfluidic 3D co-culture device. **Lab on a Chip**, v. 10, n. 13, p. 1671, 2010.
- LOVITT, C. J.; SHELPER, T. B.; AVERY, V. M. Evaluation of chemotherapeutics in a three-dimensional breast cancer model. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, 2015.
- MA, X.; WANG, Z. Anticancer drug discovery in the future: an evolutionary perspective. **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 23-24, p. 1136–1142, 2009.
- MABKHOT, Y. N. Antimicrobial Activity of Some Novel Armed Thiophene Derivatives and Petra/Osiris/Molinspiration (POM) Analyses. **Molecules**, v. 21, p. 1–16, 2016.
- MANSURE, J. J. et al. A Novel Mechanism of PPAR Gamma Induction via EGFR Signalling Constitutes Rational for Combination Therapy in Bladder Cancer. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p.

e55997, 2013.

MANTOVANI, A.; SICA, A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, n. 2, p. 231–237, 2010.

MAZZOLENI, G.; DI LORENZO, D.; STEIMBERG, N. Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research? **Genes & Nutrition**, v. 4, n. 1, p. 13–22, 2009.

MBAVENG, A. T. et al. Antibacterial activity of nineteen selected natural products against multi - drug resistant Gram - negative phenotypes. **SpringerPlus**, 2015.

MIYATA, Y.; NAKAMOTO, H.; NECKERS, L. The therapeutic target Hsp90 and cancer hallmarks. **Current pharmaceutical design**, v. 19, p. 347–365, 2013.

MOHAREB, R. M. ABDO, N. Y. M. Synthesis and Cytotoxic Evaluation of Pyran , Dihydropyridine and Thiophene Derivatives of 3-Acetylcoumarin. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 63, n. 9, p. 678–687, 2015.

MOHAREB, R. M.; MEGALLYABDO, N. Y. Uses of 3-(2-Bromoacetyl)-2H-chromen-2-one in the synthesis of heterocyclic compounds incorporating coumarin: Synthesis, characterization and cytotoxicity. **Molecules**, v. 20, n. 6, p. 11535–11553, 2015.

MORIN, P. J. Drug resistance and the microenvironment: Nature and nurture. **Drug Resistance Updates**, v. 6, n. 4, p. 169–172, 2003.

MOUGEL, L. et al. Three-dimensional culture and multidrug resistance: effects on immune reactivity of MCF-7 cells by monocytes. **Anticancer research**, v. 24, n. 2B, p. 935–41, 2004.

MOURA, W. C. DA S. DESENVOLVIMENTO ATRAVÉS DA SÍNTESE, ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE DERIVADOS 2-AMINOTIOFÊNICOS-SUBSTITUÍDOS COMO POTENCIAIS FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS \n. **BiOFARM**, v. 10, n. 04, p. 01–09, 2014.

MUDUDUDDLA, R. et al. 3-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-ylamino)-N-(4-fluorophenyl)thiophene-2-carboxamide overcomes cancer chemoresistance via inhibition of angiogenesis and P-glycoprotein efflux pump activity. **Org. Biomol. Chem.**, v. 13, n. 14, p. 4296–4309, 2015.

MURANEN, T. et al. Inhibition of PI3K/mTOR Leads to Adaptive Resistance in Matrix-Attached Cancer Cells. **Cancer Cell**, v. 21, n. 2, p. 227–239, 2012.

NAHED ET AL. The Knoevenagel reaction of cyanoacetylhydrazine with pregnenolone: Synthesis of thiophene, thieno[2,3-d]pyrimidine, 1,2,4-triazole, pyran and pyridine derivatives with anti-inflammatory and anti-ulcer activities. **Steroids**, n. 2016, 2016.

NARANG, A. S.; DESAI, D. S. **Anticancer Drug Development Unique Aspects of Pharmaceutical Development**. [s.l: s.n.].

NELSON, C. M.; BISSELL, M. J. Transformation. **Cancer Research**, v. 15, n. 5, p. 342–352, 2010.

NIRMALANANDHAN, V. S. et al. Activity of anticancer agents in a three-dimensional cell culture model. **Assay and drug development technologies**, v. 8, n. 5, p. 581–590, 2010.

NYGA, A.; CHEEMA, U.; LOIZIDOU, M. 3D tumour models: novel in vitro approaches to

- cancer studies. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v. 5, n. 3, p. 239–248, 2011.
- OLIVEIRA ET AL. Synthesis of thiophene-thiosemicarbazone derivatives and evaluation of their in vitro and in vivo antitumor activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 104, p. 148–156, 2015.
- OPPEGARD, L. M. et al. Novel acridine-based compounds that exhibit an anti-pancreatic cancer activity are catalytic inhibitors of human topoisomerase II. **European Journal of Pharmacology**, v. 602, n. 2-3, p. 223–229, 2009.
- PAPAGIANNAROS, A. et al. A liposomal formulation of doxorubicin, composed of hexadecylphosphocholine (HePC): Physicochemical characterization and cytotoxic activity against human cancer cell lines. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 60, n. 1, p. 36–42, 2006.
- PATIL, S. A.; PATIL, R.; MILLER, D. D. Indole molecules as inhibitors of tubulin polymerization: potential new anticancer agents. **Future Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 16, p. 2085–115, 2012.
- PENG, C.-C. et al. Cytotoxicity of ferulic Acid on T24 cell line differentiated by different microenvironments. **BioMed research international**, v. 2013, p. 579859, 2013.
- PERINI, S.; SILLA, L.; ANDRADE, F. M. A telomerase em células-tronco hematopóéticas. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 30, n. 1, p. 47–53, 2008.
- PORTA, C. et al. Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. **Immunobiology**, v. 214, n. 9-10, p. 761–777, 2009.
- QIAN, B.-Z.; POLLARD, J. W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 39–51, 2010.
- RÊGO, M. J. B. D. M. et al. Synthesis, in vitro anticancer activity and in silico study of new disubstituted thiazolidinedione derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, v. 23, n. 6, p. 3220–3226, 2014.
- REVELANT, G. et al. Synthesis and biological evaluation of novel 2-heteroarylimino-1,3-thiazolidin-4-ones as potential anti-tumor agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 94, p. 102–112, 2015.
- RODRIGUES ET AL. 2-Amino-thiophene derivatives present antileishmanial activity mediated by apoptosis and immunomodulation in vitro. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 106, p. 1–14, 2015.
- ROMAGNOLI, R. et al. Concise Synthesis and Biological Evaluation of 2 - Aroyl-5-Amino Benzo[b]thiophene Derivatives As a Novel Class of Potent Antimitotic Agents. **J. Med. Chem.**, v. 56, p. 9296, 2013a.
- ROMAGNOLI, R. et al. Synthesis and Biological Evaluation of 2 - (Alkoxy carbonyl)-3-Anilinobenzo[b]thiophenes and Thieno[2,3 - b]pyridines as New Potent Anticancer Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 4, 2013b.
- ROMAGNOLI, R. et al. Design, synthesis and biological evaluation of 3,5-disubstituted 2-amino thiophene derivatives as a novel class of antitumor agents. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 22, n. 18, p. 5097–109, 2014.

- ROSAS, M. S. L. . et al. Incidence of Cancer in Brazil and the Potential Use of Isatin Derivatives in Experimental Oncology. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 2, 2013.
- ROZARIO, T.; DESIMONE, D. W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: A dynamic view. **Developmental Biology**, v. 341, n. 1, p. 126–140, 2010.
- SAID, M.; ELSHIHAWY, H. Synthesis , anticancer activity and structure-activity relationship of some anticancer agents based on Cyclopenta (b) thiophene scaffold. **J. Pharm. Sci.**, v. 27, n. 1, p. 885–892, 2007.
- SAWAYAMA, H. et al. Small Molecule Agonists of PPAR- Exert Therapeutic Effects in Esophageal Cancer. **Cancer Research**, v. 74, n. 2, p. 575–585, 2014.
- SMITH, T. Influence of resistance to 5-fluorouracil and tomudex on [18F]-FDG incorporation, glucose transport and hexokinase activity. **International Journal of Oncology**, p. 378–382, 2012.
- SODUNKE, T. R. et al. Micropatterns of Matrigel for three-dimensional epithelial cultures. **Biomaterials**, v. 28, n. 27, p. 4006–4016, 2007.
- SOUZA ET AL. Preliminary antifungal and cytotoxic evaluation of synthetic cycloalkyl[b]thiophene derivatives with PLS-DA analysis. **Acta pharmaceutica (Zagreb, Croatia)**, v. 62, n. 2, p. 221–36, 2012.
- STREHL, C. et al. Hypoxia: how does the monocyte-macrophage system respond to changes in oxygen availability? **Journal of Leukocyte Biology**, v. 95, n. 2, p. 233–241, 2014.
- SU, Z. et al. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. **Molecular Cancer**, v. 14, n. 1, p. 48, 2015.
- SUNG, K. E. et al. Understanding the Impact of 2D and 3D Fibroblast Cultures on In Vitro Breast Cancer Models. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–13, 2013.
- TAKAHASHI, H. T. et al. Thiophene derivatives with antileishmanial activity isolated from aerial parts of *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. **Molecules**, v. 16, n. 5, p. 3469–3478, 2011.
- TARASEWICZ, E. et al. CDK4 inhibition and doxorubicin mediate breast cancer cell apoptosis through Smad3 and survivin. **Cancer Biology and Therapy**, v. 15, n. 10, p. 1301–1311, 2014.
- TONON, T. C. A.; SCHOFFEN, J. P. F. Câncer de Próstata: Uma Revisão da Literatura. **Saúde e Pesquisa**, v. 2, n. 3, p. 403–410, 2009.
- TOR, Y. S. et al. Induction of apoptosis in MCF-7 cells via oxidative stress generation, mitochondria-dependent and caspase-independent pathway by ethyl acetate extract of *Dillenia suffruticosa* and its chemical profile. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–25, 2015.
- TOWLE, M. J. et al. Inhibition of urokinase by 4-substituted benzo[b]thiophene-2-carboxamides: An important new class of selective synthetic urokinase inhibitor. **Cancer Research**, v. 53, n. 11, p. 2553–2559, 1993.
- TUNG, J. C. et al. Tumor mechanics and metabolic dysfunction. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 79, p. 269–280, 2015.
- VALSTER, A. et al. Cell migration and invasion assays. **Methods**, v. 37, n. 2, p. 208–215,

2005.

VAN CUTSEM, E. Raltitrexed: current clinical status and future directions. **Annals of Oncology**, v. 13, n. 4, p. 513–522, 2002.

VAN ZIJL, F.; KRUPITZA, G.; MIKULITS, W. Initial steps of metastasis: Cell invasion and endothelial transmigration. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 728, n. 1-2, p. 23–34, 2011.

WEIGELT, B. et al. HER2 signaling pathway activation and response of breast cancer cells to HER2-targeting agents is dependent strongly on the 3D microenvironment. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 122, n. 1, p. 35–43, 2010a.

WEIGELT, B. et al. HER2 signaling pathway activation and response of breast cancer cells to HER2-targeting agents is dependent strongly on the 3D microenvironment. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 122, n. 1, p. 35–43, 2010b.

WHO, 2013. Globocan, 2013. **International Agency for Research on Cancer, World Health Organization**, n. December, p. 2012–2014, 2013.

XU, W.-S. et al. Effects of Furanodiene on 95-D Lung Cancer Cells: Apoptosis, Autophagy and G1 Phase Cell Cycle Arrest. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 42, n. 01, p. 243–255, 2014.

ZHENG, J. Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review). **Oncology Letters**, p. 1151–1157, 2012.

