

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCÊNCIAS

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

JÚLIA FURTADO CAMPOS

**SÍNTESE E ATIVIDADE ANTICÂNCER DE NOVOS
DERIVADOS 2-TIOXO-OXAZOLIDÍNICOS**

Recife

2013

JÚLIA FURTADO CAMPOS

**SÍNTESE E ATIVIDADE ANTICÂNCER DE NOVOS
DERIVADOS 2-TIOXO-OXAZOLIDÍNICOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do Título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Orientadora: Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta

Co-orientador: Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Recife

2013

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

Campos, Julia Furtado

Síntese e atividade anticâncer de novos derivados 2-tioxo-oxazolidínicos / Júlia Furtado Campos. – Recife: O Autor, 2013.

128 f.: il.

Orientadores: Maira Galdino da Rocha Pitta

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, 2013.

Inclui referências e anexos

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

616.994

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-216

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

Recife, 29 de Agosto de 2013.

Tese de Doutorado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 29 de Agosto de 2013, cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E PRIMEIRO EXAMINADOR INTERNO: Prof^ª. Dr^ª. Maira Galdino da Rocha Pitta (Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

SEGUNDO EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade (Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

TERCEIRO EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão (Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

PRIMEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Prof^ª. Dr^ª. Marina Galdino da Rocha Pitta (Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

SEGUNDO EXAMINADOR EXTERNO: Prof^ª. Dr^ª. Michelly Cristiny Pereira (Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

Dedico este trabalho à Profa. Suelly Lins Galdino.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Maira Galdino da Rocha Pitta, pela confiança ao me receber em seu laboratório, pelos ensinamentos e pelo exemplo de esforço e dedicação à pesquisa.

Ao Prof. Moacyr Rêgo, pela orientação e conhecimentos compartilhados, mas principalmente pelo carinho e amizade.

À Profa. Maria do Carmo Alves de Lima, pelo convívio sempre cheio de alegria, pelo exemplo de amor e dedicação aos seus alunos.

À Michelly Pereira, pela amizade instantânea. Finalmente nos encontramos.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas, pela enorme disponibilidade de todos e pelo convívio sempre tão divertido. Agradeço especialmente aos que estiveram mais próximos - Flaviana Alves, Renata Miranda, Antonio Félix, Karla Marques, Michael Quirino, Mardonny Chagas, Thiago Lins e Kamila Melo - imprescindíveis para tornar possível a realização deste trabalho.

Aos alunos do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, especialmente Jamerson Oliveira e Cezar Amorim, que prontamente se dispuseram a me ajudar.

A Raphael Nascimento, pelo auxílio prestado no momento de conclusão deste trabalho.

À Nataly Amorim, pela amizade e pela convivência agradável e divertida de todos esses anos.

Aos meus pais, irmão e familiares, pelo carinho e apoio. Também por compreenderem de minha ausência.

A Tomaz, pela relação de parceria e companheirismo.

À Anamaria Lima e Isis Cavalcanti, por me acompanharem neste processo, sempre me ajudando a manter o equilíbrio físico e emocional.

A Aldemir e Gisélia, por ajudarem a tornar este percurso menos árduo.

A Paulo Germano, secretário do PPGIT, pela imensa prestatividade.

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), pela disponibilização da infraestrutura.

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

RESUMO

CAMPOS, J.F. SÍNTESE E ATIVIDADE ANTICÂNCER DE NOVOS DERIVADOS 2-TIOXO-OXAZOLIDÍNICOS. 2013. 128f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

Anéis oxazolidínicos têm sido utilizados na formulação de compostos com atividade antibacteriana, antifúngica, hipoglicêmica, anticonvulsivante e anti-câncer. Esta tese teve como objetivo a síntese e avaliação da atividade antitumoral de cinco novos derivados 2-tioxo-oxazolidínicos. Os compostos foram sintetizados no Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF) do Núcleo de Pesquisa para Inovação Terapêutica Suely Galdino (NUPIT-SG), da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). A caracterização estrutural das novas moléculas foi confirmada utilizando-se infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de próton (RMN ^1H) e de carbono 13 (RMN ^{13}C), além da espectrometria de massa. A seletividade dos compostos foi avaliada em células mononucleares de sangue periférico (PBMC), e a citotoxicidade em sete linhagens tumorais: HL-60 (leucemia promielocítica aguda), HL-60/MX1 (leucemia promielocítica aguda, resistente a quimioterápicos), CCRF-CEM (leucemia linfoblástica aguda), NG97 (glioblastoma), T47D (câncer de mama), Raji (linfoma de Burkitt) e Jurkat (leucemia de células T). A expressão dos genes p21, BID, GADD153, RIP-3 e PPAR γ , associados à supressão do processo tumorigênico, foi quantificada por PCR em tempo real na linhagem HL-60. Dentre os compostos avaliados, o LPSF/NB-5 (5-(3,4-bis-benzilóxi-benzilideno)-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona) apresentou atividade mais pronunciada, inibindo o crescimento de todas as linhagens celulares testadas. O composto LPSF/NB-4 (3-etil-5-(4-pirrolidin-1-il-benzilideno)-2-tioxo-oxazolidin-4-ona) apresentou citotoxicidade mais elevada frente às células Jurkat (IC₅₀ 15,19 μM), e o composto LPSF/NB-3 (5-(4-cloro-benzilideno)-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona) mostrou melhor atividade anticâncer em células de leucemia aguda (HL-60, IC₅₀ 17,84 μM). Apenas o derivado contendo anel pirrolidina, LPSF/NB-4, induziu significativamente a apoptose nas células de leucemia aguda ($p=0,001$). Todos os compostos induziram aumento significativo na expressão do gene pró-apoptose BID ($p<0,05$). O derivado contendo cloro em sua estrutura, LPSF/NB-3, modulou significativamente a expressão dos genes RIPK3 ($p=0,02$) e DDIT3 ($p=0,014$); enquanto o LPSF/NB-2 (5-(4-bromo-benzilideno)-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona), contendo bromo, induziu um aumento na expressão dos genes CDKN1A/P21 ($p=0,03$) e PPAR γ ($p=0,0006$). Nossos resultados sugerem que o composto LPSF/NB-5 apresentou efeitos antitumorais em células de tumores sólidos e hematopoiéticos, enquanto outros derivados produziram maior atividade antitumoral em células de leucemias. Em células de leucemia aguda, os derivados 2-tioxo-oxazolidínicos modularam a expressão de genes envolvidos em apoptose, estresse de retículo endoplasmático, necroptose e inflamação.

Palavras-chave: Oxazolidinadionas, citotoxicidade, atividade anticâncer.

ABSTRACT

CAMPOS, J.F. SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF NEW POTENTIAL ANTICANCER AGENTS. 2013. 128f. Thesis (Doctor). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Oxazolidinedione rings are being used to formulate compounds that exhibit antibacterial, antifungal, antidiabetic, anticonvulsant and anticancer activity. This work aimed to investigate anticancer potential of five novel 2-thioxo-oxazolidin-4-one synthetic derivatives. First, we performed cytotoxicity assays in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) from healthy individuals and in six tumor cell lines. In order to understand the cell death induction mechanism, we performed a flow cytometry assay and we evaluated the expression of genes involved in different cell death process. We found that these oxazolidinedione derivatives were not cytotoxic ($IC_{50} > 75 \mu M$) in PBMC and the 5-(3,4-bis-benzyloxy-benzilidene)-3-ethyl-2-thioxo-oxazolidin-4-one (LPSF/NB-5) showed the best results in cancer cells, inhibiting the growth of all tumor cell lines tested. The LPSF/NB-4 exhibited the highest cytotoxicity to Jurkat cells (IC_{50} 15.19 μM) and the LPSF/NB-3 showed better anticancer effects in HL-60 acute leukemia cells (17.84 μM). Only the derivative containing pyrrolidine group, LPSF/NB-4, significantly induced apoptosis of acute leukemia cells ($p=0.001$). All oxazolidinedione compounds induced a significant increase in the expression of pro-apoptotic gene BID ($p<0.05$). The derivative containing chlorine in its structure (LPSF/NB-3) significantly modulated the expression of RIPK3 ($p=0.02$) and DDIT3 ($p=0.014$); while NB2 that has bromide atom, induced an increase of cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (CDKN1A/*P21*) gene ($p=0.03$) and in *PPAR γ* gene ($p=0.0006$). Our results suggested that the LPSF/NB5 showed antitumor effects in solid and hematopoietic cancer cells, while other derivatives produced higher activity against hematopoietic cells. In acute leukemia cells, oxazolidinedione derivatives modulated the expression of genes involved in apoptosis, ER stress, necroptosis and inflammation.

Key-words: Oxazolidinediones, cytotoxicity, anticancer activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo.	18
Figura 2. O papel dos genes e do ambiente no desenvolvimento do câncer.	19
Figura 3. Fases do ciclo celular e pontos de checagem	20
Figura 4. Organização dos domínios da família de proteínas RIP.	25
Figura 5. Esquema do complexo de sinalização TNF-R1.	26
Figura 6. Antimetabólitos.	27
Figura 7. Ação de quimioterápicos na célula em divisão.	28
Figura 8. Heterodímeros PPAR/RXR se ligam a PPREs localizados em promotores de genes alvo.	29
Figura 9. Oxazolidinadionas e seus bioisósteros.	31
Figura 10. Diagrama de síntese dos derivados 2-tioxo-oxazolidínicos.	35
Figura 11. Derivados 2-tioxo-oxazolidínicos sintetizados.	36
Figura 12. Amsacrina.	39
Figura 13. Viabilidade celular das linhagens tumorais frente aos compostos LPSF/NB.	48
Figura 14. Relação entre a estrutura química e a atividade antitumoral dos compostos LPSF/NB nas linhagens celulares HL-60 e Jurkat.	49
Figura 15. Viabilidade celular da linhagem resistente HL-60/MX1 frente aos compostos LPSF/NB.	50
Figura 16. Efeito dos LPSF/NB na expressão de RIP3 e GADD153 na linhagem tumoral HL-60.	50
Figura 17. Efeito dos LPSF/NB na expressão de BID na linhagem tumoral HL-60.	51
Figura 18. Efeito dos LPSF/NB na expressão de p21 na linhagem tumoral HL-60.	51

Figura 19. Efeito dos LPSF/NB na expressão de PPAR γ na linhagem tumoral HL-60.	52
Figura 20. Espectro RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400MHz) – LPSF/NB-2.	97
Figura 21. Espectro IV (KBr, cm^{-1}) – LPSF/NB-2.	98
Figura 22. Espectro MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ – LPSF/NB-2.	98
Figura 23. Espectro RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400MHz) – LPSF/NB-3.	99
Figura 24. Espectro IV (KBr, cm^{-1}) – LPSF/NB-3.	100
Figura 25. Espectro MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ – LPSF/NB-3.	100
Figura 26. Espectro RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400MHz) – LPSF/NB-4.	101
Figura 27. Espectro IV (KBr, cm^{-1}) – LPSF/NB-4.	102
Figura 28. Espectro MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ – LPSF/NB-4.	102
Figura 29. Espectro RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400MHz) – LPSF/NB-5.	103
Figura 30. Espectro IV (KBr, cm^{-1}) – LPSF/NB-5.	104
Figura 31. Espectro MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ – LPSF/NB-5.	104
Figura 32. Espectro RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400MHz) – LPSF/NB-6.	105
Figura 33. Espectro IV (KBr, cm^{-1}) – LPSF/NB-6.	106
Figura 34. Espectro MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ – LPSF/NB-6.	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Reagentes e solventes utilizados nas diferentes etapas sintéticas.	34
Tabela 2. Ésteres de Cope sintetizados.	34
Tabela 3. Derivados 5-benzilideno-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona (LPSF/NB).	35
Tabela 4. Linhagens celulares utilizadas neste trabalho.	37
Tabela 5. Valores de IC ₅₀ dos compostos NB em PBMC.	47
Tabela 6. Valores de IC ₅₀ (μM) dos compostos LPSF/NB.	49

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ATCC	Coleção de culturas, do inglês <i>American Type Culture Collection</i>
cDNA	DNA complementar
CDK	Quinase dependente de ciclina, do inglês <i>cyclin-dependent kinase</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
EM	Espectrometria de massa
GADD153	gene indutível por parada do crescimento e danos no DNA, do inglês <i>growth arrest- and DNA damage- inducible</i>
IC ₅₀	Concentração inibitória para 50% das células
IV	Infravermelho
LDI	Ionização e dessorção a laser, do inglês <i>Laser desorption ionization</i>
MDR	Resistência a múltiplas drogas, do inglês <i>Multidrug resistance</i>
MM	Massa molecular
MTT	Sal de tetrazólio, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tetrazólico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular, do inglês <i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PF	Ponto de fusão
PPAR	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma
PPER	Elementos responsivos aos proliferadores de peroxissoma
RE	Retículo endoplasmático
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio, do inglês <i>reactive oxygen species</i>
RPMI	Meio de cultura Rose Park Memorial Institute

RXR	Receptor retinóide X
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TNF α	Fator de necrose tumoral α
TRAIL	Ligante indutor de apoptose similar a TNF, do inglês <i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
μ	Micro
M	Molar
L	Litro
Jurkat	Linhagem celular derivada de Leucemia de Células T
RAJI	Linhagem celular derivada de Linfoma de Burkitt
CCRF-CEM	Linhagem celular derivada de Leucemia Linfoblástica Aguda
HL-60	Linhagem celular derivada de Leucemia Promielocítica Aguda
HL-60/MX1	Linhagem celular derivada de Leucemia Promielocítica Aguda (resistente a quimioterápicos)
NG-97	Linhagem celular derivada de Glioblastoma
T47D	Linhagem celular derivada de Câncer de Mama

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo Geral	17
2.2	Objetivos Específicos	17
3	REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1	Câncer: aspectos gerais e epidemiologia	18
3.2	Mecanismos de morte celular	22
3.3	Tratamentos e alvos terapêuticos	26
3.3.1	Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma	29
3.4	Novos agentes quimioterápicos - derivados oxazolidínicos	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1	Síntese e caracterização das moléculas com potencial atividade anticâncer	33
4.1.1	Reagentes e equipamentos utilizados	33
4.1.2	Síntese dos ésteres de Cope (LPSF-IP)	34
4.1.3	Síntese dos derivados 5-benzilideno-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona (LPSF/NB)	35
4.1.4	Caracterização estrutural das moléculas sintetizadas	36
4.2	Ensaio biológicos	37
4.2.1	Cultivo de linhagens celulares	37
4.2.2	Ensaio de seletividade	38
4.2.3	Determinação da citotoxicidade das novas moléculas – ensaio MTT	39
4.2.4	Cálculo da IC ₅₀	40
4.2.5	Extração de RNA total	40
4.2.6	Tratamento do RNA com <i>DNase I</i>	41
4.2.7	Síntese de cDNA	41

4.2.8	PCR em Tempo Real (qPCR)	42
4.3	Análise estatística	42
5	RESULTADOS	43
5.1	Dados físico-químicos e análises espectroscópicas	43
5.2	Ensaio de seletividade	47
5.3	Ensaio de citotoxicidade	47
5.4	Análise de expressão gênica por PCR em Tempo Real	50
6	DISCUSSÃO	53
7	CONCLUSÕES	57
8	PERSPECTIVAS	58
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
 APÊNDICES		
	APÊNDICE A - Depósito de Patente	75
	APÊNDICE B - Artigo Científico	92
	APÊNDICE C - Espectros RMN ¹ H, IV e MS	97

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um importante problema de saúde pública, sendo responsável por custos elevados ao sistema de saúde. É a principal causa de morte nos países desenvolvidos, e segunda causa de morte nos países em desenvolvimento, atrás das doenças cardiovasculares (Jemal et al., 2011). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou a ocorrência de cerca de 13,1 milhões de mortes por câncer no ano 2030 (OMS, 2013).

O tratamento do câncer pode ser feito através de cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal ou transplante de medula óssea. Em muitos casos, é necessário combinar mais de uma modalidade (INCA, 2011). Com o envelhecimento da população e o aumento do número de casos de neoplasias no Brasil e no mundo, torna-se imprescindível a busca por novas alternativas terapêuticas.

As oxazolidinas são elementos estruturais de uma variedade de produtos naturais e farmacêuticos. São comercializadas para tratamento de infecções bacterianas, mas há também relatos na literatura de derivados oxazolidínicos com atividade antifúngica (Devi et al., 2013), hipoglicêmica (Agrawal et al., 2005; Dow et al., 1991), anticonvulsivante (Kombian & Phillips, 2012) e anticâncer (Singh et al., 2011; Tadesse et al., 2011). O mecanismo da ação antitumoral dessas moléculas não está claro, porém sabe-se que as tiazolidinadionas, bioisósteros das oxazolidinadionas, são ligantes sintéticos de PPAR γ (receptores ativados por proliferadores de peroxissoma, do inglês *peroxisome proliferator-activated receptors*). Esses receptores nucleares funcionam como fatores de transcrição, regulando a expressão de genes alvo (Michalik, 2006).

Diversos estudos têm mostrado a expressão de PPAR γ em células tumorais, e a ativação deste receptor através de ligantes inibe a proliferação celular ou induz apoptose (Grommes et al., 2004; Theocharis et al., 2004). Ligantes de PPAR γ apresentam propriedades antitumorigênicas *in vitro*, e induzem parada do crescimento tumoral em murinos (Suh et al., 1999; Mehta et al., 2000; Pighetti et al., 2001). Com base no potencial terapêutico das tiazolidinadionas, nossa atenção foi direcionada para novos derivados oxazolidínicos substituídos, possivelmente com similar atividade anticâncer.

Esta tese teve como objetivo a síntese e avaliação da atividade antitumoral *in vitro* de novos derivados 2-tioxo-oxazolidínicos, assim como a investigação de mecanismos moleculares associados à atividade biológica desses compostos, através da mensuração dos níveis de expressão de genes que participam em vias de sinalização de morte celular. As moléculas utilizadas neste trabalho foram obtidas através de colaboração com o Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF). O LPSF e o Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), ambos associados ao Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (NUPIT-SG), da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), vêm unindo esforços na busca de novas alternativas terapêuticas para o câncer.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver alternativas de tratamento para o câncer, através da síntese e avaliação da atividade antitumoral *in vitro* de novos derivados 2-tioxo-oxazolidínicos.

2.2. Objetivos específicos

- Sintetizar cinco novos derivados 2-tioxo-oxazolidínicos: 5-(4-bromo-benzilideno)-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona (LPSF/NB-2), 5-(4-cloro-benzilideno)-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona (LPSF/NB-3), 5-(4-pirrolidin-1-il-benzilideno)-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona (LPSF/NB-4), 5-(3,4-bis-benzilóxi-benzilideno)-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona (LPSF/NB-5), 5-(4-piperidin-1-il-benzilideno)-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona (LPSF/NB-6);
- Determinar as características físico-químicas e elucidar a estrutura dos compostos sintetizados, através das técnicas espectroscópicas de infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de próton (RMN ^1H) e de carbono 13 (RMN ^{13}C), além da espectrometria de massa;
- Avaliar a seletividade *in vitro* dos novos compostos 2-tioxo-oxazolidínicos em células humanas saudáveis (células mononucleares de sangue periférico - PBMC, do inglês *peripheral blood mononuclear cells*).
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos novos compostos 2-tioxo-oxazolidínicos em sete linhagens tumorais: HL-60 (leucemia promielocítica aguda), HL-60/MX1 (leucemia promielocítica aguda, resistente a quimioterápicos), CCRF-CEM (leucemia linfoblástica aguda), NG97 (glioblastoma), T47D (câncer de mama), Raji (linfoma de Burkitt) e Jurkat (leucemia de células T).
- Quantificar a expressão gênica de p21, BID, GADD153, RIP3 e PPAR γ na linhagem tumoral HL-60 (leucemia promielocítica aguda), para avaliação de possíveis mecanismos moleculares relacionados ao tratamento com os compostos sintetizados.

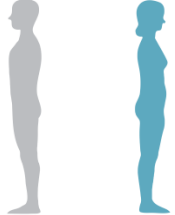
3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Câncer: aspectos gerais e epidemiologia

O câncer é um conjunto de doenças caracterizadas pela perda do controle do crescimento em uma ou mais células, as quais invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (INCA, 2011; Shewach & Kuchta, 2009). Ao descrever certos tipos de tumores, Hipócrates (460 a 370 a.C.) usou o termo "carcinos", que, em grego, significa "caranguejo", pois as projeções e vasos sanguíneos ao seu redor fazem lembrar as patas do crustáceo (Kumar et al., 2005).

O câncer é a principal causa de morte nos países desenvolvidos e segunda causa de morte nos países em desenvolvimento, atrás das doenças cardiovasculares (OMS, 2008; Jemal et al., 2011). No Brasil, as estimativas para o ano de 2012, válidas também para 2013, apontaram a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma. Dentre os tipos mais incidentes estão os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon e reto e estômago para o sexo masculino; e os cânceres de pele não melanoma, mama, colo do útero, cólon e reto e glândula tireoide para o sexo feminino (Figura 1; INCA, 2011).

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, exceto pele não melanoma (Fonte: INCA, 2011).

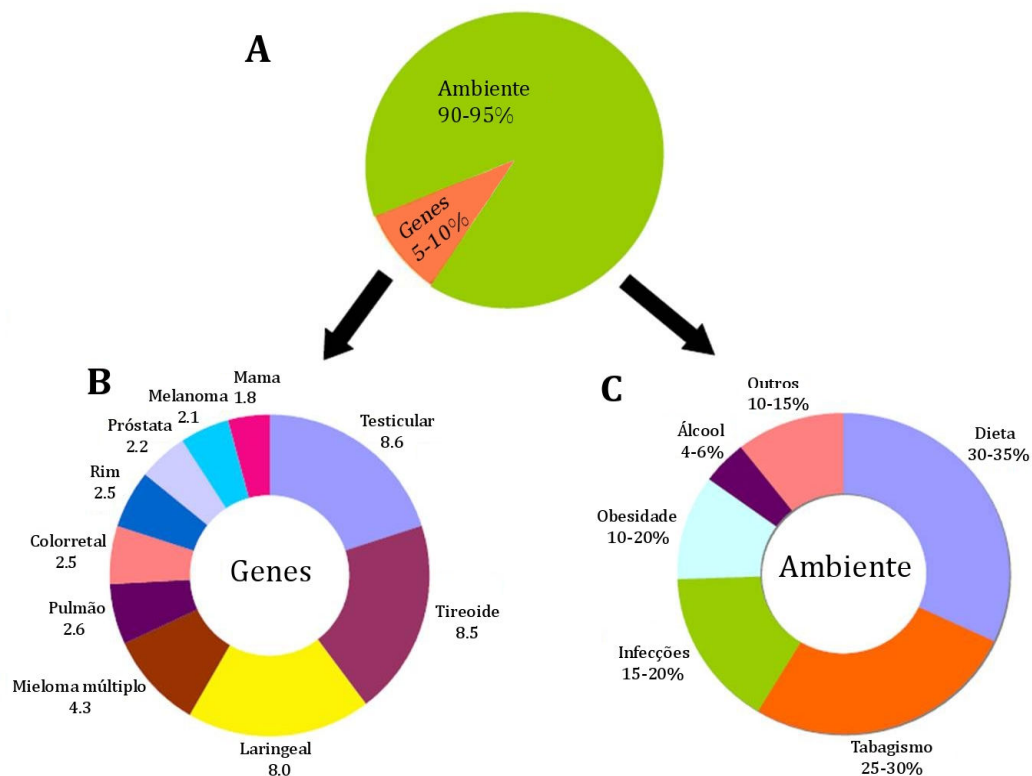
Localização primária	casos novos	percentual			Localização primária	casos novos	percentual
Próstata	60.180	30,8%			Mama Feminina	52.680	27,9%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%			Colo do Útero	17.540	9,3%
Cólon e Reto	14.180	7,3%			Cólon e Reto	15.960	8,4%
Estômago	12.670	6,5%			Glândula Tireoide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

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

O aumento na incidência dos casos de câncer vem sendo explicado pelo fenômeno conhecido como transição epidemiológica, que descreve mudanças na distribuição das populações em relação às alterações nos padrões de mortalidade, fertilidade, expectativa de vida e principais causas de morte (McKeown, 2009). No Brasil, esta transição epidemiológica ainda está em andamento, pois ao mesmo tempo em que se observa um aumento na ocorrência de doenças crônico-degenerativas, a frequência de doenças infecto-parasitárias permanece elevada (Waters, 2001; Guerra et al., 2005).

O câncer é causado por fatores intrínsecos (mutações herdadas, hormônios e sistema imunológico), e fatores ambientais ou adquiridos (dieta, tabagismo, radiação, agentes infecciosos, entre outros). Existem muitos tipos de câncer com uma forma hereditária conhecida, porém geralmente correspondem a uma pequena proporção dos casos. Apenas 5-10% de todos os casos de câncer são devidos a uma mutação genética herdada (Figura 2; Cornelisse & Devilee, 1997; Anand et al., 2008).

Figura 2. O papel dos genes e do ambiente no desenvolvimento do câncer. A) Percentual de contribuição de fatores de risco genéticos e ambientais. B) Risco hereditário para alguns tipos de câncer. C) Contribuição percentual de fatores de risco ambientais (Adaptado de Anand et al., 2008).

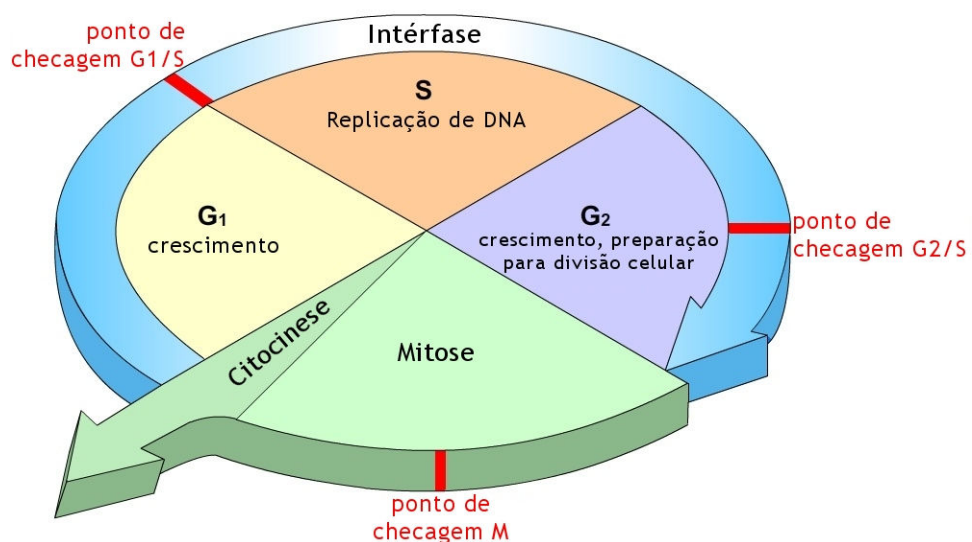


Estudos envolvendo migrações populacionais indicam que a probabilidade de ocorrência da doença está relacionada não ao país de origem, mas ao país para o qual ocorreu a migração (Kolonel et al., 2004; Wiencke 2004; Ziegler et al., 1993; Haenszel & Kurihara 1968). Embora todos os cânceres sejam resultado de diversas mutações (Loeb & Loeb, 2000; Hahn & Weinberg, 2002; Hanahan & Weinberg, 2011), essas mutações são decorrentes da interação com o ambiente (Mucci et al., 2001; Czene & Hemminki, 2002).

Devido à importância do ciclo celular no desenvolvimento do câncer, algumas considerações devem ser feitas. Em eucariotos, o ciclo celular consiste de quatro fases: G1, S, G2 e M. Na fase S ou de síntese, ocorre a replicação do DNA, e a fase M (mitose) consiste na divisão propriamente dita. As outras duas fases, G1 e G2 (do inglês *gap*, intervalo) são igualmente importantes. Durante a fase G1, a célula passa por uma série de checagens antes de entrar na fase S. Posteriormente, durante G2, ocorrem novas checagens, antes do início da mitose (Malumbres & Barbacid, 2009).

Em cada ponto de checagem (*checkpoint*), proteínas específicas determinam se as condições são adequadas para a progressão no ciclo, ou se o mesmo deve ser interrompido. Erros nesses pontos de checagem podem ter consequências graves, incluindo o início de processos tumorigênicos (Khodjakov & Rieder, 2009; Figura 3).

Figura 3. Fases do ciclo celular e pontos de checagem (Adaptado de Windelspecht, 2013).



Com base na pesquisa envolvendo câncer, Hanahan & Weinberg (2000) descreveram seis principais características do câncer, ou seja, habilidades funcionais que permitem o

crescimento do tumor e a metastização. Em 2011, os mesmos autores revisaram estas características, acrescentando outras duas (Hanahan & Weinberg, 2011):

- 1) Manutenção de sinais de proliferação: Células tumorais são capazes de manter uma sinalização proliferativa através de vários mecanismos. Elas podem produzir ligantes de fatores de crescimento, provocando estimulação autócrina; podem estimular células normais a liberarem fatores de crescimento (Cheng et al., 2008; Bhowmick et al., 2004); podem elevar seus níveis de receptores de superfície, tornando-se hiperresponsivas a ligantes de fatores de crescimento, além de alterarem outras vias de sinalização.
- 2) Fuga de supressores de crescimento: Através do escape da regulação negativa da proliferação celular, executada normalmente por proteínas supressoras tumorais, as células neoplásicas conseguem manter a progressão do ciclo celular mesmo quando há, por exemplo, danos no genoma.
- 3) Resistência à morte celular: As células neoplásicas desregulam vias de sinalização para apoptose, tanto através da superexpressão de proteínas anti-apoptóticas quanto através do silenciamento de proteínas pro-apoptóticas (Ashkenazi, 2002; Ghobrial et al., 2005).
- 4) Capacidade de imortalidade: Pode ser adquirida quando a célula tumoral estabiliza o tamanho e a funcionalidade dos telômeros.
- 5) Indução de angiogênese: A formação de novos vasos sanguíneos é um processo essencial para manutenção do crescimento tumoral e metástase. A angiogênese tumoral envolve a sinalização de vários fatores de crescimento pró-angiogênicos (Hicklin & Ellis, 2005; Bergers & Benjamin, 2003).
- 6) Ativação de invasão e metástase: São processos complexos que ainda não são bem compreendidos, porém, sabe-se que envolvem mudanças na forma em que as células se ligam umas às outras e à matriz extracelular.
- 7) Reprogramação do metabolismo: Para manter sua proliferação, as células tumorais ajustam sua produção de energia. Em alguns tumores, as subpopulações celulares utilizam diferentes vias de geração de energia (Semenza, 2008; Feron, 2009; Kennedy & Dewhirst, 2010).
- 8) Fuga do sistema imunológico: Estudos epidemiológicos sugerem que o sistema imune de indivíduos imunocompetentes reconhece e elimina células neoplásicas antes que elas possam iniciar a formação de uma massa tumoral (Vajdic & van Leeuwen, 2009). Algumas evidências indicam que células tumorais com alta

imunogenicidade seriam eliminadas, enquanto células pouco imunogênicas poderiam crescer e gerar tumores sólidos (Kim et al., 2007; Teng et al., 2008). Essa questão permanece controversa, pois células tumorais com alta imunogenicidade podem desativar componentes do sistema imunológico, escapando de serem eliminadas (Yang et al., 2010; Shields et al., 2010).

Dois aspectos estão especialmente relacionados à aquisição das habilidades citadas acima: um deles é a instabilidade do genoma e ocorrência de sucessivas mutações (Negrini et al., 2010; Salk et al., 2010); o outro aspecto está ligado à inflamação, que contribui para o desenvolvimento do câncer através do fornecimento de moléculas bioativas ao microambiente tumoral, incluindo fatores de crescimento, fatores proangiogênicos, entre outras (Mantovani et al., 2008; DeNardo et al., 2010; Grivennikov et al., 2010).

3.2 Mecanismos de morte celular

A apoptose, ou morte celular programada, é um processo fisiológico ativo, não inflamatório, de remoção de células em excesso ou com danos, para que seja mantida a homeostase nos tecidos do corpo (Hengartner, 2000; Galluzzi et al., 2007). As características morfológicas que definem a apoptose incluem condensação citoplasmática e nuclear, fragmentação do DNA intranuclear e formação de bolhas pela membrana celular, causadas pela atividade de proteases (Kerr, et al. 1972; Taylor et al., 2008). Alterações na regulação da apoptose podem causar processos patológicos, tais como doenças autoimunes, doenças neurodegenerativas e câncer (Golstein, 1998).

Quando há danos no DNA, a proteína supressora tumoral p53 ativa vários genes apoptóticos. Um desses genes codifica a proteína p21 (p21^{WAF1/Cip1}), provocando parada do ciclo celular em G1 (Deng et al., 1995; Brugarolas et al., 1995). Além de ser alvo de p53, p21 atua como efetor *downstream* de outros supressores tumorais (Wu et al., 2002). A proteína p21 medeia suas diversas atividades biológicas principalmente pela ligação e inibição da atividade quinase das ciclinas dependentes de quinase (CDKs, do inglês *cyclin-dependent kinases*) CDK1 e CDK2, levando à parada do crescimento em estágios específicos do ciclo celular. Além disso, através da ligação ao antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA, do

inglês *proliferating cell nuclear antigen*), p21 interfere na atividade de DNA polimerase dependente de PCNA, inibindo a replicação e modulando diversos processos de reparo de DNA (Abbas & Dutta, 2009).

Duas principais vias de sinalização para ativação da apoptose foram identificadas: a via mitocondrial ou intrínseca, e a via induzida por receptores de superfície celular (receptores de morte) ou extrínseca (Chen & Wang, 2002; Taylor et al., 2008). Independentemente da via de ativação, este processo é regulado por duas famílias de proteínas: a família das caspases e a família Bcl-2, a qual compreende tanto proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL) quanto pró-apoptóticas (Bax, Bid, Bik; Sorenson, 2004).

A via intrínseca é ativada em resposta a estresse intracelular, como por exemplo danos no DNA, hipóxia e privação de fatores de crescimento. Nessa via, a cascata de caspases é ativada através do aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial e consequente liberação de citocromo c. Essas alterações mitocondriais resultam na formação de apoptossomos, seguida de ativação de caspase 9 e caspase 3, levando à apoptose (Chen & Wang, 2002; Nachmias et al, 2004).

A apoptose extrínseca é induzida por sinais de estresse extracelular, os quais são propagados por receptores transmembrana específicos (Wajant, 2002; Schutze et al., 2008; Mehlen & Bredesen, 2011). Essa rota de morte pode ser iniciada pelo acoplamento de ligantes tais como FASL/CD95L, fator de necrose tumoral α (TNF α) e TRAIL (do inglês *TNF-related apoptosis inducing ligand*) a vários receptores de morte (FAS/CD95, receptor TNF α 1 e receptor TRAIL, respectivamente; Wajant, 2002).

A interação entre as duas vias apoptóticas ocorre através da clivagem da proteína Bid (agonista de morte com domínio de interação BH3, do inglês BH3-interacting death domain agonist), um membro da família Bcl-2 que regula a permeabilização da membrana mitocondrial externa (Billen et al., 2008). Durante a apoptose extrínseca, Bid é clivada pela caspase 8. O fragmento C-terminal dessa clivagem, tBid (do inglês *truncated Bid*), migra e se insere na membrana mitocondrial (Gross et al., 1999), onde conduz subsequentemente a translocação e inserção de Bax, levando à permeabilização da mitocôndria (Eskes et al., 2000; Weiet al., 2000).

A morte por apoptose pode ocorrer em consequência de grave comprometimento das funções do retículo endoplasmático (RE), organela responsável pela síntese e enovelamento de proteínas (Kaufman, 1999; Oyadomari & Mori, 2004). Pelo menos três vias apoptóticas estão envolvidas com a resposta ao estresse de retículo, sendo uma delas a ativação transcricional do gene GADD153 (do inglês *growth arrest- and DNA damage- inducible*).

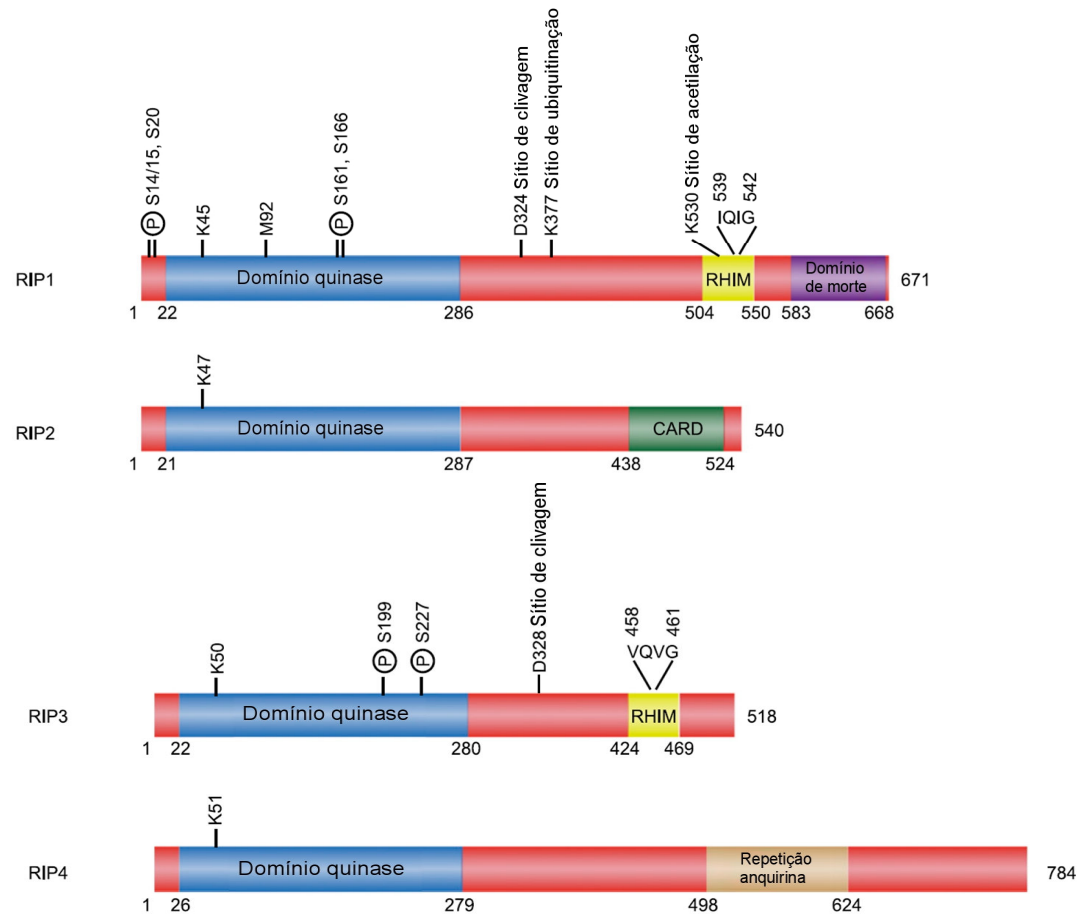
GADD153/CHOP é um fator de ligação a CCAAT (família de fatores de transcrição *CCAAT/enhancer-binding protein*), o qual tem papel essencial na regulação da apoptose (Friedman, 1996; Zinszner et al., 1998). Esta proteína está presente no citoplasma em níveis muito baixos, entretanto, perturbações que causam estresse induzem aumento de sua expressão e seu acúmulo no núcleo (Oyadomari & Mori, 2004). A superexpressão de GADD153/CHOP leva à apoptose através de vários mecanismos, incluindo inibição de Bcl-2 e indução de translocação da proteína pró-apoptótica Bax do citosol para a mitocôndria (McCullough et al., 2001).

Outro mecanismo de morte celular a ser considerado é a necrose, durante a qual ocorre intumescimento da célula, seguido de ruptura da membrana plasmática e rápida lise celular (Majno & Joris, 1995; Galluzzi et al., 2012). Dentre os agentes que podem induzir necrose estão diversos vírus, bactérias e protozoários. Condições patológicas caracterizadas por secreção inadequada de citocinas, óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), também estão relacionadas à morte celular por necrose (Warny et al., 2000; Proskuryakov et al., 2003).

Por muito tempo, a necrose foi considerada como um mecanismo de morte celular acidental. Atualmente, com base em diversos estudos, está claro que a necrose pode ocorrer de forma regulada (Hitomi et al., 2008; Cho et al., 2009; He et al., 2009; Zhang et al., 2009), e que este mecanismo de morte tem função em vários processos fisiológicos e patológicos (Vandenabeele et al., 2010).

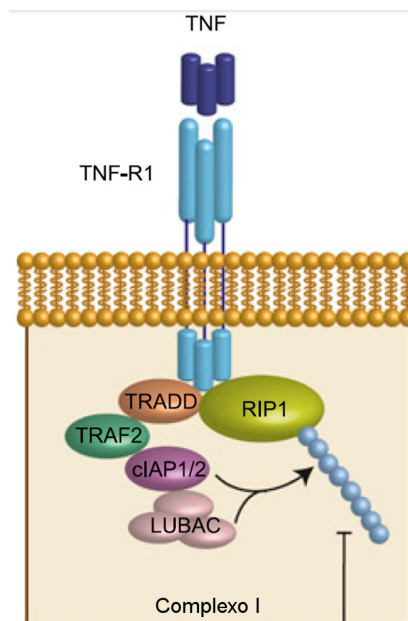
Citocinas da família TNF são clássicas indutoras de necrose programada. As duas principais quinases mediadoras de necrose TNF-dependente são as proteínas RIP1 e RIP3 (do inglês *receptor-interacting protein kinase*). RIP3 possui um domínio quinase ativo em sua porção N-terminal, o qual é conservado em outras proteínas da mesma família, e é essencial para a indução de necrose. Com relação à porção C-terminal, cada membro da família RIP possui uma estrutura específica: um domínio de morte em RIP1, um domínio de recrutamento de caspases em RIP2, repetição de anquirina em RIP4. Em RIP3, está a porção de interação homotípica RIP, também presente em RIP1, e que possibilita a interação de RIP3 com RIP1 e a ocorrência de necrose (Figura 3; Moriwaki & Chan, 2013).

Figura 4. Organização dos domínios da família de proteínas RIP (adaptado de Moriwaki & Chan, 2013).



A ligação de TNF ao seu receptor (TNF-R1) causa a formação do complexo de sinalização TNF-R1 associado à membrana, chamado complexo I (Figura 4), o qual consiste de múltiplas proteínas, incluindo o domínio de morte associado ao TNFR (TRADD, do inglês *TNFR-associated death domain*), RIP1, inibidor de apoptose celular 1 (cIAP1, do inglês *cellular inhibitor of apoptosis 1*), cIAP2, fator 2 associado ao TNFR (TRAF2, do inglês *TNFR-associated fator 2*), e o complexo de montagem de cadeia de ubiquitina linear (LUBAC, do inglês *linear ubiquitin chain assembly complex*).

Figura 5. Esquema do complexo de sinalização TNF-R1 (adaptado de Moriwaki & Chan, 2013).



A ubiquitinação de RIP1 mediada por cIAPs e LUBAC no complexo I é um evento crítico para desencadear a sobrevivência da célula via NF- κ B, bloqueando apoptose e necrose. A desubiquitinação de RIP1 promove apoptose e necrose através da formação do complexo II no citoplasma. Se a atividade da caspase 8 é bloqueada, RIP1 e RIP3 desencadeiam a morte por necrose, transformando o complexo II em um complexo conhecido como necrossomo (Vandenabeele et al., 2010).

3.3 Tratamentos e alvos terapêuticos

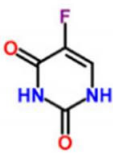
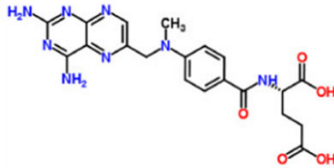
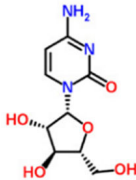
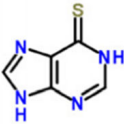
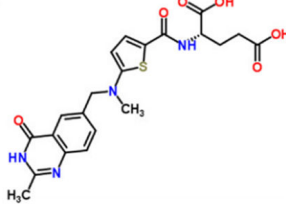
As principais formas de tratamento do câncer utilizadas atualmente envolvem cirurgia, quimioterapia e/ou radioterapia (Shewach & Kuchta, 2009), as quais geralmente são usadas em conjunto, variando apenas quanto à importância de cada uma e a ordem de sua indicação (INCA, 2008). A quimioterapia geralmente envolve o uso de fármacos de baixa massa molecular, que destroem as células tumorais ou limitam sua proliferação. Por agirem tanto em células tumorais quanto em células saudáveis, muitos agentes citotóxicos causam efeitos

colaterais, como depressão da medula óssea, lesões no trato gastrointestinal, queda de cabelo e náuseas, além do desenvolvimento de resistência clínica (Thurston, 2007).

Desde o início do uso da quimioterapia, na década de 1940, um grande número de novos medicamentos anticâncer tem sido desenvolvido (Shewach & Kuchta, 2009). Esses medicamentos podem ser classificados de acordo com seu mecanismo de ação, e também de acordo com a sua atuação no ciclo celular, podendo ser divididos em ciclo-específicos e ciclo-inespecíficos (Almeida et al., 2005).

Os antimetabólitos interagem com rotas essenciais de biossíntese, ou interferem em processos enzimáticos essenciais. Análogos estruturais de purina e pirimidina são incorporados pelas células e interrompem a síntese dos ácidos nucleicos (Figura 5; Nussbaumer et al., 2011).

Figura 6. Antimetabólitos (Adaptado de Nussbaumer et al., 2011).

Antagonistas Pirimidínicos	Antagonistas Purínicos	Antagonistas do Ácido fólico
 Fluorouracil	 Fludarabina	 Metotrexato
 Citarabina	 Mercaptopurina	 Raltitrexato

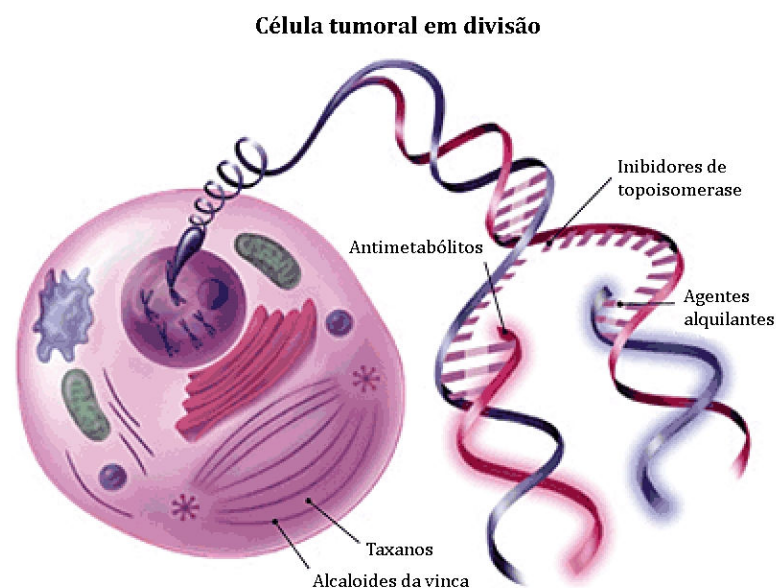
A maior e mais importante família de fármacos utilizada no tratamento do câncer envolve moléculas que interagem com o DNA, através de diversos mecanismos:

- Alquilantes (dacarbazina, procarbazina, temozolomida): adicionam metil ou outros grupos alquila no DNA, impedindo o anelamento correto de bases. O DNA é consequentemente fragmentado por enzimas de reparo que tentam substituir as bases alquiladas (Sanderson & Shield, 1996).

- Agentes de ligação cruzada (cisplatina, ciclofosfamida): causam danos ao formarem ligações entre átomos no DNA. Essas ligações impedem que as hélices do DNA sejam separadas para a síntese ou transcrição (Chválová et al., 2007).
- Intercalantes (doxorubicina, epirrubicina): ligam-se fortemente ao DNA, encaixando-se entre os pares de bases da dupla hélice e formando complexos de transferência de carga com os nucleotídeos (Alcaro et al, 2004).
- Inibidores de topoisomerase (irinotecan, etoposídeo, amsacrina): impedem a atividade das topoisomerasas, e conseqüentemente bloqueiam a divisão celular (Pommier & Goldwasser, 2006).
- Antibióticos (bleomicina): fragmentam o DNA através da formação de radicais livres (Almeida et al., 2005).

Agentes antimitóticos ou antitubulina são fármacos ciclo-específicos que agem na fase da mitose. Interferem com a dinâmica dos microtúbulos, bloqueando a divisão do núcleo e levando à morte celular (Almeida et al., 2005; Nussbaumer et al., 2011). Os exemplos dessa família incluem os alcalóides da vinca (vincristina, vimblastina, vinorelbina, vindesina) e os taxanos (docetaxel e paclitaxel). A Figura 7 mostra um esquema de uma célula em divisão, enfatizando o alvo de alguns quimioterápicos.

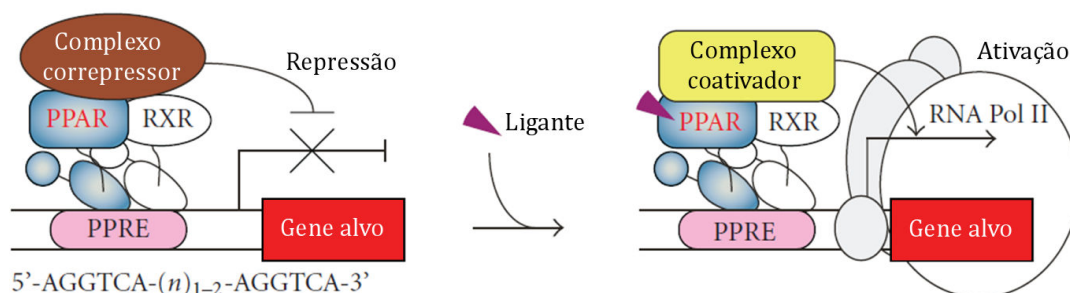
Figura 7. Ação de quimioterápicos na célula em divisão (Fonte: <http://pharmacologycorner.com>).



3.3.1 Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma

Os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) são fatores de transcrição pertencentes à família de receptores nucleares (Mangelsdorf et al., 1995). Os PPARs se ligam a uma repetição de dois hexanucleotídeos, espaçados por um ou dois nucleotídeos, como heterodímeros associados ao receptor retinóide X (RXR), e ativam diversos genes alvo (Figura 8; Hsu et al., 1998; Gervois et al., 1999; Kliewer et al., 1992). Esses elementos responsivos aos proliferadores de peroxissoma (PPREs) são encontrados em vários genes envolvidos no metabolismo de lipídeos e homeostase energética (Schoonjans et al., 1996).

Figura 8. Heterodímeros PPAR/RXR se ligam a PPREs localizados em promotores de genes alvo. PPAR se associa ao complexo correpressor na ausência de ligante. Na presença de um ligante, ocorre a ativação da transcrição gênica (Adaptado de Tachibana et al., 2008).



Vários estudos têm mostrado a expressão de PPAR γ em diversas células tumorais, e a ativação deste fator de transcrição através de ligantes resultou na inibição da proliferação celular ou na indução de apoptose (Grommes et al., 2004; Theocharis et al., 2004). Ligantes de PPAR γ apresentam propriedades antitumorigênicas *in vitro*, e induzem parada do crescimento tumoral em murinos (Mueller et al., 1998; Elstner et al., 1998; Mehta et al., 2000; Pighetti et al., 2001; Suh et al., 1999).

As tiazolidinadionas (TZDs) são agonistas sintéticos de PPAR γ . Estão disponíveis no mercado como agentes hipoglicêmicos para tratamento de diabetes tipo 2, atuando via PPAR γ . O efeito das TDZs na modulação do ciclo celular tem sido estudado em diversos

tipos de câncer, *in vitro* e *in vivo* (Yang & Frucht, 2001; Shao et al., 2002; Kim et al., 2002; Osawa et al., 2003; Giacinti & Giordano, 2006). Muitas evidências indicam que ligantes de PPAR γ podem suprimir o processo de tumorigênese, sugerindo que essas moléculas poderiam ser usadas como fármacos antineoplásicos (Tachibana et al., 2008).

Palakurthi et al. (2001), utilizando células tronco embrionárias de camundongo PPAR $\gamma^{-/-}$ e PPAR $\gamma^{+/+}$, mostraram que as TZDs troglitazona e ciglitazona induziram parada em G1 através de via independente de PPAR γ . Por outro lado, alguns trabalhos mostram resultados contraditórios, nos quais o tratamento com ligantes de PPAR γ resultaram em progressão tumoral (Lefebvre et al., 1998; Saez et al., 2004).

As TZDs troglitazona, pioglitazona e rosiglitazona apresentam eficácia clínica, entretando, troglitazona e rosiglitazona foram descontinuadas e retiradas do mercado por causa de relatos de hepatotoxicidade severa (Gitlin et al., 1998; Neuschwander-Tetri et al., 1998). Foi mostrado que a porção TZD da troglitazona era metabolicamente ativada e levava à formação abundante de adutos de glutathione, os quais eram detectados na bile de ratos (Kassahun et al, 2001). Embora não haja confirmação da relação entre a ativação da TZD e a toxicidade hepática, Agrawal et al. (2005) sintetizaram oxazolidinadionas como agonistas de PPAR γ para evitar um potencial risco de hepatotoxicidade, demonstrando *in vitro* o metabolismo do composto 5-{4-[3-(4-ciclohexil-2-propilfenoxi)propoxi]fenil}-1,3-oxazolidina-2,4-diona em microsossomos de fígado de ratos, cachorros, macacos e humanos, além de enzimas do citocromo P450 recombinantes humanas.

3.4 Novos agentes quimioterápicos - Derivados oxazolidínicos

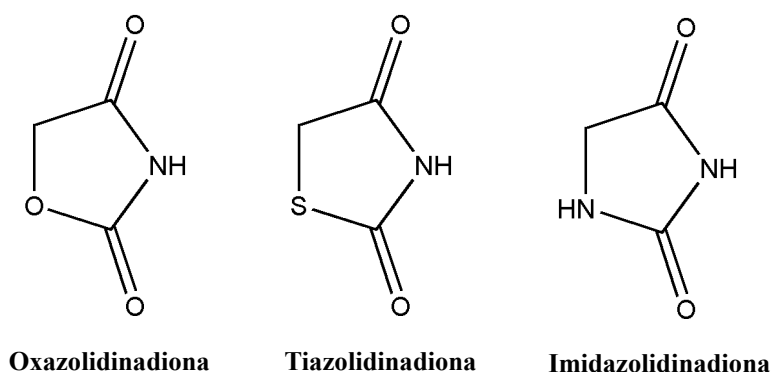
Oxazolidinonas são uma classe de azóis, oxazolidinas com carbono entre o nitrogênio e oxigênio oxidado para uma cetona, portanto oxazolidinona (Pandit et al., 2012). Essas moléculas foram descobertas pela empresa DuPont, e patenteadas em 1978 (Fugitt & Luckenbaugh, 1978).

A primeira oxazolidinona a ser comercializada foi a Linezolida, aprovada para tratamento de pacientes com infecções causadas por bactérias Gram-positivas (Barrett, 2000; Shaw & Barbachyn, 2011). Oxazolidinonas inibem seletivamente a síntese de proteínas

bacterianas através de ligação com a subunidade ribossomal 50S, impedindo a formação de um complexo de iniciação 70S funcional (Zhou et al., 2002; Stevens et al., 2004).

As oxazolidinonas são bioisósteros das tiazolidinadionas e das imidazolidinadionas que pertencem a um importante grupo de heterocíclicos com grupo carbonila nas posições 2, 4 ou 5 do anel pentamérico (Figura 9; Singh et al., 2011). Em química medicinal, bioisósteros são substituintes ou grupos com propriedades físicas ou químicas similares, que consequentemente produzem efeitos biológicos muito semelhantes. No desenvolvimento de fármacos, a troca de um bioisótero por outro é utilizada para melhorar propriedades biológicas ou físicas, como por exemplo, a diminuição da toxicidade de um composto, sem alterações significativas na estrutura química do mesmo (Patani & LaVoie, 1996; Meanwell, 2011).

Figura 9. Oxazolidinadionas e seus bioisósteros.



Oxazolidinas estão presentes em diversas moléculas de interesse farmacêutico. Além da atividade antibacteriana, há relatos na literatura de derivados oxazolidínicos com atividade antifúngica (Devi et al., 2013), hipoglicêmica (Agrawal et al., 2005; Dow et al., 1990), anticonvulsivante (Kombian & Phillips, 2012) e anticâncer (Singh et al., 2011; Tadesse et al., 2011).

Singh et al. (2011) relataram a atividade citotóxica de oxazolidinadionas 3,4-dissubstituídas em linhagem celular HL-60 (leucemia promielocítica). Segundo os autores, a origem da diferença de atividade entre os compostos testados não seria devida simplesmente a

propriedades físicas como lipofilicidade ou polaridade, mas às características estruturais únicas de cada composto. Os autores afirmaram ainda que a morte das células ocorreu por apoptose, correlacionando-a à fragmentação do DNA.

Tadesse et al. (2011) relataram uma nova molécula da família de compostos sinoxazolidinona, isolado de *Synoicum pulmonaria*, ascídio sub-Ártico. Além de atividade antimicrobiana, o composto Synoxazolidinone C apresentou atividade citotóxica contra as linhagens celulares humanas A2058 (melanoma), MCF-7 (adenocarcinoma de mama) e HT-29 (carcinoma de cólon), com IC₅₀ de 30,5µM. Entretanto, o composto também matou células normais (fibroblastos de pulmão, MRC-5) na mesma concentração. Os autores propõem que o anel pirrolidina adicional tenha provocado o aumento da citotoxicidade da molécula.

Kumar et al. (2009) sintetizaram oxazolidinas N-substituídas para avaliação de sua citotoxicidade *in vitro* contra linhagens celulares tumorais, apresentando resultados promissores contra células de cânceres ovariano e oral.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Síntese e caracterização das moléculas com potencial atividade anticâncer

As moléculas utilizadas neste trabalho foram sintetizadas no Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF) do Núcleo de Pesquisa para Inovação Terapêutica Suely Galdino (NUPIT-SG), da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

4.1.1 Reagentes e equipamentos utilizados

Para a síntese e comprovação estrutural dos novos derivados 3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona LPSF/NB sintetizados, foram utilizados os seguintes equipamentos, placas cromatográficas, reagentes e solventes (Tabela 1):

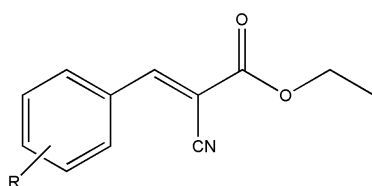
- ✓ Espectrofotômetro de Absorção no Infravermelho - FTIR Shimadzu modelo IR Prestige-21 da Central Analítica do NUPIT-SG da UFPE;
- ✓ Espectrômetro de RMN¹H – Varian, modelo Plus 400 MHz do DQF da UFPE;
- ✓ Espectrômetro de Massa - Bruker Daltonics, modelo Autoflex III (MALDI-TOF), do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE);
- ✓ Determinação dos pontos de fusão - Quimis modelo 340.27 do LPSF;
- ✓ Lâmpada de Ultravioleta - Philco do LPSF;
- ✓ Rota evaporador - Fisatom do LPSF;

Tabela 1. Reagentes e solventes utilizados nas diferentes etapas sintéticas.

Composto	Empresa	Grau de Pureza
3-etil-2-tioxo-4-oxazolidinona	Sigma Aldrich	PA
4-(1-piperidinil)-benzaldeído	Sigma Aldrich	PS
4-(1-pirrolidinil)-benzaldeído	Sigma Aldrich	PS
3,4-dibenzilóxi-benzaldeído	Sigma Aldrich	PS
4-bromo-benzaldeído	Sigma Aldrich	PS
4-cloro-benzaldeído	Sigma Aldrich	PS
Acetato de etila	Cinética	PA
Ácido acético	Cinética	PA
Álcool etílico	J. T. Baker	PA
Benzeno	Sigma Aldrich	PA
Cianoacetato de etila	Sigma Aldrich	PS
Diclorometano	Cinética	PA
n-Hexano	Cinética	PA
Morfolina	Sigma Aldrich	PA

4.1.2 Síntese dos ésteres de Cope (LPSF-IP)

Em um balão de fundo redondo, sob agitação magnética, adaptado a um condensador, foram adicionadas quantidades equimolares de aldeído aromático (Figura 10, etapa 1) substituído e de cianoacetato de etila (Figura 10, etapa 2) na presença de trietilamina como catalisador e benzeno como solvente. A mistura reacional foi aquecida e mantida sob refluxo a uma temperatura de 110°C por 4 horas. Passado este tempo, o produto foi lavado com água destilada, filtrado e purificado por cristalização com álcool etílico (Tabela 2).

Tabela 2. Ésteres de Cope sintetizados.

R	Código LPSF
4-cloro	LPSF/NB-2
4-bromo	LPSF/NB-3
4-pirrolidinil	LPSF/NB-4
3,4-bis-benzilóxi	LPSF/NB-5
4-piperidinil	LPSF/NB-6

4.1.3 Síntese dos derivados 5-benzilideno-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona (LPSF/NB)

Em um balão de fundo redondo, com agitação magnética, adaptado a um condensador, foram adicionadas quantidades equimolares dos derivados 2-ciano-3-fenil-acrilatos de etila (Figura 10, etapa 3) (série LPSF/IP) substituídos e do 3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona (Figura 10, etapa 4) dissolvidos em álcool etílico, na presença de morfolina como catalisador. A mistura reacional foi aquecida e mantida sob refluxo a 50°C por 4 horas, levando à formação dos novos derivados 2-tioxo-oxazolidínicos (Figura 10, etapa 5), que foram purificados através de lavagens sucessivas com água destilada e, posteriormente, álcool etílico (Tabela 3). Na figura 11 são mostradas as estruturas das moléculas sintetizadas.

Tabela 3. Estrutura dos derivados 5-benzilideno-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona (LPSF/NB).

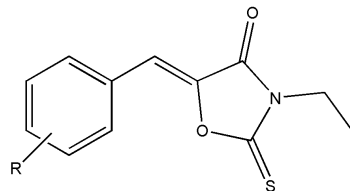
	R	Código LPSF
	4-cloro	LPSF/NB-2
	4-bromo	LPSF/NB-3
	4-pirrolidinil	LPSF/NB-4
	3,4-bis-benzilóxi	LPSF/NB-5
	4-piperidinil	LPSF/NB-6

Figura 10. Diagrama de síntese dos derivados 2-tioxo-oxazolidínicos.

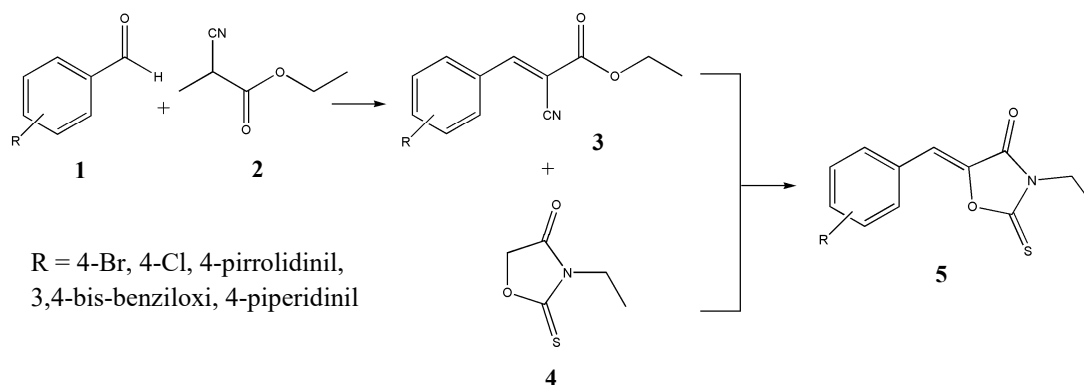
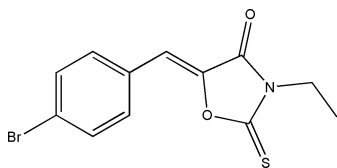
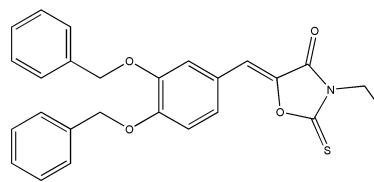
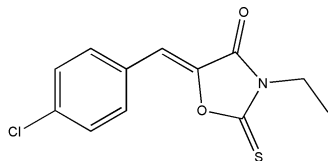


Figura 11. Derivados 2-tioxo-oxazolidínicos sintetizados.**LPSF/NB-2**

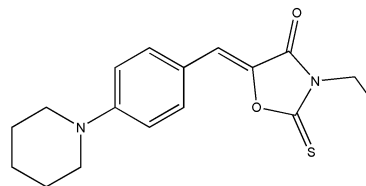
5-(4-bromo-benzilideno)-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona

**LPSF/NB-5**

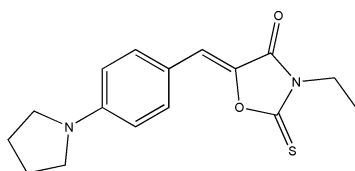
5-(3,4-bis-benzilóxi-benzilideno)-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona

**LPSF/NB-3**

5-(4-cloro-benzilideno)-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona

**LPSF/NB-6**

5-(4-piperidin-1-il-benzilideno)-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona

**LPSF/NB-4**

5-(4-pirrolidin-1-il-benzilideno)-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona

4.1.4 Caracterização estrutural das moléculas sintetizadas

As estruturas químicas dos compostos sintetizados foram confirmadas através da técnica espectroscópica de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H) e carbono 13 (RMN¹³C), realizadas no Departamento de Química Fundamental (DQF) da UFPE, espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV), realizada no NUPIT-SG e espectrometria de massa (MS), realizada no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).

4.2 Ensaios biológicos

4.2.1 Cultivo de linhagens celulares

As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), pH 6,9 suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF, p/v - Cultilab), e bicarbonato de sódio 24 mM em estufa de atmosfera úmida a 37°C, com 5% de CO₂ (v/v).

Os experimentos foram conduzidos utilizando-se as linhagens celulares mostradas na tabela abaixo:

Tabela 4. Linhagens celulares utilizadas neste trabalho.

	Linhagem celular	Proveniência
HL-60	Leucemia Promielocítica Aguda	BCRJ
HL-60/MX1	Leucemia Promielocítica Aguda, resistente a quimioterápicos	ATCC
CCRF-CEM	Leucemia Linfoblástica Aguda	BCRJ
Jurkat	Leucemia de Células T	BCRJ
RAJI	Linfoma de Burkkit	BCRJ
NG97	Glioblastoma	FCM/USP*
T47D	Câncer de Mama	BCRJ

BCRJ: Banco de Células do Rio de Janeiro; FCM/USP: Faculdade de Medicina/Universidade de São Paulo; ATCC: *American Type Culture Collection*.

* A linhagem NG97 foi gentilmente cedida pelo Prof. Roger Chammas.

HL-60: derivada de leucócitos do sangue periférico de paciente de 36 anos, sexo feminino, com leucemia promielocítica aguda (Collins et al., 1977).

HL-60/MX1: derivada da HL-60, resistente ao mitoxantrone (39nM). Essa linhagem apresenta resistência a múltiplas drogas (MDR) atípica, atividade catalítica de topoisomerase II alterada e níveis reduzidos das telomerasas II α e β . As células HL-60/MX1 apresentam resistência cruzada a etoposida, teniposida, bisantreno, actinomicina, daunorrubicina e doxorubicina (Harker et al., 1989).

CCRF-CEM: linhagem estabelecida a partir do sangue periférico de paciente de 4 anos, sexo feminino, com leucemia linfoblástica aguda de células T (Foley et al., 1965).

Jurkat: estabelecida a partir do sangue periférico de paciente de 14 anos de idade, sexo masculino, com leucemia linfóide aguda (Schneider et al., 1977).

RAJI: derivada de linfócito B de um paciente de 11 anos, sexo masculino, com linfoma de Burkitt (Pulvertaft, 1964).

NG97: linhagem celular de glioma humano, estabelecida a partir de tecido obtido de um paciente diagnosticado com astrocitoma grau III (Grippio et al., 2001).

T47D: linhagem isolada a partir de um derrame pleural obtido de paciente do sexo feminino, de 54 anos, com carcinoma ductal invasivo da mama (Keydar, et al., 1979).

4.2.2 Ensaios de seletividade

Células mononucleares de sangue periférico (PBMC, do inglês *Peripheral blood mononuclear cells*) foram obtidas de doadores voluntários saudáveis, não fumantes e que não haviam ingerido bebida alcoólica ou consumido drogas por pelo menos 15 dias antes da coleta. 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). 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 tripam. Os ensaios prosseguiram apenas quando a viabilidade celular foi superior a 98%. As células foram plaqueadas em placa de 96 poços (10^6 células/poço) e mantidas em estufa de atmosfera úmida a 37°C, com 5% de CO₂ (v/v). Após 24 horas, os compostos foram adicionados (25, 50 e 75µM) e as placas incubadas por dois dias (48 horas). Após esse período, os procedimentos foram realizados como descritos no item 4.2.3.

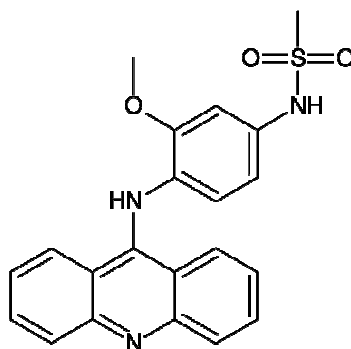
4.2.3 Determinação da citotoxicidade das novas moléculas – ensaio MTT

A citotoxicidade dos compostos foi testada contra sete linhagens de células tumorais: HL-60 (leucemia promielocítica aguda), HL-60/MX1 (HL-60 resistente), CCRF-CEM (leucemia linfoblástica aguda), NG97 (glioblastoma), T47D (câncer de mama), Raji (linfoma de Burkkit) e Jurkat (leucemia de células T). Uma triagem inicial foi realizada utilizando-se os compostos nas doses 25, 50 e 75 μM . Posteriormente, alguns dos compostos também foram testados nas doses de 1 e/ou 10 μM , para que o IC_{50} pudesse ser determinado.

Para os ensaios, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços (10^4 células/poço) em estufa de atmosfera úmida a 37°C , com 5% de CO_2 (v/v). Após 24 horas, os compostos (solução estoque a 50 mM em DMSO) foram diluídos em meio completo (RPMI suplementado com 10% de SBF), nas concentrações especificadas e adicionados nos poços. As placas foram incubadas por três dias (72 horas), nas mesmas condições descritas anteriormente. Em todos os ensaios, foram incluídos controles não tratados e contendo apenas DMSO, na mesma concentração presente nos compostos (0,1%). Após este período, foram adicionados em cada poço 20 μL de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), e, três horas depois, 130 μL de SDS 20%. No dia seguinte, a absorbância foi medida em leitora de placas (EL808, Biotek, EUA) no comprimento de onda de 570 nm.

Cada dosagem de composto foi feita em triplicata e a média da viabilidade de cada experimento foi calculada com base no valor obtido para o controle contendo DMSO. O fármaco padrão utilizado para comparação da citotoxicidade dos compostos sintetizados foi a Amsacrina (Sigma, Figura 12).

Figura 12. Amsacrina.



4.2.4 Cálculo da IC₅₀

As curvas dose-resposta foram construídas com base nos resultados dos ensaios MTT, através da fórmula: % viabilidade celular = $100 - (\text{média viab. célula tratada} - \text{média viab. branco}) \times 100 / (\text{média viab. DMSO} - \text{média viab. branco})$. Para o cálculo da IC₅₀, foram utilizadas as médias de três experimentos independentes. Na equação da reta, o valor de y foi substituído por 50 para obtenção da concentração de composto com capacidade de reduzir a viabilidade celular a 50%.

Para a elaboração dos gráficos e cálculo da IC₅₀, foram utilizados os programas GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) e Origin Pro 8 (Originlab Corporation, Northampton, MA, EUA), respectivamente.

4.2.5 Extração de RNA total

Células da linhagem HL-60 foram plaqueadas em placa de cultura de seis poços (2.10⁶ células por poço), e tratadas com os compostos LPSF/NB-2, LPSF/NB-3, LPSF/NB-4, LPSF/NB-5 (todos a 25μM), Amsacrina (controle antitumoral, 100 nM) e Rosiglitazona (controle positivo para expressão de PPAR_γ, 25μM). Após 10 horas, as células foram coletadas da placa e centrifugadas (3000 rpm, 5 minutos, 4°C). O *pellet* foi ressuscitado em 800μL de Trizol® (Invitrogen), e as amostras foram homogeneizadas em agitador tipo vórtex por 10 minutos. Em seguida, os tubos foram deixados por 5 minutos a 25°C. Foram adicionados 200μL de clorofórmio gelado, e as amostras homogeneizadas delicadamente por inversão.

Após 3 minutos a 25°C, as amostras foram centrifugadas (10000 rpm, 20 minutos, 4°C). A fase aquosa do sobrenadante (referente ao RNA extraído) foi transferida para um novo tubo cuidadosamente, evitando a retirada da interface (proteínas e fragmentos maiores de DNA) e da fase inferior (proteínas e fragmentos menores de DNA). Em seguida, foram adicionados 500μL de isopropanol e a amostra deixada a 25°C por 10 minutos para precipitação do RNA.

Após este período, foi centrifugada a 10000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 75%. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 10000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e após secar o excesso de etanol a 25°C, o RNA foi dissolvido em água livre de RNase/DNase (GIBCO, Gaithersburg, EUA).

A concentração e pureza do RNA foram determinadas por leitura espectrofotométrica a 260 nm no BioPhotometer plus (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Foi utilizada uma densidade óptica (OD) igual a um que equivale a 40 µg/mL de RNA fita simples. A pureza do RNA foi avaliada pela proporção 260/280nm, que deve ficar entre 1,8 e 2,0.

4.2.6 Tratamento do RNA com *DNase I*

Aliquotas de RNA total (4 µg) foram tratadas com a enzima *DNase I* (volume igual a 30% da concentração de RNA; 1 U/µL – Promega, Madison, EUA) por 60 minutos a 37°C, com a finalidade de eliminar possíveis contaminantes de DNA. Em seguida, o RNA foi precipitado com 75µL de etanol absoluto e 3µL de acetato de sódio (0,2 M, pH 4.0-4.6) a -80°C, *overnight*. Após este período, o RNA foi centrifugado por 30 minutos (10000 rpm a 4°C) e lavado com etanol 75%. O RNA foi novamente centrifugado por 20 minutos (10000 rpm) e o sobrenadante desprezado. O precipitado foi deixado a 25°C por 10 minutos para completa secagem, e em seguida dissolvido em água livre de RNase/DNase (GIBCO, Gaithersburg, EUA).

4.2.7 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA utilizou-se o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido), seguindo as instruções do fabricante. Uma mistura contendo dNTPs, iniciadores randômicos (*random primers*), transcriptase reversa e inibidor de RNase (1 U/µL de *RNaseOUT Ribonuclease Inhibitor* - Invitrogen Life Technologies, Califórnia, EUA) foi preparada e adicionada a um mesmo volume de RNA. A

reação de síntese de cDNA foi feita a 25°C por 10 minutos, seguida por 2 horas de incubação a 42°C.

4.2.8 PCR em Tempo Real (qPCR)

Para análise quantitativa dos transcritos diferencialmente expressos foi feita PCR em tempo real. A reação de amplificação dos cDNAs foi realizada com PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK) e sondas específicas para os genes PPAR γ (TaqMan Hs01115513_m1), p21 (TaqMan Hs00355782_m1), BID (TaqMan Hs00609632_m1), GADD153 (TaqMan Hs00358796_g1) e RIP-3 (TaqMan Hs00819388_m1), utilizando-se o equipamento ABI Prism 7900HT *sequence detection PCR machine* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Foi utilizado o gene de referência 18S (TaqMan Hs03928990_g1), cuja expressão é constitutiva, para posterior análise comparativa do nível de expressão dos transcritos de interesse.

A expressão relativa dos genes foi calculada pelo método $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$. Primeiramente calcula-se a relação entre o gene referência (controle endógeno 18S) e o gene alvo (gene em estudo) para todas as amostras. Este índice é denominado ΔCt . Em seguida, calcula-se o $-\Delta\Delta Ct$, que é a correção do ΔCt das amostras pelo ΔCt do grupo controle (não tratado ou tratado com Amsacrina/Rosiglitazona), o qual pode ser calculado subtraindo-se o ΔCt médio da amostra pelo ΔCt médio do controle. Em seguida, é obtido o valor de $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$, pois a amplificação é feita de maneira exponencial em base 2.

4.3 Análise estatística

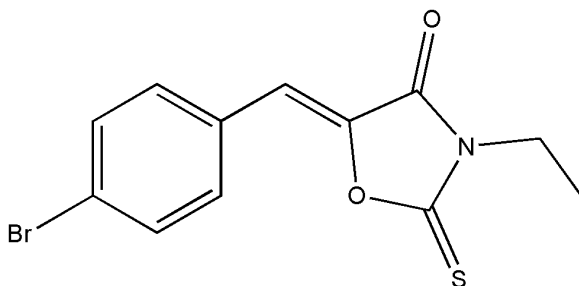
Os resultados de expressão gênica foram analisados por teste t (Student) e por *one-way* ANOVA (teste Bonferroni) para amostras não pareadas, utilizando-se o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). A diferença de expressão foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Dados físico-químicos e análises espectroscópicas

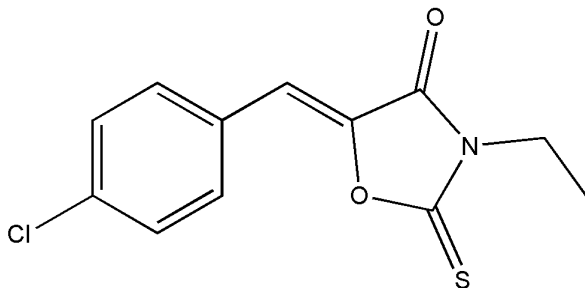
A análise dos espectros de ressonância magnética nuclear (^1H e ^{13}C), infravermelho e massa (Apêndice C) dos compostos sintetizados permitiu a comprovação estrutural dos LPSF/NB, conforme descrição abaixo:

5-(4-bromo-benzilideno)-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona - LPSF/NB-2



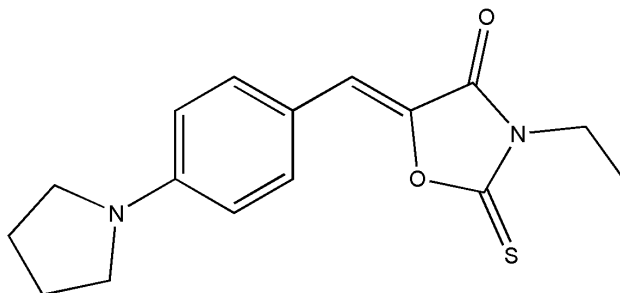
Fórmula Molecular: $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{BrNO}_2\text{S}$; Massa Molecular: 310,9616 g/mol; Ponto de Fusão: 165-166°C; Rendimento: 80%; Razão de Frente: 0,54; Sistema: *n*-Hexano/AcOEt 9:1; IV (KBr, cm^{-1}): C=C aromático (1581) parassubstituído (~800), C=O carbonila (1749), CH_2 (2933), CH_3 (2981), C – Br (1068 – 1006); RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400MHz) δ : 1,20 (t, 3H, J = 7,6 Hz, CH_3), 3,81 (q, 2H, J = 7,2 Hz, CH_2), 6,97 (s, 1H, =CH-), 7,75 (d, 2H, J = 8,8 Hz, benzilideno), 7,81 (d, 2H, J = 8,8 Hz, benzilideno); RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100MHz) δ : 11,68 (CH_3), 37,78 (CH_2), 111,03 (=CH-), 124,20 (C4), 130,26 (C4), 132,29 (CH), 132,29 (CH), 132,76 (CH), 132,76 (CH), 139,50 (C4), 161,51 (C=S), 183,18 (C=O). MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado = 311,9616; encontrado = 312,010.

5-(4-cloro-benzilideno)-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona - LPSF/NB-3



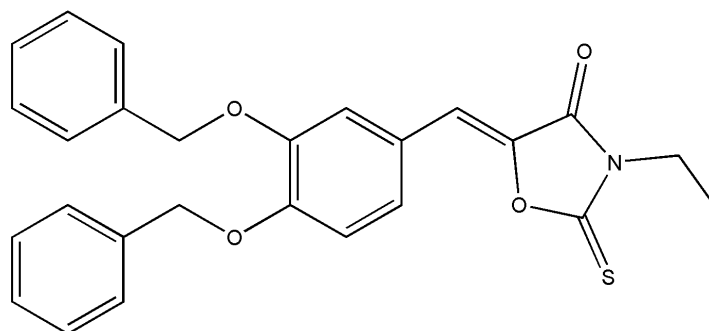
Fórmula Molecular: $C_{12}H_{10}ClNO_2S$; Massa Molecular: 267,0121 g/mol; Ponto de Fusão: 146-147°C; Rendimento: 90%; Razão de Frente: 0,59; Sistema: *n*-Hexano/AcOEt 9:1; IV (KBr, cm^{-1}): C=C aromático (~1584) parassubstituído (818), C=O carbonila (1749), CH_2 (~2900), CH_3 (~2990); RMN 1H (DMSO- d_6 , 400MHz) δ : 1,21 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz, CH_3), 3,81 (q, 2H, $J = 7,6$ Hz, CH_2), 6,96 (s, 1H, =CH-), 7,61 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, benzilideno), 7,88 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, benzilideno); RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100MHz) δ : 11,69 (CH_3), 37,78 (CH_2), 110,95 (=CH-), 129,36 (CH), 129,36 (CH), 129,96 (C4), 132,62 (CH), 132,62 (CH), 135,20 (C4), 139,43 (C4), 161,50 (C=S), 183,19 (C=O). MS $[M+H]^+$ calculado = 268,0121; encontrado = 268,064.

5-(4-pirrolidin-1-il-benzilideno)-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona- LPSF/NB-4



Fórmula Molecular: $C_{16}H_{18}N_2O_2S$; Massa Molecular: 302,1089 g/mol; Ponto de Fusão: 149-150°C; Rendimento: 51%. Razão de Frente: 0,49; Sistema: *n*-Hexano/AcOEt 9:1; IV (KBr, cm^{-1}): C=C aromático (1527) parassubstituído (817), C=O amida trissubstituída (1718), CH_2 (~2900), CH_3 (~2990), amina terciária (~2850); RMN 1H (DMSO- d_6 , 400MHz) δ : 1,21 (t, 3H, J = 7,2Hz, CH_3), 1,98 (m, 4H, pirrolidinil), 3,34 (m, 4H, pirrolidinil), 3,82 (q, 2H, J = 7,2Hz, CH_2), 6,66 (d, 2H, J = 8,4Hz, benzilideno), 6,82 (s, 1H, =CH-), 7,72 (d, 2H, J = 8,4Hz, benzilideno); RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100MHz) δ : 11,65 (CH_3), 24,73 (CH_2), 24,73 (CH_2), 37,35 (CH_2), 47,19 (CH_2), 47,19 (CH_2), 112,07 (CH), 115,44 (CH), 115,44 (CH), 117,34 (C4), 133,37 (CH), 133,37 (CH), 134,96 (C4), 149,20 (C4), 160,96 (C=S), 189,39 (C=O). MS $[M+H]^+$ calculado = 303,1089; encontrado = 303,127.

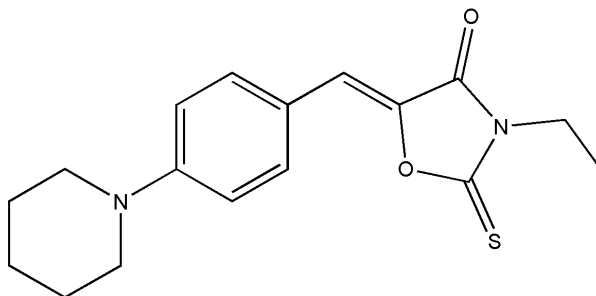
5-(3,4-bis-benzilóxi-benzilideno)-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona - LPSF/NB-5



Fórmula Molecular: $C_{26}H_{23}NO_4S$; Massa Molecular: 445,1348 g/mol; Ponto de Fusão: 85-86°C; Rendimento: 85%; Razão de Frente: 0,57; Sistema: *n*-Hexano/AcOEt 8:2; IV (KBr, cm^{-1}): C=C aromático (1511) parassubstituído (795), C=O amida trissubstituída (1745), CH_2 (~2900), CH_3 (~2990), benzenos monossubstituídos (1597 e 1665); RMN 1H (DMSO- d_6 , 400MHz) δ : 1,20 (t, 3H, J = 7.6 Hz, CH_3), 3,80 (q, 2H, J = 7,2 Hz, CH_2), 5,17 (s, 2H, OCH_2), 5,22 (s, 2H, OCH_2), 6,88 (s, 1H, =CH-), 7,23 (d, 1H, J = 8,4 Hz, benzilideno), 7,32 (d, 1H, J = 8,4 Hz, benzilideno), 7,60 (s, 1H, benzilideno), 7,41-7,35 (m, 5H, benzilóxi), 7,50-7,46 (m, 5H, benzilóxi); RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100MHz) δ : 11,74 (CH_3), 37,66 (CH_2), 69,87 (OCH_2), 70,03 (OCH_2), 113,13 (CH), 114,11 (CH), 116,47 (CH), 123,81 (C4), 125,82 (CH), 127,71 (CH), 127,82 (CH), 127,82 (CH), 127,93 (CH), 127,93 (CH), 127,97 (C4), 127,97 (C4),

127,97 (C4), 127,97 (C4), 128,46 (C4), 128,46 (C4), 128,46 (C4), 128,46 (C4), 136,62 (C4), 136,69 (C4), 137,59 (C4), 147,91 (C4), 150,64 (C4), 161,42 (C=S), 183,01 (C=O). MS $[M+H]^+$ calculado = 446,1348; encontrado = 446,071.

5-(4-piperidin-1-il-benzilideno)-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona - LPSF/NB-6



Fórmula Molecular: $C_{16}H_{18}N_2O_2S$; Massa Molecular: 316,124 g/mol; Ponto de Fusão: 152-153°C; Rendimento: 52%; Razão de Frente: 0,45; Sistema: *n*-Hexano/AcOEt 9:1; IV (KBr, cm^{-1}): C=C aromático (1515) parassubstituído (829), C=O amida trissubstituída (1733), CH_2 (~2990), CH_3 (2945), amina terciária (2820); RMN 1H (DMSO- d_6 , 400MHz) δ : 1,21 (t, 3H, J = 6,8Hz, CH_3), 1,60 (m, 6H, piperidinil), 3,38 (m, 4H, piperidinil), 3,81 (q, 2H, J = 7,2Hz, CH_2), 6,81 (s, 1H, =CH-), 7,01 (d, 2H, J = 8,8Hz, benzilideno), 7,71 (d, 2H, J = 8,8Hz, benzilideno); RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100MHz) δ : 11,63 (CH_3), 23,77 (CH_2), 24,77 (CH_2), 24,77 (CH_2), 37,42 (CH_2), 47,55 (CH_2), 47,55 (CH_2), 113,90 (CH), 113,90 (CH), 114,54 (CH), 118,92 (C4), 133,18 (CH), 133,18 (CH), 135,74 (C4), 152,08 (C4), 161,07 (C=S), 182,56 (C=O). MS $[M+H]^+$ calculado = 317,124; encontrado = 317,136.

5.2 Ensaios de seletividade

Os novos derivados 2-tioxo-oxazolidínicos não apresentaram toxicidade quando testados em células saudáveis (PBMC; Tabela 5), apresentando a vantagem de serem mais seletivos quando comparados ao controle utilizado (Amsacrina).

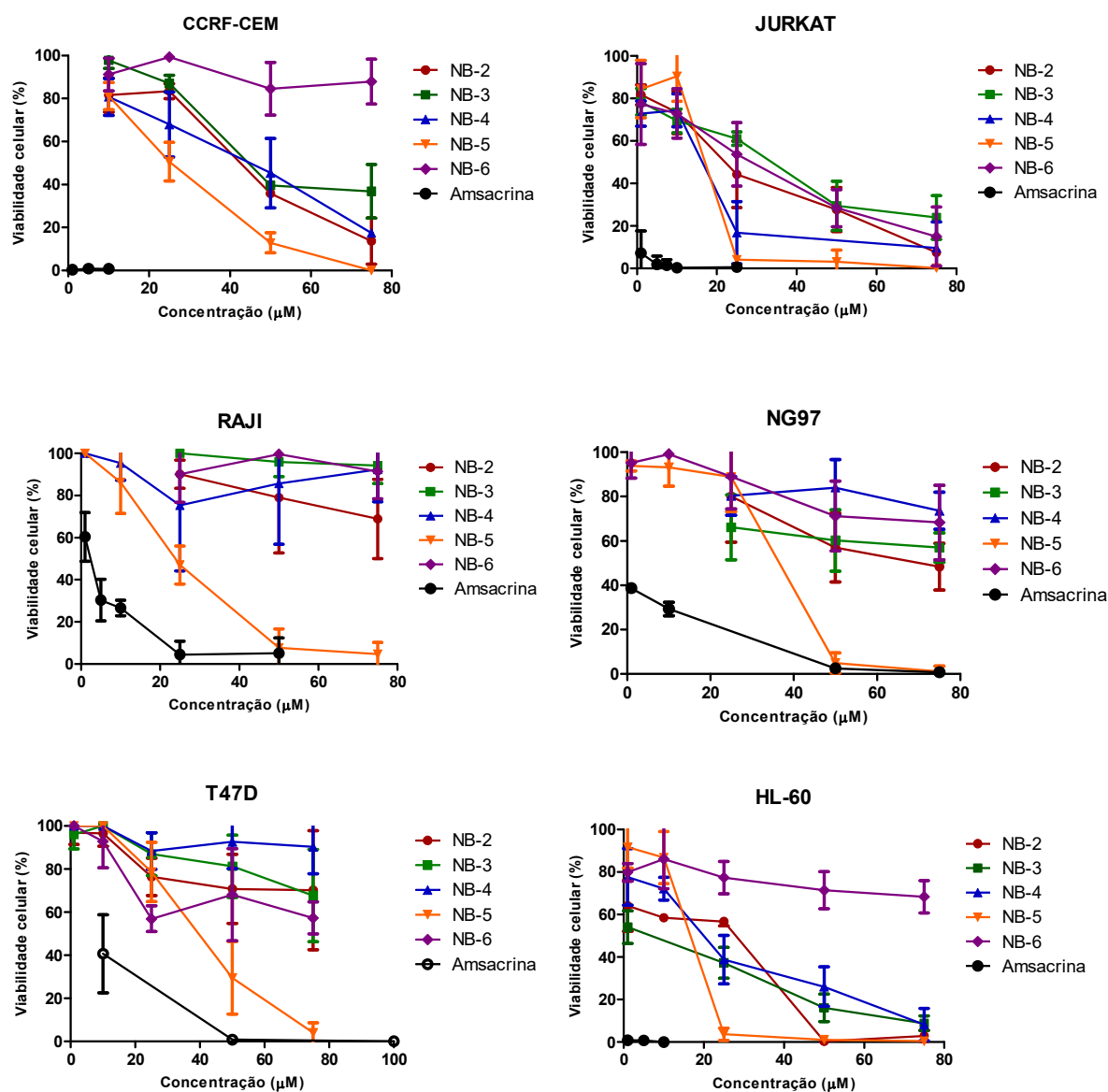
Tabela 5. Valores de IC₅₀ dos compostos LPSF/NB em PBMC.

	IC ₅₀ (μM) - PBMC
LPSF/NB-2	>75
LPSF/NB-3	>75
LPSF/NB-4	>75
LPSF/NB-5	>75
LPSF/NB-6	>75
Amsacrina	3,73

5.3 Ensaios de citotoxicidade

Dentre os compostos avaliados, o LPSF/NB-5 apresentou atividade mais pronunciada, inibindo o crescimento de todas as linhagens celulares testadas. Todos os outros compostos apresentaram atividade antitumoral frente a pelo menos uma linhagem celular. Em geral, os compostos apresentaram melhores resultados contra linhagens de leucemia (HL-60 e Jurkat). A Figura 13 mostra a viabilidade de cada linhagem celular, quando tratadas com os compostos LPSF/NB.

Figura 13. Viabilidade celular das linhagens tumorais frente aos compostos LPSF/NB.

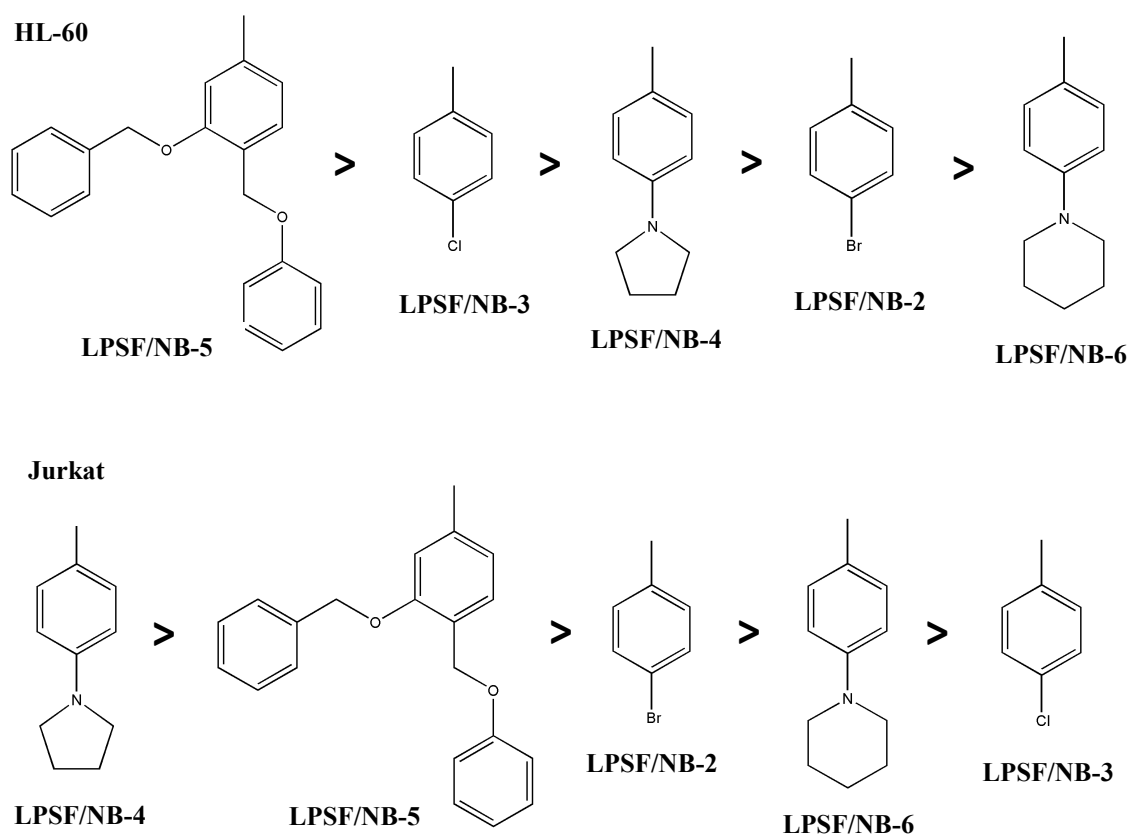


A tabela 6 mostra os valores de IC_{50} dos compostos LPSF/NB frente às linhagens tumorais HL-60, CCRF-CEM, T47D, NG97, Raji e Jurkat, assim como os resultados obtidos para células saudáveis (PBMC). Os valores são apresentados em concentração micromolar (μM). Quanto menor o valor, maior a potência inibitória.

Tabela 6. Valores de IC₅₀ (μM) dos compostos LPSF/NB.

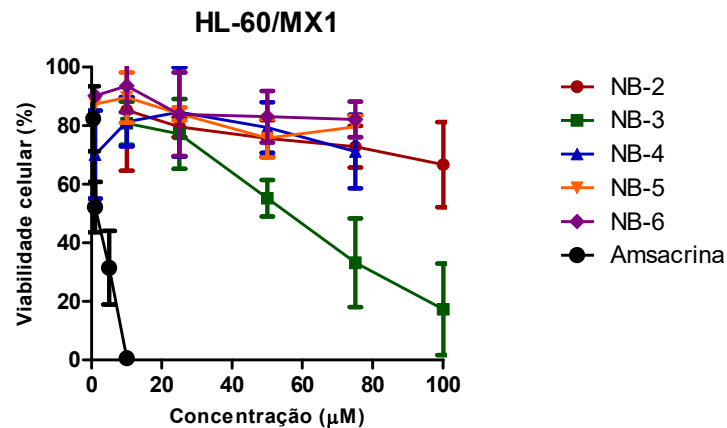
	HL60	HL60/ MX1	T47D	NG97	Raji	Jurkat	CCRF- CEM
LPSF/NB-2	27,18	>75	>75	55,26	>75	24.18	42,89
LPSF/NB-3	17,84	56,33	>75	>75	>75	32.14	42,84
LPSF/NB-4	21,19	>75	>75	>75	>75	15.19	45,53
LPSF/NB-5	16,44	>75	39,73	36,55	23,86	22.54	28,98
LPSF/NB-6	>75	>75	>75	>75	>75	28.99	>75
Amsacrina	<1	1,3	12,18	2,1	4,15	<1	<1

A figura abaixo mostra a relação entre a estrutura química e a IC₅₀ dos compostos sintetizados nas linhagens HL-60 e Jurkat.

Figura 14. Relação entre a estrutura química e a atividade antitumoral dos compostos LPSF/NB nas linhagens celulares HL-60 e Jurkat.

Quando os ensaios foram realizados em linhagem resistente (HL-60/MX1), apenas o composto NB-3 apresentou atividade citotóxica, com a média da $IC_{50} = 56\mu M$ (Figura 15).

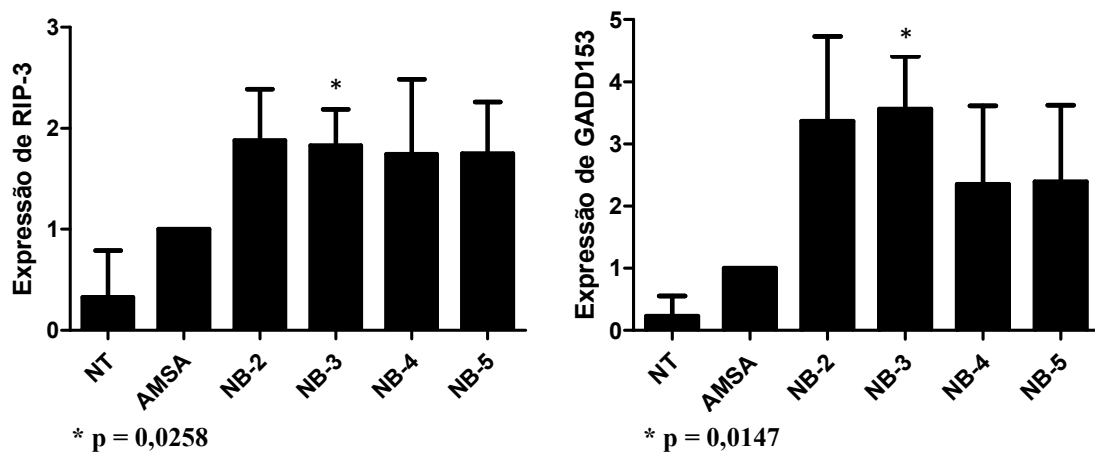
Figura 15. Viabilidade celular da linhagem resistente HL-60/MX1 frente aos compostos LPSF/NB.



5.4 Análise de expressão gênica por PCR em Tempo Real

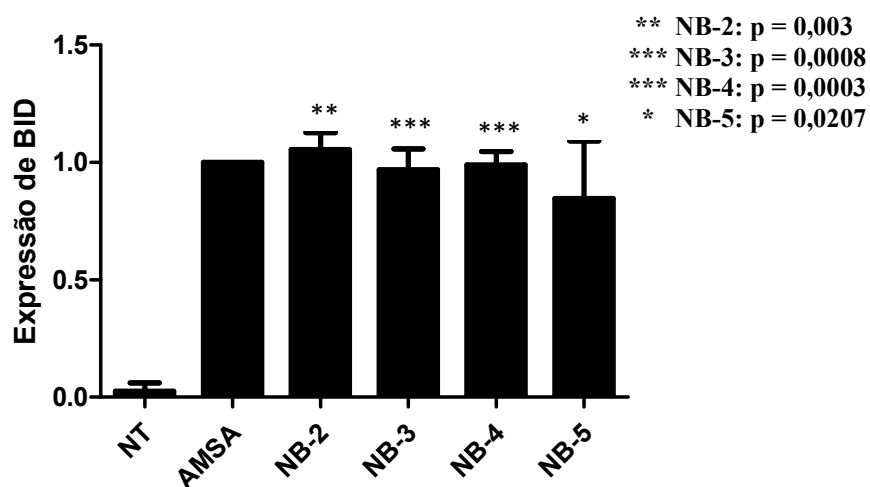
Na linhagem HL-60, o tratamento com o composto LPSF/NB-3 aumentou a expressão dos genes RIP3 e GADD153 (Figura 16), quando comparados às células não tratadas.

Figura 16. Efeito dos LPSF/NB na expressão de RIP3 e GADD153 na linhagem tumoral HL-60 (NT: Não tratado; AMSA: Amsacrina).



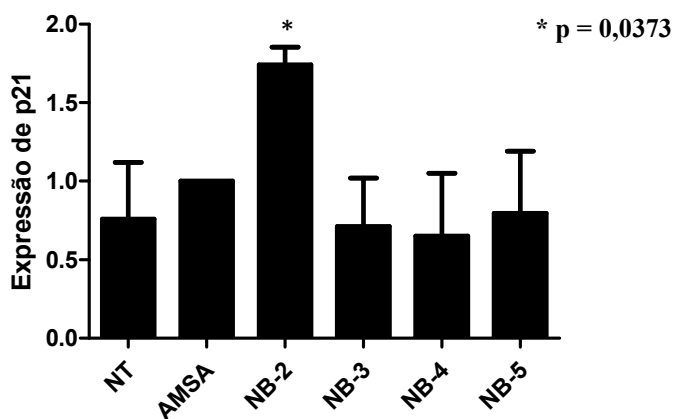
Quando a expressão do gene BID foi quantificada, observou-se que o tratamento com os compostos testados induziu um aumento na expressão deste gene com relação ao controle não tratado. Entretanto, se a comparação é feita com relação à Amsacrina, não houve diferença significativa na expressão de BID (Figura 17).

Figura 17. Efeito dos LPSF/NB na expressão de BID na linhagem tumoral HL-60 (NT: Não tratado; AMSA: Amsacrina).



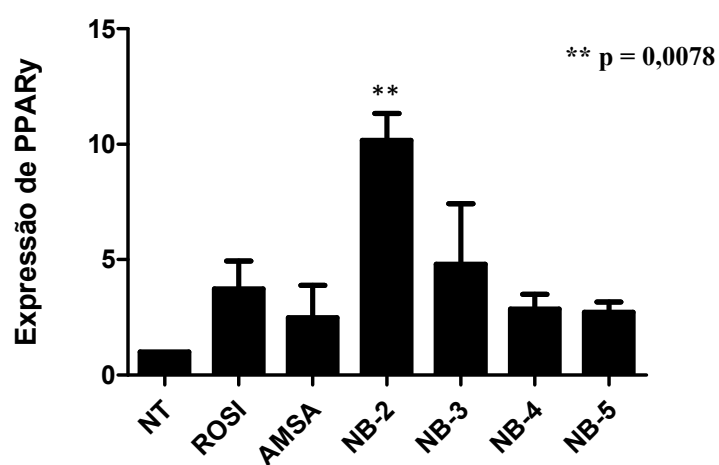
Após o tratamento com o composto LPSF/NB-2, a expressão do gene p21 foi elevada, quando comparados tanto ao controle não tratado quanto à Amsacrina (Figura 18).

Figura 18. Efeito dos LPSF/NB na expressão de p21 na linhagem tumoral HL-60 (NT: Não tratado; AMSA: Amsacrina).



O composto LPSF/NB-2 também induziu aumento na expressão do gene PPAR γ (Figura 19), quando comparado às células não tratadas e ao controle tratado com rosiglitazona, agonista de PPAR γ (utilizado como controle positivo para expressão do receptor).

Figura 19. Efeito dos LPSF/NB na expressão de PPAR γ na linhagem tumoral HL-60 (NT: Não tratado; AMSA: Amsacrina; ROSI: Rosiglitazona).



6. DISCUSSÃO

A caracterização estrutural das novas moléculas da série 2-tioxo-3-etil-oxazolidin-4-ona foi realizada utilizando-se as seguintes técnicas espectroscópicas: infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e de carbono 13 (RMN ^{13}C), além da espectrometria de massas.

Como pontos característicos na elucidação estrutural dos novos derivados 2-tioxo-oxazolidínicos através da análise do RMN ^1H , foram observados tripletos referentes às metilas ($-\text{CH}_3$) que possuíram deslocamentos químicos variando entre 1,20 – 1,21 ppm, quartetos relativos aos hidrogênios metilênicos ($-\text{CH}_2-$) os quais variaram entre 3,80 – 3,82 ppm e também o hidrogênio benzilidênico, referente a ligação formada na reação de adição de Michael, o qual se apresentou na forma de singlete e teve deslocamento químico variando entre 6,81 – 6,96 ppm. A evidência desse hidrogênio benzilidênico nos espectros comprova a formação dos nossos derivados 2-tioxo-oxazolidínicos. Os demais hidrogênios referentes às substituições na posição 5 do núcleo da 3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona também foram devidamente elucidados, apresentando-se na forma de singletos, dubletos, tripletos e multipletos.

O espectro de RMN ^{13}C evidencia as absorções dos átomos de carbono característicos dos derivados 2-tioxo-oxazolidínicos. Os deslocamentos dos carbonos referentes à carbonila ($\text{C}=\text{O}$) são evidenciados nos sinais entre 183 a 189 ppm, já os sinais referentes à tiocarbonila ($\text{C}=\text{S}$) variaram entre 160 a 161 ppm. Os carbonos das metilas apresentaram sinais em torno de 11 ppm e os carbonos referentes ao $-\text{CH}_2-$ em torno de 37 ppm. Os deslocamentos dos carbonos referentes à ligação benzilidênica formada variaram entre 110 e 113 ppm. Já os carbonos aromáticos variaram entre 112 e 152 ppm, devido à natureza dos substituintes aos quais estes se encontram ligados (N, O, C).

A espectroscopia na região do infravermelho foi utilizada como ferramenta adjunta na caracterização dos compostos sintetizados, na qual é possível evidenciar grupos funcionais característicos presentes dos compostos sintetizados (Pavia et al., 2010). Os derivados 2-tioxo-3-etil-oxazolidin-4-ona apresentaram estiramentos/bandas características dos grupos funcionais. Os modos vibracionais de ligações do tipo $\nu(\text{C}=\text{C})$, características em anéis aromáticos, foram observadas em $1584\text{--}1511\text{ cm}^{-1}$ e em $829\text{--}795\text{ cm}^{-1}$, dessa forma confirmando que o grupo arila se apresenta parassubstituído. Ligações do tipo $\nu(\text{CH}_2)$ foram

localizadas em 2990-2900 cm^{-1} , $\nu(\text{CH}_3)$ em 2990-2945 cm^{-1} e $\nu(\text{C}=\text{O})$ atribuída a amida trissubstituída em 1749-1718 cm^{-1} , além do estiramento característico aos radicais específicos encontrados para cada molécula, com exceção do 4-Cl presente no LPSF/NB-3, pois há superposição com a banda do grupamento éter $\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$ que ocorre em aproximadamente 1100 cm^{-1} . Superposições de bandas também foram observadas para as ligações do tipo $\nu(\text{C}=\text{S})$, que apresentam banda forte em 830 cm^{-1} (Casas et al., 1997). A espectrometria de massa confirmou todos os compostos sintetizados.

Com relação à atividade biológica, avaliada através do método MTT, o composto NB-5 inibiu o crescimento de todas as linhagens testadas, exceto a linhagem resistente (HL-60/MX1). Comparando-se as estruturas moleculares dos compostos sintetizados, os resultados indicam que o grupamento volumoso/doador de elétrons (3,4-bis-benzilóxi) foi responsável pelo aumento da atividade anticâncer deste derivado 2-tioxo-oxazolidínico.

Apesar da semelhança entre as estruturas dos compostos LPSF/NB-4 (substituinte pirrolidina) e LPSF/NB-6 (substituinte piperidina), os resultados de viabilidade celular frente às linhagens testadas não foram similares. Dentre os compostos testados, o NB-4 apresentou a maior toxicidade contra as células da linhagem Jurkat ($\text{IC}_{50} = 15,19 \mu\text{M}$). Esse resultado pode estar relacionado ao grupo pirrolidina na molécula, um alcaloide encontrado naturalmente em folhas de tabaco e cenoura. Como alterações no padrão de glicosilação de proteínas celulares estão relacionadas ao desenvolvimento de câncer (Kobata, 1989; Kobata & Amano, 2005; Brooks et al, 2008), o mecanismo de ação desses compostos baseia-se na inibição de α -manosidases tipo II.

Vários estudos vêm sendo conduzidos com o objetivo de avaliar o potencial anticâncer de moléculas contendo anel pirrolidina (Li et al., 2006; Guo et al., 2012; Limpachayaporn et al., 2013). Bello et al. (2010) sintetizaram novas pirrolidinas funcionalizadas, mostrando que os compostos afetaram a expressão de genes envolvidos na progressão do ciclo celular. Fiaux et al. (2008) também mostraram a síntese e atividade antitumoral *in vitro* de pirrolidinas funcionalizadas, através da inibição de α -manosidases tipo II.

Com relação às análises de expressão gênica, observamos que o composto LPSF/NB-2 provocou aumento significativo na expressão do gene p21 em HL-60. A superexpressão de p21 aumenta a susceptibilidade à apoptose induzida por medicamentos antitumorais em linhagens de glioma (Kondo et al., 1996) e diversas linhagens com deficiência de p53 (Lincet et al., 2000). Esses estudos mostraram a correlação entre o nível de expressão de p21 e a sobrevida dos pacientes (Zolota et al., 2007). Muitos medicamentos anticâncer, como por

exemplo inibidores de histona desacetilases, funcionam (pelo menos parcialmente) promovendo indução de p21 (Ocker & Schneider-Stock, 2007). Por outro lado, alguns estudos mostraram que p21 pode funcionar como oncogene (Roninson, 2002; Gartel, 2006). Como esta proteína participa de vias que envolvem estabilidade genômica, apoptose, senescência e reparo de DNA, intervenções terapêuticas que alteram estas vias devem ser melhor estudadas.

Nossos resultados mostraram que o tratamento com o composto LPSF/NB-3 induziu a expressão dos genes RIP3 e GADD153 em HL-60. A indução da necrose programada através de RIP3 é uma estratégia antitumoral a ser considerada, já que muitos tipos de câncer apresentam resistência à apoptose, mecanismo de ação de diversos quimioterápicos. Até o momento, não há evidências claras que indiquem se a necrose é benéfica ou prejudicial no câncer (Moriwaki & Chan, 2013). Como este mecanismo de morte também promove inflamação, esse efeito no microambiente tumoral precisa ser cuidadosamente avaliado (Mantovani et al., 2008). Sendo assim, mais estudos são necessários antes que esta via de morte possa ser utilizada na terapêutica do câncer.

A indução de GADD153 também pode representar uma nova abordagem no tratamento de neoplasias, podendo ser usada para sensibilizar as células tumorais à ação de outros quimioterápicos, funcionando como terapia adjuvante. O potencial da indução do estresse de retículo endoplasmático no tratamento do câncer tem sido avaliado por diversos grupos (Pae et al., 2007; Saito, 2009). A curcumina, substância extraída da cúrcuma, tem sido estudada por apresentar propriedades antitumorais (López-Lázaro, 2008). Pae et al. mostraram que a curcumina induz apoptose e causa estresse de retículo endoplasmático em células da linhagem HL-60, sendo a expressão da proteína GADD153 uma das evidências deste resultado (Pae et al., 2007).

Com relação à expressão de PPAR γ , nossos resultados sugerem que este gene foi induzido após tratamento com os derivados 2-tioxo-oxazolidínicos, indicando que este fator de transcrição pode ser alvo dos LPSF/NB. Entretanto, apenas para o composto LPSF/NB-2 foi observada diferença significativa. Com base no bioisosterismo entre tiazolidinas e oxazolidinas, Agrawal et al. (2005) sintetizaram derivados oxazolidínicos como agonistas de PPAR γ , confirmando esta interação através da análise dos metabólitos encontrados em microsossomos de fígado de ratos, cachorros, macacos e humanos, além de enzimas do citocromo P450 recombinantes humanas. Este efeito de indução da expressão de PPAR γ pode ser interessante, pois acrescenta um mecanismo anti-inflamatório ao efeito anticâncer. Estudos indicam que o processo inflamatório contribui para o desenvolvimento e disseminação do tumor (Hanahan & Weinberg, 2011). Sendo assim, a busca de novos

quimioterápicos que apresentem este efeito dual, antitumoral e anti-inflamatório, será de grande importância para um tratamento mais eficaz.

A linhagem HL-60 é bastante sensível a vários estímulos apoptóticos, especialmente causados por agentes anticâncer (Lennon et al., 1991; Bertrand et al., 1993), apesar de expressar o gene Bcl-2 (antiapoptose; Delia et al., 1992) e não expressar o gene p53 (Wolf & Rotter, 1985). Diversos trabalhos têm relatado o papel de Bid na indução de apoptose (Sax et al., 2002; Fischer et al., 2003). Sax et al. (2002) demonstraram que Bid é regulado transcricionalmente por p53 após o tratamento com adriamicina, 5-fluorouracil e irradiação UV-C. Células tumorais frequentemente apresentam mutações no gene p53, inativando sua função reguladora da apoptose (Bonofiglio et al., 2011). Muitas vezes essa ausência de apoptose desencadeada por p53 é a causa de resistência ao tratamento quimioterápico (Clarke et al., 1993; Lowe et al., 1993). Por outro lado, há evidências de que a localização mitocondrial da proteína p53 é suficiente para iniciar o processo apoptótico (Murphy et al., 2004).

Bonofiglio et al. (2011) utilizaram as linhagens celulares de câncer de mama MCF7 (p53 selvagem), SKBR3 e T47D (ambas com p53 mutado e consequentemente com atividade transcricional comprometida) para avaliar o mecanismo de apoptose desencadeado por ligantes de PPAR γ (rosiglitazona) e RXR (ácido 9-cis-retinoico). Os autores observaram um aumento na expressão de Bid causado por PPAR γ , mostrando que a regulação de Bid ocorreu de forma independente de p53. Como a linhagem HL-60 não expressa o gene p53, nossos resultados indicam que a expressão de Bid nos compostos testados (todos exceto LPSF/NB-6) pode ter sido induzida por PPAR γ . Além de validar este resultado por Western Blot, seria interessante avaliar a presença do fragmento ativo no processo de morte celular por apoptose, tBid.

7. CONCLUSÕES

- Cinco novos derivados 2-tioxo-oxazolidínicos foram sintetizados e caracterizados estruturalmente: 5-(4-bromo-benzilideno)-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona (LPSF/NB-2), 5-(4-cloro-benzilideno)-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona (LPSF/NB-3), 5-(4-pirrolidin-1-il-benzilideno)-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona (LPSF/NB-4), 5-(3,4-bis-benzilóxi-benzilideno)-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona (LPSF/NB-5), 5-(4-piperidin-1-il-benzilideno)-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona (LPSF/NB-6). O rendimento de todos os compostos foi acima de 51%.
- Em células saudáveis (PBMC), o IC₅₀ de todas as moléculas foi maior que 75 µM.
- A atividade biológica dessas moléculas foi avaliada em sete linhagens tumorais: HL-60 (leucemia promielocítica aguda), HL-60/MX1 (HL-60 resistente), CCRF-CEM (leucemia linfoblástica aguda), NG97 (glioblastoma), T47D (câncer de mama), Raji (linfoma de Burkitt) e Jurkat (leucemia de células T).
- Em geral, os compostos apresentaram melhores resultados contra linhagens de leucemia (HL-60 e Jurkat). O composto LPSF/NB-5 inibiu o crescimento de todas as linhagens celulares testadas, com exceção de HL-60/MX1.
- Os derivados 2-tioxo-oxazolidínicos apresentaram atividade antitumoral contra diferentes tipos de células tumorais, modulando a expressão de genes envolvidos em apoptose, estresse de retículo endoplasmático, necrose programada e inflamação. Os compostos LPSF/NB-4 e LPSF/NB-5 mostraram atividade citotóxica mais pronunciada, particularmente contra células de leucemia, sendo moléculas promissoras para estudos *in vivo* e de efeito sinérgico no tratamento de câncer.

8. PERSPECTIVAS

- Confirmação dos mecanismos de morte através de Citometria de Fluxo;
- Análise proteômica (HL-60 e HL-60/MX1) para elucidação de mecanismos de resistência;
- Análise da expressão gênica em outras linhagens;
- Análise da expressão do gene p53 em RAJI;
- Avaliação da inibição de topoisomerasas;
- Validação dos resultados de expressão gênica por Western Blot;
- Ensaios *in vivo*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, T.; DUTTA, A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. **Nature Reviews Cancer**. 9(6):400-14. 2009.

AGRAWAL, A. K. et al. *In vitro* metabolism of a new oxazolidinedione hypoglycemic agent utilizing liver microsomes and recombinant human cytochrome P450 enzymes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 23;37(2):351-8. 2005.

ALCARO, S. et al. Design and synthesis of DNA-intercalating 9-fluoren-beta-O-glycosides as potential IFN-inducers, and antiviral and cytostatic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 1;12(7):1781-91. 2004.

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**, São Paulo, v.8, p.118-129. 2005.

ANAND, P. et al. Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. **Pharmaceutical Research**. 25(9): 2097–2116. 2008.

ASANO, N. Glycosidase inhibitors: update and perspectives on practical use. **Glycobiology**. 13:93R-104R. 2003.

ASHKENAZI, A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. **Nature Reviews Cancer**. 2:420-430. 2002.

BARRETT, J. F. Linezolid Pharmacia Corp. **Current Opinion in Investigational Drugs**. 1(2):181-7. 2000.

BERGERS, G.; BENJAMIN, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. **Nature Reviews Cancer**. 3:401-410. 2003.

BERTRAND, R. et al. Apoptosis and its modulation in human promyelocytic HL-60 cells treated with DNA topoisomerase I and II inhibitors. **Experimental Cell Research**. 207(2):388-97. 1993.

BHOWMICK, N. A.; NEILSON, E. G.; MOSES, H. L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. **Nature**. 432, 332–337. 2004.

BILLEN, L.P.; SHAMAS-DIN, A.; ANDREWS, D.W. Bid: a Bax-like BH3 protein. **Oncogene**. 27 Suppl 1:S93-104. 2008.

BELLO, C. et al. Novel 2-[(benzylamino)methyl]pyrrolidine-3,4-diol derivatives as alpha-mannosidase inhibitors and with antitumor activities against hematological and solid malignancies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 18(9):3320-34. 2010.

BONFIGLIO, D. et al. Bid as a potential target of apoptotic effects exerted by low doses of PPAR γ and RXR ligands in breast cancer cells. **Cell Cycle**. 10(14):2344-54. 2011.

BRAISSANT, O. et al. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR- α , - β , and - γ in the adult rat. **Endocrinology**. vol. 137, no. 1, pp. 354–366. 1996.

BROOKS, S. A. Altered glycosylation of proteins in cancer: what is the potential for new anti-tumour strategies. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**. 8, 2–21. 2008.

BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. **Nature Genetics**. 21, 33-37. 1999.

BRUGAROLAS, J. et al. Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. **Nature**. 377(6549):552-7. 1995.

CASAS, J.A. et al. Pyridoxal thiosemicarbazone monohydrate of dimethylthallium(III): X-ray structure and spectroscopic properties. **Inorganica Chimica Acta**. 260, p. 183-188, 1997.

CHAWLA, A. et al. PPAR δ is a very low-density lipoprotein sensor in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. vol. 100, no. 3, 1268–1273, 2003.

CHEN, C. J. et al. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdr1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. **Cell**. 7;47(3):381-9. 1986.

CHEN, M.; WANG, J. Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. **Apoptosis**. 7(4):313-9. 2002.

CHENG, N. et al. Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. **Molecular Cancer Research**. 6, 1521–1533. 2008.

CHILIN, A. Synthesis and antitumor activity of novel amsacrine analogs: the critical role of the acridine moiety in determining their biological activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 17(2):523-9. 2009.

CHO, Y.S. et al. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1–RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. **Cell**. 137: 1112–1123. 2009.

CHU, E.; DEVITA, V.T. Principles of cancer management: chemotherapy. Em: DeVita, V.T.; Hellman, S.; Rosenberg, S.A. (editores). Cancer, principles and practice of oncology. 6th ed. Philadelphia: JB Lippincott Company. p. 289-386. 2001.

CHVÁLOVÁ, K.; BRABEC, V.; KAŠPÁRKOVÁ, J. Mechanism of the formation of DNA–protein cross-links by antitumor cisplatin. **Nucleic Acids Research**. 35(6): 1812–1821. 2007.

CLARKE, A. R. et al. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. **Nature**. 362:849-52. 1993.

COLLINS, S.J.; GALLO, R.C.; GALLAGHER, R.E. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. **Nature**. 270:347-349. 1977.

CORNELISSE, C. J.; DEVILEE, P. Facts in cancer genetics. **Patient Education and Counseling**. 32(1-2):9-17. 1997.

CZENE, K.; HEMMINKI, K. Kidney cancer in the Swedish Family Cancer Database: familial risks and second primary malignancies. **Kidney International**. 61:1806–13. 2002.

DELIA, D. et al. bcl-2 proto-oncogene expression in normal and neoplastic human myeloid cells. **Blood**. 79(5):1291-8. 1992.

DENARDO, D. G.; ANDREU, P.; COUSSENS, L. M. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. **Cancer and Metastasis Reviews**. 29, 309–316. 2010.

DENG, C. et al. Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. **Cell**. 82(4):675-84. 1995.

DEVI, K. et al. An Efficient Approach to the Synthesis of Novel Oxazolidinones as Potential Antimicrobial Agents. **Journal of Chemistry**. Vol 2013. 5 p. 2013.

DOW, R. L. et al. Benzyloxazolidine-2,4-diones as potent hypoglycemic agents. **Journal of Medicinal Chemistry**. 34(5):1538-44. 1991.

DRESSEL, U. et al. The peroxisome proliferator-activated receptor β/δ agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells. **Molecular Endocrinology**. vol. 17, no. 12, pp. 2477–2493, 2003.

ELSTNER, E. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptory and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 95(15); 8806–8811. 1998.

ESKES, R. et al. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. **Molecular and Cellular Biology**. 20:929–935. 2000.

FERON, O. Pyruvate into lactate and back: from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. **Radiotherapy and Oncology**. 92, 329–333. 2009.

FIAUX, H. et al. Functionalized pyrrolidine inhibitors of human type II alpha-mannosidases as anti-cancer agents: optimizing the fit to the active site. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 16(15):7337-46. 2008.

FISCHER, B. et al. Caspase 8-mediated cleavage of the pro-apoptotic BCL-2 family member BID in p53-dependent apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 306(2):516-22. 2003.

FOLEY, G.E. et al. Continuous culture of human lymphoblasts from peripheral blood of a child with acute leukemia. **Cancer**. 18:522-9. 1965.

FRIEDMAN, A. D. GADD153/CHOP, a DNA damage-inducible protein, reduced CAAT/enhancer binding protein activities and increased apoptosis in 32D c13 myeloid cells. **Cancer Research**. 56:3250–3256. 1996.

FUGITT, R. B.; LUCKENBAUGH, R.W. 5-Halomethyl-3-phenyl-2-oxazolidinones. U.S. Patent 4,128,654. 1978.

GALLUZZI, L. et al. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. **Cell Death & Differentiation**. 14(7):1237-43. 2007.

GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death & Differentiation**. 19(1):107-20. 2012.

GARTEL, A. L. Is p21 an oncogene? **Molecular Cancer Therapeutics**. 5:1385–1386. 2006.

GERVOIS, P. et al. Fibrates increase human REV-ERB α expression in liver via a novel peroxisome proliferator-activated receptor response element. **Molecular Endocrinology**, vol. 13, no. 3, pp. 400–409, 1999.

GHOBRAL, I.M.; WITZIG, T.E.; ADJEI, A. A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. 55:178-194. 2005.

GIACINTI, C.; GIORDANO, A. RB and cell cycle progression. **Oncogene**. vol. 25, no. 38, pp. 5220–5227, 2006.

GITLIN, N. et al. Two cases of severe clinical and histologic hepatotoxicity associated with troglitazone. **Annals of Internal Medicine**. 1;129(1):36-8. 1998.

GOLSTEIN, P. Cell death in us and others. **Science**. 281(5381):1283. 1998.

GOLDIE, J. H.; COLDMAN, A. J. A mathematic model for relating the drug sensitivity of tumors to their spontaneous mutation rate. **Cancer Treatment Reports**. 63:1727-31. 1979.

GOSS, P. E. et al. Inhibitors of carbohydrate processing: a new class of anticancer agents. **Clinical Cancer Research**. 1:935-944. 1995.

GOTTESMAN, M. M. How cancer cells evade chemotherapy: Sixteenth Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. **Cancer Research**. 53,747-54. 1993.

GRIPPO, M. C. et al. Establishment and partial characterization of a continuous human malignant glioma cell line: NG97. **Cellular and Molecular Neurobiology**. 21(4):421-8. 2001.

GRIVENNIKOV, S.I.; GRETEN, F.R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**. 140, 883–899. 2010.

GROMMES, C.; LANDRETH, G. E.; HENEKA, M. T. Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists. **The Lancet Oncology**. 5, no. 7, pp. 419–429. 2004.

GROSS, A. et al. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. **Journal of Biological Chemistry**. 274:1156–1163. 1999.

GUERRA, M. R. et al. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**. 51(3):227-234. 2005.

GUO, J. et al. Anticancer effect of tert-butyl-2(4,5-dihydrogen-4,4,5,5-tetramethyl-3-O-1Himidazole-3-cationic-1-oxyl-2)-pyrrolidine-1-carboxylic ester on human hepatoma HepG2 cell line. **Chemico-Biological Interactions**. 199; 38–48. 2012.

HAENSZEL, W.; KURIHARA, M. Studies of Japanese migrants. I. Mortality from cancer and other diseases among Japanese in the United States. **Journal of the National Cancer Institute**. 40:43–68 1968.

HAHN, W. C.; WEINBERG, R. A. Modelling the molecular circuitry of cancer. **Nature Reviews Cancer**. 2:331–41. 2002.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**. 100(1):57-70. 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**. 144:646-674. 2011.

HE, S. et al. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. **Cell**. 137: 1100–1111. 2009.

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**. 407(6805):770-6. 2000.

HICKLIN, D. J.; ELLIS, L. M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. **Journal of Clinical Oncology**. 23:1011-1027. 2005.

HITOMI, J. et al. Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. **Cell**. 135: 1311–1323. 2008.

HODGKINSON, V. C. et al. Biomarkers of chemotherapy resistance in breast cancer identified by proteomics: current status. **Cancer Letters**. 1;294(1):13-24. 2010.

HSU, M. H. et al. A carboxyl-terminal extension of the zinc finger domain contributes to the specificity and polarity of peroxisome proliferator-activated receptor DNA binding. **Journal of Biological Chemistry**. vol. 273, no. 43, pp. 27988– 27997, 1998.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (Brasil). Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço. / Instituto Nacional de Câncer. – 3. ed. rev. atual. ampl. – Rio de Janeiro: INCA, 2008.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2012 : incidência de câncer no Brasil – Rio de Janeiro, RJ. 118 p. 2011.

International Human Genome Sequencing Consortium. **Nature**. 431,931–945. 2004.

JAIN, S. et al. Differential expression of the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and its coactivators steroid receptor coactivator-1 and PPAR binding protein PBP in the brown fat, urinary bladder, colon, and breast of the mouse. **The American Journal of Pathology**. vol. 153, pp. 349–354, 1998.

JEMAL, A. et al. Global Cancer Statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. 61:69–90. 2011.

JULIANO, R. L.; Ling, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. **Biochimica et Biophysica Acta**. 455,152-62. 1976.

KASSAHUN, K. et al. Studies on the metabolism of troglitazone to reactive intermediates *in vitro* and *in vivo*. Evidence for novel biotransformation pathways involving quinone methide formation and thiazolidinedione ring scission. **Chemical Research in Toxicology**. 14(1):62-70. 2001.

KAUFMAN, R. J. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. **Genes & Development**. 15;13(10):1211-33. 1999.

KENNEDY, K. M.; DEWHIRST, M. W. Tumor metabolism of lactate: the influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation. **Future Oncology**. 6, 127–148. 2010.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**. 26, 239–257. 1972.

KEYDAR, I. et al. Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. **European Journal of Cancer**. 15(5):659-70. 1979.

KHODJAKOV, A.; RIEDER, C. L. The nature of cell-cycle checkpoints: facts and fallacies. **Journal of Biology**. 8 (10):88. 2009.

KIM, J. A. et al. Troglitazone activates p21Cip/WAF1 through the ERK pathway in HCT15 human colorectal cancer cells. **Cancer Letters**. vol. 179, no. 2, 185–195, 2002.

KIM, R. et al. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. **Immunology**. 121, 1–14. 2007.

KLIEWER, S. A. et al. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. **Nature**. vol. 358, no. 6389, 771–774, 1992.

KOBATA A. Altered glycosylation of surface glycoproteins in tumor cells and its clinical application. **Pigment Cell Research**. 2, 304–308. 1989.

KOBATA A., AMANO J. Altered glycosylation of proteins produced by malignant cells, and application for the diagnosis and immunotherapy of tumours. *Immunol. Journal of Cell Biology*. 83, 429–439. 2005.

KOLONEL, L. N.; ALTSHULER, D.; HENDERSON, B. E. The multiethnic cohort study: exploring genes, lifestyle and cancer risk. **Nature Reviews Cancer**. 4:519–27. 2004.

KOMBIAN, S. B.; PHILLIPS, O. A. Novel Actions of Oxazolidinones: In vitro Screening of a Triazolyloxazolidinone for Anticonvulsant Activity. **Medical Principles and Practice**. 22(4):340-5. 2013.

KONDO, S. et al. WAF1/CIP1 increases the susceptibility of p53 non-functional malignant glioma cells to cisplatin-induced apoptosis. **Oncogene**. 13:1279-1285. 1996.

KUMAR, V. et al. Patologia - bases Patológicas das doenças. 7ed. Rio de Janeiro, Elsevier; 2005.

LAGE H. An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 65(20):3145-67. 2008.

LEFEBVRE, A. M. et al. Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor γ promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APCMin/+ mice,” **Nature Medicine**. vol. 4, no. 9, pp. 1053–1057, 1998.

LENNON, S. V.; MARTIN, S. J.; COTTER, T. G. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. **Cell Proliferation**. 24(2): 203–214. 1991.

LI, X.; LI, Y.; XU, W. Design, synthesis, and evaluation of novel galloyl pyrrolidine derivatives as potential anti-tumor agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 14(5):1287-93. 2006.

LIMPACHAYAPORN, P. Influence of 4- or 5-substituents on the pyrrolidine ring of 5-[1-(2-methoxymethylpyrrolidinyl)sulfonyl]isatin derivatives on their inhibitory activities towards caspases-3 and -7. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 64:562-78. 2013.

LINCET, H. et al. The p21(cip1/waf1) cyclin-dependent kinase inhibitor enhances the cytotoxic effect of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. **Cancer Letters**. 161:17-26. 2000.

LIOTTA, L. A. et al. Protein microarrays: meeting analytical challenges for clinical applications. **Cancer Cell**. 3(4):317–25. 2003.

LOEB, K. R.; LOEB, L. A. Significance of multiple mutations in cancer. **Carcinogenesis**. 21:379–85. 2000.

LÓPEZ-LÁZARO, M. Anticancer and carcinogenic properties of curcumin: considerations for its clinical development as a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent. **Molecular Nutrition & Food Research**. 52 Suppl 1:S103-27. 2008.

LOWE, S. W. et al. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. **Cell**. 24;74(6):957-67. 1993.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death. **American Journal of Pathology**. 146; 3–15. 1995.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature Reviews Cancer**. 9 (3):153-66. 2009.

MANDARD, S.; MÜLLER, M.; KERSTEN, S. Peroxisome proliferator-activated receptor α target genes. **Cellular and Molecular Life Sciences**. vol. 61, no. 4, pp. 393–416. 2004.

MANGELSDORF, D. J. et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. **Cell**. vol. 83, no. 6, pp. 835–839. 1995.

MANTOVANI, A. et al. Cancer-related inflammation. **Nature**. 454; 436–444. 2008.

MCCULLOUGH, K. D. et al. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. **Molecular and Cellular Biology**. 21: 1249–1259. 2001.

MEANWELL, N. A. Synopsis of some recent tactical application of bioisosteres in drug design. **Journal of Medicinal Chemistry**. 28;54(8):2529-91. 2011.

MICHALIK, L. et al. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. **Pharmacological Reviews**. 58 (4): 726–41. 2006.

MCKEOWN, R. E. The Epidemiologic Transition: Changing Patterns of Mortality and Population Dynamics. **American Journal of Lifestyle Medicine**. 3(1 Suppl): 19S–26S. 2009.

MEHLEN, P.; BREDESEN, D. E. Dependence receptors: from basic research to drug development. **Science Signaling**. 4: mr2. 2011.

MEHTA, R. G. et al. A ligand of peroxisome proliferator-activated receptor γ , retinoids, and prevention of preneoplastic mammary lesions. **Journal of the National Cancer Institute**. 92(5); 418–423. 2000.

MORIWAKI, K.; CHAN, F. K. RIP3: a molecular switch for necrosis and inflammation. **Genes & Development**. 27(15):1640-9. 2013.

MUCCI, L. A. et al. The role of gene-environment interaction in the aetiology of human cancer: examples from cancers of the large bowel, lung and breast. **Journal of Internal Medicine**. 249:477–93. 2001.

MUELLER, E. et al. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR γ . **Molecular Cell**. 1(3); 465–470, 1998.

MURPHY, M. E.; LEU, J. I. J.; GEORGE, D. L. p53 moves to mitochondria. A turn on the path to apoptosis. **Cell Cycle**. 3:836-9. 2004.

NACHMIAS, B; ASHHAB, Y; BEN-YEHUDA, D. The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer. **Seminars in Cancer Biology**. 14(4):231-43. 2004.

NEGRINI, S.; GORGOULIS, V. G.; HALAZONETIS, T. D. Genomic instability - an evolving hallmark of cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. 11, 220–228. 2010.

NEUSCHWANDER-TETRI, B. A. et al. Troglitazone-induced hepatic failure leading to liver transplantation. A case report. **Annals of Internal Medicine**. 1;129(1):38-41. 1998.

NUSSBAUMER, S. et al. Analysis of anticancer drugs: a review. **Talanta**. 85(5):2265-89. 2011.

OCKER, M.; SCHNEIDER-STOCK, R. Histone deacetylase inhibitors: signalling towards p21^{cip1/waf1}. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. 39:1367–1374. 2007.

ONU - United Nations Population Division. World Population Prospects: The 2008 Revision. New York, United Nations. 2007.

OSAWA, E. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands suppress colon carcinogenesis induced by azoxymethane in mice. **Gastroenterology**. 124, no. 2, pp. 361–367. 2003.

OYADOMARI, S.; MORI, M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. **Cell Death & Differentiation**. 11(4):381-9. 2004.

PAE, H. O. et al. Curcumin induces pro-apoptotic endoplasmic reticulum stress in human leukemia HL-60 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 353(4):1040-5. 2007.

PALAKURTHI, S. S. et al. Anticancer effects of thiazolidinediones are independent of peroxisome proliferator-activated receptor γ and mediated by inhibition of translation initiation. **Cancer Research**. 61, no. 16, 6213–6218. 2001.

PANDIT, N.; SINGLA, R. K.; SHRIVASTAVA, B. Current Updates on Oxazolidinone and Its Significance. **International Journal of Medicinal Chemistry**. Vol. 2012. 2012.

PANG, Q.; ANDREASSEN, P. R. Fanconi Anemia Proteins and Endogenous Stresses. **Mutation Research**. 668(1-2): 42–53. 2009.

PATANI, G. A.; LAVOIE, E. J. Bioisosterism: A Rational Approach in Drug Design. **Chemical Reviews**. 19;96(8):3147-3176. 1996.

PAVIA, D. L. et al. Introdução à espectroscopia. Trad. da 4a ed. norte americana. Ed. Cengage Learning. 2011.

PIGHETTI, G. M. et al. Therapeutic treatment of DMBA-induced mammary tumors with PPAR ligands, **Anticancer Research**. 21(2A); 825–830. 2001.

POMMIER, Y.; GOLDWASSER, F. Topoisomerase II inhibitors: the epipodophyllotoxins, acridines, and ellipticines. Em: Chabner, B.A.; Longo, D. L. (editores). Cancer chemotherapy and biotherapy. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 451–75. 2006.

PROSKURYAKOV, S. Y.; KONOPLYANNIKOV, A. G.; GABAI, V. L. Necrosis: a specific form of programmed cell death? **Experimental Cell Research**. 283(1):1-16. 2003.

PULVERTAFT, J. V. Cytology of Burkitt's tumour (african lymphoma). **Lancet**. 1;1(7327):238-40. 1964.

RIORDAN, J. R. Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. **Nature**. 4;316(6031):817-9. 1985.

RONINSON, I. B. Oncogenic functions of tumour suppressor p21Waf1/Cip1/Sdi1: association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. **Cancer Letters**. 179:1–14. 2002.

SAEZ, E. et al. PPAR γ signaling exacerbates mammary gland tumor development. **Genes & Development**. 18, no. 5, 528–540, 2004.

SAITO, R. F. Ativação da via de estresse de retículo endoplasmático como potencial agente sensibilizador da morte celular induzida por cisplatina – estudo experimental. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo. 2009.

SALK, J. J.; FOX, E. J.; LOEB, L. A. Mutational heterogeneity in human cancers: origin and consequences. **Annual review of pathology**. 5, 51–75. 2010.

SANDERSON, B. J.; SHIELD, A. J. Mutagenic damage to mammalian cells by therapeutic alkylating agents. **Mutation Research**. 355(1-2):41-57. 1996.

SAX, J. K. BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. **Nature Cell Biology**. 4(11):842-9. 2002.

SCHNEIDER, U.; SCHWENK, H. U.; BORNKAMM, G. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. **International Journal of Cancer**. 15;19(5):621-6. 1977.

SCHOONJANS, K.; STAELS, B.; AUWERX, J. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. **Journal of Lipid Research**. 37, no. 5, 907–925. 1996.

SEMENZA, G. L. Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate. **Journal of Clinical Investigation**. 118, 3835–3837. 2008.

SHAO, J.; SHENG, H.; DUBOIS, R. N. Peroxisome proliferator-activated receptors modulate K-Ras-mediated transformation of intestinal epithelial cells. **Cancer Research**. 62, no. 11, 3282–3288. 2002.

SHAW, K. J.; BARBACHYN, M. R. The oxazolidinones: past, present, and future. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 1241:48-70. 2011.

SHEWACH, D. S.; KUCHTA, R. D. Introduction to cancer chemotherapeutics. **Chemical Reviews**. 109(7):2859-61. 2009.

SHIELDS, J. D. et al. Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21. **Science**. 328, 749–752. 2010.

SCHUTZE, S.; TCHIKOV, V.; SCHNEIDER-BRACHER, W. Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. 9: 655–662. 2008.

SINGH, A. et al. 3,4-Disubstituted oxazolidin-2-ones as constrained ceramide analogs with anticancer activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 1;19(21):6174-81. 2011.

SKIPPER, H. E.; SIMPSON-HERREN, L. Relationship between tumor stem cell heterogeneity and responsiveness to chemotherapy. Em: DeVita, V. T.; Hellman, S. Rosenberg, S. A. (editores). **Important advances in oncology**. Philadelphia: JB Lippincott Company. p. 63-77. 1985.

SORENSEN, C.M. Bcl-2 family members and disease. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1644(2-3):169-77. 2004.

STEVENS, D. L.; DOTTER, B.; MADARAS-KELLY, K. A review of linezolid: the first oxazolidinone antibiotic. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**. vol. 2, no. 1, pp. 51–59, 2004.

STROOP, C. J. et al. Fucosylated hybrid-type N-glycans on the secreted human epidermal growth factor receptor from swainsonine-treated A431 cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 374:42-51. 2000.

SUH, N. et al. A new ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ), GW7845, inhibits rat mammary carcinogenesis. **Cancer Research**. 59(22); 5671–5673, 1999.

TACHIBANA, K. The Role of PPARs in Cancer. **PPAR Research**. 2008: 102737 2008.

TADESSE, M. et al. Synoxazolidinone C; a bicyclic member of the synoxazolidinone family with antibacterial and anticancer activities. **Tetrahedron Letters**. 52; 1804–1806. 2011.

TAN, N. S. et al. Critical roles of PPAR β/δ in keratinocyte response to inflammation. **Genes & Development**. 15, no. 24, 3263–3277. 2001.

TANAKA, T. et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor δ induces fatty acid β -oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 100, no. 26, 15924–15929. 2003.

TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. 9, 231–241. 2008.

TENG, M. W. et al. Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. **Journal of Leukocyte Biology**. 84(4):988-93. 2008.

THEOCHARIS, S. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ ligands as cell cycle modulators. **Cancer Treatment Reviews**. 30, no. 6, 545–554. 2004.

TENG, M.W. et al. Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. **Journal of Leukocyte Biology**. 84, 988–993. 2008.

ULLAH, M. F. Cancer multidrug resistance (MDR): a major impediment to effective chemotherapy. **Asian Pacific journal of cancer prevention**. 9(1):1-6. 2008.

VAJDIC, C. M.; VAN LEEUWEN, M. T. Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. **International Journal of Cancer**. 125:1747-1754. 2009.

VANDENABEELE, P. et al. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. 11, 700–714. 2010.

WAJANT, H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. **Science**. 296:1635–1636. 2002.

WANG, Y. X. et al. Peroxisome-proliferator-activated receptor δ activates fat metabolism to prevent obesity. **Cell**. 113, no. 2, 159–170. 2003.

WARNY, M. et al. p38 MAP kinase activation by *Clostridium difficile* toxin A mediates monocyte necrosis, IL-8 production, and enteritis. **Journal of Clinical Investigation**. 105, 1147–1156. 2000.

WATERS, W. F. Globalization, socioeconomic restructuring, and community health. **Journal of Community Health**. 26, 2; 79. 2001.

WIENCKE, J. K. Impact of race/ethnicity on molecular pathways in human cancer. **Nature Reviews Cancer**. 4:79–84. 2004.

WINDELSPECHT, M. What is the link between BRCA1 and cancer? Ricochet Science - Ricochet Creative Productions, LLC. Disponível em <http://ricochetscience.com/brca1-cancer/>. Acesso em 31 de maio de 2013. 2013.

WOLF, D.; ROTTER, V. Major deletions in the gene encoding the p53 tumor antigen cause lack of p53 expression in HL-60 cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 82(3): 790–794. 1985.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The Global Burden of Disease: 2004 Update. Geneva: World Health Organization. 2008.

YANG W. L.; FRUCHT, H. Activation of the PPAR pathway induces apoptosis and COX-2 inhibition in HT-29 human colon cancer cells. **Carcinogenesis**. 22, no. 9, 1379–1383. 2001.

YANG, L. et al. TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. **Trends in Immunology**. 31, 220–227. 2010.

ZHANG, D. W. et al. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. **Science**. 325: 332–336. 2009.

ZHOU, C. C. et al. ¹H nuclear magnetic resonance study of oxazolidinone binding to bacterial ribosomes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 46:625–9. 2002.

ZIEGLER, R. G. et al. Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. **Journal of the National Cancer Institute**. 85:1819–27. 1993.

ZINSZNER, H. et al. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. **Genes & Development**. 12:982–995. 1998.

ZOLOTA, V. et al. Expression of the regulatory cell cycle proteins p21, p27, p14, p16, p53, mdm2, and cyclin E in bone marrow biopsies with acute myeloid leukemia. Correlation with patients' survival. **Pathology - Research and Practice**. 203:199-207. 2007.

APÊNDICE A – Depósito de Patente

INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PROTOCOLO GERAL

02/07/2015 019150000139
16:21 REPE

BR 10 2015 016060 7

< Uso exclusivo do INPI >

Espaço reservado para o protocolo Espaço reservado para a etiqueta Espaço reservado para o código QR

INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 1/3
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	Versão: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:
O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. **Depositante (71):**

1.1 Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE

1.2 Qualificação: IFES-INSTITUIÇÃO FEDERAL DE ENSINO SUPERIOR - AUTARQUIA FEDERAL

1.3 CNPJ/CPF: 24134488/0001-08

1.4 Endereço Completo: AV. PROF. MORAES REGO, 1235-CIDADE UNIVERSITÁRIA-RECIFE-PE

1.5 CEP: 50670-901

1.6 Telefone: 81-2126-8958 1.7 Fax: 81-2126-8959

1.8 E-mail: patentes dine.propesq@ufpe.br

☐ continua em folha anexa

2. **Natureza:** ☒ Invenção ☐ Modelo de Utilidade ☐ Certificado de Adição

3. **Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):**

DERIVADOS 2-TIOXO-OXAZOLIDÍNICOS-N-SUBSTITUÍDOS POTENCIALMENTE ÚTEIS NA TERAPIA ANTICÂNCER

☐ continua em folha anexa

4. **Pedido de Divisão: do pedido Nº** XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX **Data de Depósito:** XXXXXXXXXXXX

5. **Prioridade:** ☐ Interna (66) ☐ Unionista (30)

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

Pais ou Organização do depósito	Número do depósito (se disponível)	Data de depósito
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX

☐ continua em folha anexa



INPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA Título do Documento:	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 2/3
	Depósito de Pedido de Patente	Código: FQ001	Versão: 2
Procedimento: DIRPA-PQ006			

6. **Inventor (72):**

☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seus nome(s), neste caso não preencher os campos abaixo.

6.1 Nome: IVAN DA ROCHA PITTA

6.2 Qualificação: DOUTOR

6.3 CPF: 075.127.244-20

6.4 Endereço Completo: AV. BOA VIAGEM, 5554, APT. 202, BOA VIAGEM - RECIFE - PE

6.5 CEP: 51.030-000

6.6 Telefone: 81-8838-1944

6.7 FAX: 81-2126-8959

6.8 E-mail: irpitta@gmail.com

☒ continua em folha anexa

7. **Declaração de divulgação anterior não prejudicial.**

☐

Artigo 12 da LPI – período de graça.

Informe no item 11.13 os documentos anexados, se houver.

8. **Declaração na forma do item 3.2 da Instrução Normativa PR nº 17/2013:**

☐ Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

9. **Procurador (74):**

9.1 Nome: XXX

9.2 CNPJ/CPF: XXXXXXXXXXXXXXXX

9.3 API/OAB: XXXXXXXXXXXXXXXX

9.4 Endereço Completo: XXX

9.5 CEP: XXXXXXXXXXXXXXXX

9.6 Telefone: XXXXXXXXXXXXXXXX

9.7 FAX: XXXXXXXXXXXXXXXX

9.8 E-mail: XXX

☐ continua em folha anexa

10. **Listagem de sequências biológicas.**

Informe nos itens 11.9 ao 11.12 os documentos anexados, se houver.

☐



INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 3/3
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	Versão: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

11. Documentos Anexados:

(Assinale e indique também o número de folhas):

(Deverá ser indicado o número total de somente uma das vias de cada documento).

	Documentos Anexados		folhas
☒	11.1	Guia de Recolhimento da União (GRU).	01
☐	11.2	Procuração.	
☐	11.3	Documentos de Prioridade.	
☐	11.4	Documento de contrato de trabalho.	
☒	11.5	Relatório descritivo.	05
☒	11.6	Reivindicações.	02
☒	11.7	Desenho(s) (se houver). Sugestão de figura a ser publicada com o resumo: nº, _____ por melhor representar a invenção (sujeito à avaliação do INPI).	03
☒	11.8	Resumo.	01
☐	11.9	Listagem de sequências em arquivo eletrônico: _____ nº de CDs ou DVDs (original e cópia).	
☐	11.10	Código de controle alfanumérico no formato de código de barras referente às listagem de sequências.	
☐	11.11	Listagem de sequências em formato impresso.	
☐	11.12	Declaração relativa à Listagem de sequências.	
☒	11.13	Outros (especificar) ANEXO 01 - COINVENTORES; DELEGAÇÃO DE PODERES	04

12. Total de folhas anexadas: 16 **fls.**

13. Declaro, sob as penas da Lei que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Recife, 29 de Junho de 2015.

Local e Data

Assinatura e Carimbo



1 / 3

ANEXO 1

INVENTORES: Continuação do quadro 6. Inventor(72) do Formulário Código FQ001.

(2) Nome: Júlia Furtado Campos

Qualificação: Mestre

RG: 6.407.188

Órgão/UF: SDS/PE

CPF: 010.550.444-00

Endereço: Rua Pessoa de Melo, nº 365, apto. 1701

Bairro/Cidade/UF: Madalena – Recife - PE.

CEP: 50.610-320

Telefone: (81) 9199-0178

(3) Nome: Jamerson Ferreira de Oliveira

Qualificação: Mestre em Ciências Farmacêuticas

RG: 7.387.311

Órgão/UF: SDS/PE

CPF: 083.947.004-54

Endereço: Rua Limoeiro, nº 21

Bairro/Cidade/UF: Peixinhos - Olinda – PE.

CEP: 53.260-490

Telefone: (81) 9919-5014

(4) Nome: Cezar Augusto da Cruz Amorim

Qualificação: Graduado em Química

RG: 6.385.178

Órgão/UF: SDS/PE

CPF: 062.807.944-31

Endereço: Rua Visconde de Itaboraí, nº 399

Bairro/Cidade/UF: Cordeiro - Recife – PE.

CEP: 50.721-370

Telefone: (81) 9166-9698

2 / 3

(5) Nome: Marina Galdino da Rocha Pitta

Qualificação: Doutora em Inovação Terapêutica

RG: 7.328.302

Órgão/UF: SDS/PE

CPF: 060.883.204-94

Endereço: Av. Boa Viagem, nº 5554, apto. 202

Bairro/Cidade/UF: Boa Viagem - Recife – PE.

CEP: 51.030-000

Telefone: (81) 8838-1986

(6) Nome: Moacyr Jesus Barreto de Melo Rego

Qualificação: Doutor em Inovação Terapêutica

RG: 6.619.571

Órgão/UF: SDS/PE

CPF: 051.890.774-03

Endereço: Rua Rodrigues Sete, nº 91, apto. 1101

Bairro/Cidade/UF: Casa Amarela - Recife – PE.

CEP: 52.051-230

Telefone: (81) 8612-4715

(7) Nome: Maira Galdino da Rocha Pitta

Qualificação: Doutora

RG: 6.304.255

Órgão/UF: SSP/PE

CPF: 039.972.064-22

Endereço: Av. Boa Viagem, nº 5554, apto. 202

Bairro/Cidade/UF: Boa Viagem - Recife – PE.

CEP: 51.030-000

Telefone: (81) 9671-7788

(8) Nome: Maria do Carmo Alves de Lima

Qualificação: Doutora

RG: 2.141.596

Órgão/UF: SSP/PE

CPF: 280.819.514-15

Endereço: Rua Beta, nº 55

Bairro/Cidade/UF: Sucupira – Jaboatão dos Guararapes – PE.

CEP: 54.280-550

Telefone: (81) 9162-5837

3 / 3

(9) Nome: Michelly Cristiny Pereira

Qualificação: Doutora

RG: 13.142.881

Órgão/UF: SSP

CPF: 067.369.646-44

Endereço: Rua José Augusto da Silva Braga

Bairro/Cidade/UF: Bairro Novo – Olinda – PE.

CEP: 53.030-080

Telefone: (81) 9827-4256

1/5

**DERIVADOS 2-TIOXO-OXAZOLIDÍNICOS-N-SUBSTITUÍDOS
POTENCIALMENTE ÚTEIS NA TERAPIA ANTICÂNCER**

[001] A Invenção revela compostos derivados oxazolidínicos e seus sais, ésteres, amidas ou pró-fármacos farmacologicamente aceitáveis que venham a ser utilizados na saúde humana e/ou animal com fins de tratamento, profilaxia, paliativa, ou também como diagnóstico para o câncer, do tipo leucemias, linfomas entre outros.

[002] O termo “câncer” é empregado para designar um conjunto de mais de uma centena de diferentes patologias, associadas à proliferação anômala de células em alguma parte do corpo. Uma das principais estratégias para o controle e o combate ao câncer é a quimioterapia – combinação de fármacos anticoplásticos. As oxazolidinonas são bioisosteros das imidazolidinonas que pertencem a um importante grupo de heterocíclicos com grupo carbonil nas posições 2, 4 ou 5 do anel pentamérico (Singh et al. 1981). A primeira oxazolidinona, a ser comercializada foi a Linezolida, aprovada para o tratamento de pacientes com infecções causadas por bactérias Gram-positivas (Barret, 2000 ...). O documento de patente DE602004022170 (EP1648452) usa como componente da mistura um composto contra o câncer, que tem na formulação thioxo-oxazolidin-4-on. O documento de patente WO03050098 (EP1463718) utiliza como componente o composto 5-benzylidene-2-thioxo-oxazolidin. Ambos com formulações distintas dos compostos descritos neste relatório.

[003] A problemática mundial do câncer, associada à ausência de medicamentos específicos efetivamente eficazes e de baixa toxicidade justifica o desenvolvimento de moléculas medicamentosas.

2/5

[004] A invenção descrita neste relatório, compreende compostos derivados 2-tioxo-oxazolidínicos que possam ser usados como alternativas terapêuticas ou como fármacos a serem utilizados como associação com medicamentos já em uso para o tratamento, profilaxia, paliativa ou diagnóstico do câncer em humanos ou animais. Revela compostos derivados oxazolidínicos – LPSF/NBs, com sua caracterização estrutural e físico-química. As características estruturais dos derivados 2-tioxo-oxazolidínicos, descritos neste relatório, apresentam um radical no nitrogênio situado em posição 3 do anel oxazolidínico. O anel 2-tioxo-oxazolidínicos é o núcleo principal responsável pela atividade biológica e a introdução de um substituinte no nitrogênio do anel modifica a densidade de carga de todos átomos/elementos desse anel; inclusive impede a formação da dupla ligação no anel oxazolidínico e por consequência uma atuação no receptor bastante diferenciada.

[005] A figura 1 mostra diagramas de sínteses dos derivados 2-tioxo-oxazolidínicos.

[006] A figura 2 mostra estruturas químicas oxazolidinadionas e seus bioisósteros.

[007] A figura 3 viabilidade celular das linhagens tumorais frente aos compostos LPSF/NBs.

[008] A rota sintética utilizada para a obtenção dos derivados 2-tioxo-oxazolidin-4-ona iniciou-se com uma reação de adição de Michael com éster 2-ciano-acridina-9-il-acrilato de etila e a 2-tioxo-azolidin-4-ona, dissolvidos em álcool etílico absoluto e na presença de morfolina ou piperidina ou trietilamina. Os ésteres de Cope foram obtidos a partir de quantidades equimolares dos aldeídos substituídos e do cianoacetato de etila dissolvidos em tolueno ou

3/5

benzeno, em uma reação de condensação Knoevenagel em meio alcalino (triethylamina ou piperidina ou morfolina). Todos os derivados 2-tioxo-oxazolidínicos obtidos foram purificados através de cristalizações sucessivas em álcool etílico p.a. A figura 1 mostra os compostos obtidos, compreendendo as formulações abaixo:

[009] 5-(4-bromo-benzilideno)-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona

LPSF/NB-2;

[0010] 5-(4-cloro-benzilideno)-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona

LPSF/NB-3;

[0011] 3-etil-5-(4-pirrolidin-1-il-benzilideno)- 2-tioxo-oxazolidin-4-ona

LPSF/NB-4;

[0012] 5-(3,4-bis-benzilóxi-benzilideno)-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona

LPSF/NB-5;

[0013] 3-etil-5-(4-piperidin-1-il-benzilideno)- 2-tioxo-oxazolidin-4-ona

LPSF/NB-6;

[0014] A caracterização estrutural das moléculas da série 2-tioxo-3-etil-oxazolidin-4-ona foi realizada utilizando técnicas espectroscópicas: infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹³C), além da espectrometria de massa. A tabela 1, abaixo, mostra a caracterização estrutural das moléculas da série 2-tioxo-3-etil-oxazolidin-4-ona. A tabela 2 mostra os valores de IC₅₀ (aM) dos compostos LPSF/NB.

[0015] Os compostos revelados nesta invenção incluem também todos os sais, ésteres e amidas farmacologicamente aceitáveis, assim como as pró-drogas dos compostos descritos. O termo "sais" refere-se aos relativamente atóxicos sais obtidos através da adição de ácidos orgânicos ou inorgânicos aos

4/5

compostos da presente invenção. Esses sais podem ser preparados *in situ* durante o isolamento final e purificação dos compostos ou separadamente, reagindo o composto purificado na sua forma de base livre juntamente com um ácido orgânico ou inorgânico, com o posterior isolamento do sal formado. Sais representativos incluem : brometos, cloretos, sulfatos, bissulfatos, nitrato, acetatos, oxalacetatos, valerato, oleato, palmitato, estearato, laureato, borato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartarato, mesilato, glicohexonato, lactobionato e laurilsulfonatos; são incluídos também cátions presentes em bases e os metais alcalinos como sódio, lítio, potássio, cálcio, sais de amônio quaternário, os cátions amônio, tais como amônio, tetrametilamônio, tetraetilamônio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina e trietilamina.

[0016] Esses compostos podem ser administrados por qualquer via de administração, incluindo: via oral, intravenosa, intra-arterial, intracraniano, intratorácica, intraperitoneal, parenteral, ocular, retal, cutânea, sub-cutânea, intradérmica, dérmica, inalatória ou intramuscular.

[0017] Inicialmente foram realizados ensaios de citotoxicidade pelo método MTT (sal de tetrazólio, brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tizolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio) em células humanas saudáveis. Após confirmação da seletividade dos cinco derivados oxazolinídicos sintéticos realizou-se uma avaliação da atividade antitumoral desses compostos. A viabilidade celular das linhagens tumorais frente aos compostos LPSF/NB é mostrada na figura 3.

[0018] Exemplos específicos de tumores que podem ser tratados pelos compostos reivindicados incluem, mas não se limitam, as leucemias, sarcomas, carcinomas e glioblastomas.

5/5

[0019] Tabela 1

Composto	-CH ₂ -	-CH ₃	=CH-	R	R
LPSF/NB-2	3,81	1,20	6,95	7,75 (aromático) 7,81 (aromático)	4-bromo-fenil
LPSF/NB-3	3,81	1,21	6,96	7,61 (aromático) 7,88 (aromático)	4-cloro-fenil
LPSF/NB-4	3,82	1,21	6,82	1,98 (CH ₂ pirrol) 3,34 (CH ₂ pirrol) 6,66 (aromático) 7,72 (aromático)	4-pirrolidinil-fenil
LPSF/NB-5	3,80	1,20	6,88	5,17 (OCH ₂) 5,22 (OCH ₂) 7,23 (aromático) 7,32 (aromático) 7,60 (aromático) 7,41-7,35-7,41 (benzilóxi) 7,46-7,50 (benzilóxi)	3,4-bis-benzilóxi-fenil
LPSF/NB-6	3,81	1,21	6,81	3,38 (piperidina) 1,60 (piperidina) 7,01 (aromático) 7,71 (aromático)	4-piperidinil-fenil

[0020] Tabela 2

	HL60	HL60/MX1	T47D	NG97	Raji	Jurkat	CCRF-CEM
LPSF/NB-2	27,18	>75	>75	55,26	>75	24,18	42,89
LPSF/NB-3	17,84	56,33	>75	>75	>75	32,14	42,84
LPSF/NB-4	21,19	>75	>75	>75	>75	15,19	45,53
LPSF/NB-5	16,44	>75	39,73	36,55	23,86	22,54	28,98
LPSF/NB-6	>75	>75	>75	>75	>75	28,99	>75
Amsacrina	<1	1,3	12,18	2,1	4,15	<1	<1

1/2

REIVINDICAÇÕES

1. **DERIVADOS 2-TIOXO-OXAZOLIDÍNICOS-N-SUBSTITUÍDOS POTENCIALMENTE ÚTEIS NA TERAPIA ANTICÂNCER** são compostos derivados oxazolidínicos e seus sais, ésteres, amidas ou pró-fármacos farmacologicamente aceitáveis que venham a ser utilizados na saúde humana e/ou animal com fins de tratamento, profilaxia, paliativa, ou também como diagnóstico para o câncer, caracterizado por compreender a formula 5-(4-bromo-benzilideno)-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona (LPSF/NB-2);

2. **DERIVADOS 2-TIOXO-OXAZOLIDÍNICOS-N-SUBSTITUÍDOS POTENCIALMENTE ÚTEIS NA TERAPIA ANTICÂNCER** são compostos derivados oxazolidínicos e seus sais, ésteres, amidas ou pró-fármacos farmacologicamente aceitáveis, caracterizado por compreender a formula 5-(4-cloro-benzilideno)-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona (LPSF/NB-3);

3. **DERIVADOS 2-TIOXO-OXAZOLIDÍNICOS-N-SUBSTITUÍDOS POTENCIALMENTE ÚTEIS NA TERAPIA ANTICÂNCER** são compostos derivados oxazolidínicos e seus sais, ésteres, amidas ou pró-fármacos farmacologicamente aceitáveis, caracterizado por compreender a formula 3-etil-5-(4-pirrolidin-1-il-benzilideno)-2-tioxo-oxazolidin-4-ona (LPSF/NB-4);

4. **DERIVADOS 2-TIOXO-OXAZOLIDÍNICOS-N-SUBSTITUÍDOS POTENCIALMENTE ÚTEIS NA TERAPIA ANTICÂNCER** são compostos derivados oxazolidínicos e seus sais, ésteres, amidas ou pró-fármacos farmacologicamente aceitáveis, caracterizado por compreender a formula 5-(3,4-bis-benziloxi-benzilideno)-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona (LPSF/NB-5);

5. **DERIVADOS 2-TIOXO-OXAZOLIDÍNICOS-N-SUBSTITUÍDOS POTENCIALMENTE ÚTEIS NA TERAPIA ANTICÂNCER** são compostos

2/2

derivados oxazolidínicos e seus sais, ésteres, amidas ou pró-fármacos farmacologicamente aceitáveis, caracterizado por compreender a fórmula 3-etil-5-(4-piperidin-1-il-benzilideno)-2-tioxo-oxazolidin-4-ona (LPSF/NB-6).

1/3

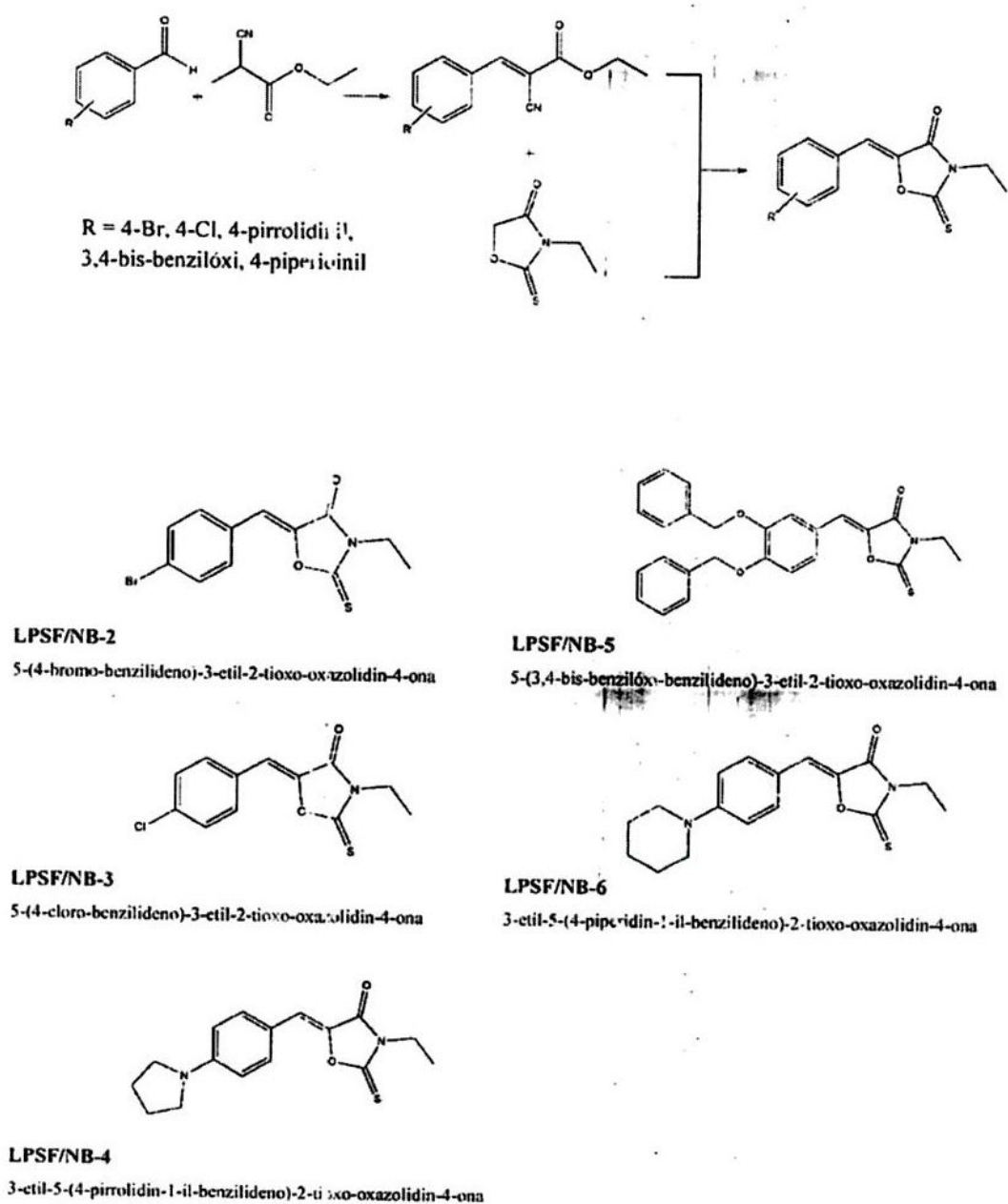


Fig. 1

2/3

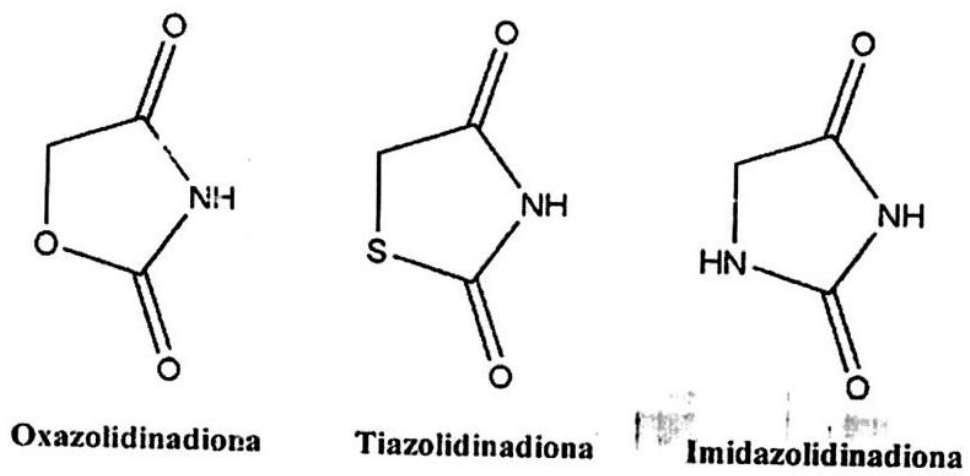


Fig. 2

3/3

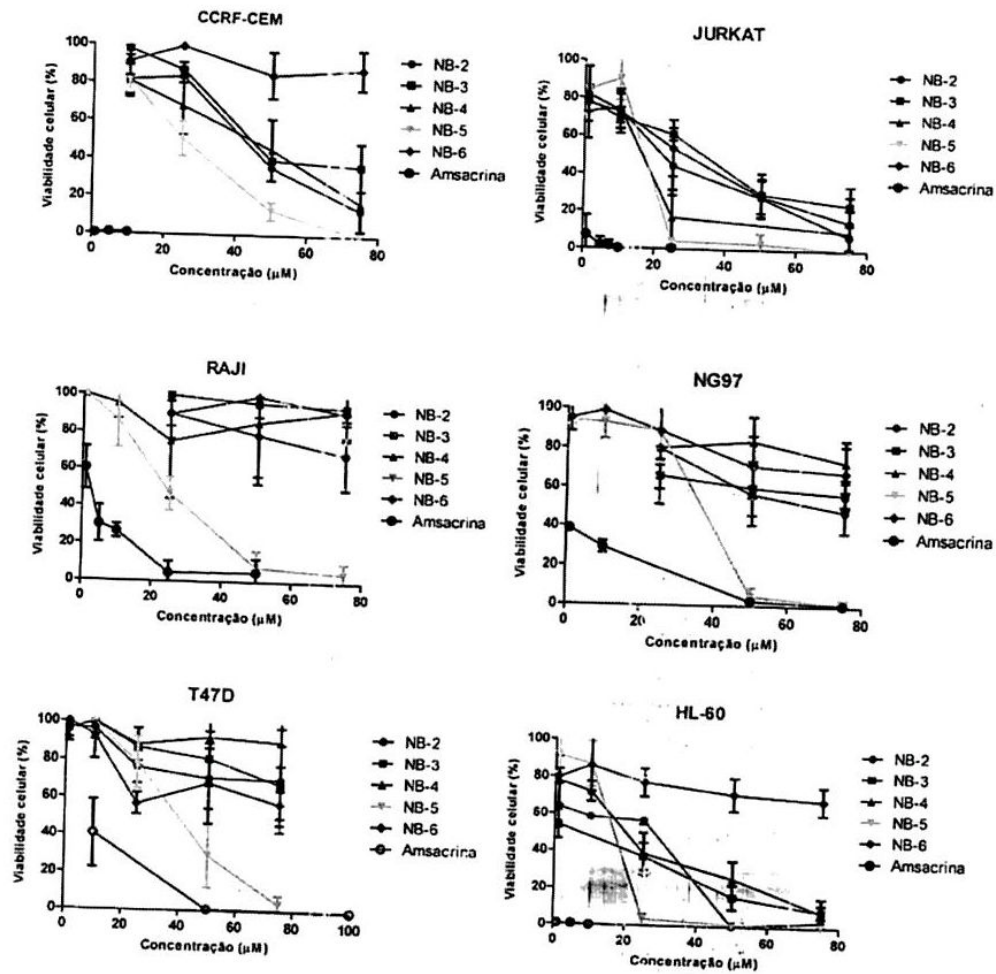


Fig. 3

1/1

RESUMO**DERIVADOS 2-TIOXO-OXAZOLIDÍNICOS-N-SUBSTITUÍDOS****POTENCIALMENTE ÚTEIS NA TERAPIA ANTICÂNCER**

revela compostos derivados oxazolidínicos e seus sais, ésteres, amidas ou pró-fármacos farmacologicamente aceitáveis que venham a ser utilizados na saúde humana e/ou animal com fins de tratamento, profilaxia, paliativa, ou também como diagnóstico para o câncer, do tipo leucemias, entre outros, compreendendo as formulas 5-(4-bromo-benzilideno)-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona (LPSF/NB-2); 5-(4-cloro-benzilideno)-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona (LPSF/NB-3); 3-etil-5-(4-pirrolidin-1-il-benzilideno)-2-tioxo-oxazolidin-4-ona (LPSF/NB-4); 5-(3,4-bis-benziloxi-benzilideno)-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona (LPSF/NB-5); e 3-etil-5-(4-piperidin-1-il-benzilideno)-2-tioxo-oxazolidin-4-ona (LPSF/NB-6).

APÊNDICE B – Artigo Científico

Accepted Manuscript

Title: Synthesis and *in vitro* anticancer activity of new 2-thioxo-oxazolidin-4-one derivatives

Authors: Júlia Furtado Campos, Michelly Cristiny Pereira, Wanessa Layssa Batista de Sena, Caio Gomes de Barros Martins, Jamerson Ferreira De Oliveira, Cezar Augusto da Cruz Amorim, Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo, Marina Galdino da Rocha Pitta, Maria do Carmo Alves de Lima, Maira Galdino da Rocha Pitta, Ivan da Rocha Pitta

PII: S1734-1140(16)30154-2
DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.pharep.2017.03.005>
Reference: PHAREP 676

To appear in:

Received date: 4-9-2016
Revised date: 20-2-2017
Accepted date: 9-3-2017

Please cite this article as: {<http://dx.doi.org/>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.



Synthesis and *in vitro* anticancer activity of new 2-thioxo-oxazolidin-4-one derivatives

Júlia Furtado Campos^{1**}; Michelly Cristiny Pereira^{1**}; Wanessa Layssa Batista de Sena¹, Caio Gomes de Barros Martins; Jamerson Ferreira De Oliveira²; Cezar Augusto da Cruz Amorim²; Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo¹; Marina Galdino da Rocha Pitta²; Maria do Carmo Alves de Lima²; Maira Galdino da Rocha Pitta^{1*}; Ivan da Rocha Pitta^{1,2}

1 – Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), Núcleo de Pesquisa para Inovação Terapêutica Suely Galdino (NUPIT-SG) - Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil

2 – Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF), Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (NUPIT-SG) - Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil

**** Both authors contributed equally to the work.**

*** Corresponding author:**

Prof Ivan da Rocha Pitta: email: irpitta@gmail.com

Fone: 55 81 21268346

Address: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife – PE, Brazil -
CEP: 50670-901

Biographical notes

Júlia Furtado Campos

Technician of Northeast Center of Strategic Technologies (CETENE). Doctorate degree in Therapeutic Innovation (2003) and Master's degree in Genetics and Molecular Biology (2009) at Federal University of Pernambuco (UFPE). Degree in Biological Sciences (2005) at University of Pernambuco (UPE).

Michelly Cristiny Pereira

Professor of Pharmacology Department at Federal University of Pernambuco (UFPE). Postdoctoral researcher at Federal University of Pernambuco (2012-2013). Doctorate degree in Science (2012) at University of São Paulo (USP) and degree in Biological Sciences (2006) at Federal University of Minas Gerais (UFMG).

Wanessa Layssa Batista de Sena

Master's Student in Therapeutic Innovation at Federal University of Pernambuco (UFPE). Degree in Biological Sciences (2015) at Federal University of Pernambuco (UFPE).

Jamerson Ferreira De Oliveira

Postdoctoral researcher at Federal University of Pernambuco (UFPE). Doctorate (2016) and Master's degree (2013) in Pharmaceutical Sciences at Federal University of Pernambuco (UFPE). Degree in Pharmaceutical Sciences (2011) at Federal University of Pernambuco (UFPE).

Cezar Augusto da Cruz Amorim

Master's degree in Pharmaceutical Sciences (2016) at Federal University of Pernambuco (UFPE). Degree in Chemistry (2012) at Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE).

Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Professor of Biochemistry and Physiology Department at Federal University of Pernambuco (UFPE). Doctorate degree in Therapeutic Innovation (2011) and Master's

degree in Biochemistry and Physiology (2009) at Federal University of Pernambuco (UFPE). Degree in Biological Sciences (2006) at University of Pernambuco (UPE).

Marina Galdino da Rocha Pitta

Postdoctoral researcher at Federal University of Pernambuco (2015). Doctorate (2012) and Master's degree (2010) in Therapeutic Innovation at Federal University of Pernambuco (UFPE). Degree in Pharmaceutical Sciences (2008) at Federal University of Pernambuco (UFPE).

Maria do Carmo Alves de Lima

Professor of Biological Sciences Center at Federal University of Pernambuco (UFPE). Doctorate degree in Organic Chemistry and Biochemistry (1995) at Pierre and Marie Curie University (UPMC). Master's degree (1992) and degree (1989) in Pharmaceutical Sciences at Federal University of Pernambuco (UFPE).

Maira Galdino da Rocha Pitta

Professor of Biochemistry and Physiology Department at Federal University of Pernambuco (UFPE). Doctorate degree in Sciences de la Vie et de la Santé (2009) at University of the Mediterranean Aix-Marseille II. Master's degree in Biotechnology of Bioactive Products (2005) and degree in Pharmaceutical Sciences (2003) at Federal University of Pernambuco (UFPE).

Ivan da Rocha Pitta

Coordinator of Research Center in Therapeutic Innovation (NUPIT-SG) at Federal University of Pernambuco (UFPE). Doctorate degree (1973) in Pharmaceutical Sciences at Joseph Fourier University and degree in Pharmaceutical Sciences (1967) at Federal University of Pernambuco (UFPE).

Acknowledgements

We would like to thank the National Institute for Science and Technology in Pharmaceutical Innovation (INCT_if), the National Counsel of Technological and Scientific Development

(CNPq), the Research Foundation of Pernambuco State (FACEPE), and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for student's fellowships.

Synthesis and *in vitro* anticancer activity of new 2-thioxo-oxazolidin-4-one derivatives

ABSTRACT

Background: Oxazolidinones derivatives exhibit different biological properties, including anticancer activity. This work aimed to investigate the anticancer potential of five novel 2-Thioxo-oxazolidin-4-one derivatives. **Methods:** Cytotoxicity assays were performed in human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy individuals and seven tumor cell lines. Apoptosis detection and cell cycle were evaluated by flow cytometry and the expression of genes involved in cell death processes by Real-Time PCR. **Results:** All oxazolidinone derivatives were not cytotoxic in PBMCs. NB-5 showed the best results in cancer cells, inhibiting the growth of all tumor cell lines tested. NB-4 exhibited the highest cytotoxicity in Jurkat cells ($IC_{50} = 15.19 \mu M$) and NB-3 showed better anticancer effects in HL-60 ($17.84 \mu M$). Only NB-4 significantly induced apoptosis in acute leukemia cells ($p=0.001$). All compounds caused a significant increase in expression of pro-apoptotic gene BID ($p<0.05$). NB-3 significantly modulated the expression of RIPK3 ($p=0.02$) and DDIT3 ($p=0.014$), while NB2 induced an increase of CDKN1A ($p=0.03$) and PPAR γ gene ($p=0.0006$). **Conclusion:** NB-5 showed antitumor effects in solid and hematopoietic cancer cells, while other derivatives produced higher activity against hematopoietic cells. In acute leukemia cells, oxazolidinone derivatives modulated the expression of genes involved in apoptosis, ER stress, necroptosis and inflammation.

Keywords: oxazolidinone; cytotoxicity; anticancer activity; cell death

Introduction

Oxazolidinones are a class of azoles, oxazolidines with the carbon between the nitrogen and oxygen oxidized to a ketone [1]. The first oxazolidinones were discovered at E.I. du Pont de Nemours & Company (DuPont), and reported in the patent literature in 1978 [2].

It has been shown that oxazolidinones selectively inhibit bacterial protein synthesis through binding to the 50S ribosomal subunit, preventing the formation of a functional 70S-initiation complex [3,4]. Linezolid, a (S)-N-[[3-(3-fluoro-4-morpholinylphenyl)-2-oxo-5-oxazolidinyl]methyl] acetamide, is the first commercially available oxazolidinone, approved by the Food and Drug Administration (FDA) in 2000 for the treatment of patients with infections caused by Gram-positive bacteria [5,6]. A recent study showed that a novel oxazolidinone FYL-67 inhibited *S. aureus* biofilm formation [7].

Besides antibacterial activity, oxazolidinones are related as antifungal (8), antidiabetic [9,10], anticonvulsant [11] and anticancer [12, 13]. A dibrominated guanidinium-4-oxazolidinone, named Synoxazolidinone C showed antitumoral activity against many human cancer cell lines, including melanoma, breast and colon carcinoma [13]. It has been reported that the oxazolidinone derivatives with ethyl and acryl substitutions had promising anticancer activity and the (4R,5R)-5-ethyl-3-(3-fluoro-4-morpholinophenyl)-4-(4-methoxyphenyl) oxazolidin-2-one induced cell cycle arrest and apoptosis in prostate adenocarcinoma cells by activation of caspases-3 and caspase-9 [14].

Oxazolidinediones also appear to act as peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR γ) agonist. Agrawal et al. [9] synthesized oxazolidinediones as PPAR γ agonists and the 5-{4-[3-(4-cyclohexyl-2-propylphenoxy)propoxy]phenyl}-1,3-

oxazolidine-2,4-dione compound was subjected to metabolism assays *in vitro*, showing that the targets of this oxazolidinedione were P450 cytochrome enzymes. Tanushree Pal [15] also synthesized oxazol-5-ones as partial PPAR γ agonists that exhibited cytotoxicity against breast cancer cells.

A number of investigators have shown that PPAR γ was expressed in a variety of tumor cells, and the activation of this nuclear receptor by ligands led to either inhibition of cell proliferation or induction of apoptosis [16, 17]. PPAR γ ligands are reported to exert antitumorigenic properties *in vitro* and to induce tumor growth arrest or shrinkage in murine *in vivo* models [18-21].

In order to discover as a potential therapeutic class of drugs for the treatment of cancer, our attention was directed toward the identification of other chemical series possessing similar anticancer activity. The chemical reactivity of the oxazolidine ring allows the introduction of many substituents, therefore it can be used as a lead for the development of alternative novel compounds. In the present study, we demonstrate the synthesis of five new 2-Thioxo-oxazolidin-4-one derivatives. The chemical structures of all synthesized compounds were confirmed by IR, ¹H-RMN and MS. These compounds were screened for their *in vitro* cytotoxicity and selectivity against tumor cell lines and human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). To elucidate the molecular mechanism of death induction of some promising compounds, gene expression and cytometric assays were carried out.

Chemistry

General Procedure for Synthesis of 2-cyano-3-phenyl-acrylates ethyl (IP) (3a-e)

In a round bottom flask with magnetic stirring adapted to a condenser, equimolar amounts of the appropriate aldehyde and ethyl cyanoacetate were added in the presence of triethylamine as catalyst and benzene as the solvent. The reaction mixture was heated

under reflux at 110°C for 4 hours. After this time, the product was washed with water, filtered and purified by crystallization with ethanol [22].

General Method for Synthesis of 5-Benzylidene-3-ethyl-2-thioxo-oxazolidin-4-one (NB, 5a-e)

In a round bottom flask with magnetic stirring adapted to a condenser, equimolar amounts of 3-ethyl-2-thioxo-oxazolidin-4-one [4] and 2-cyano-3-phenyl-acrylates ethyl (series/IP/3a-e); [22] dissolved in ethanol were added, in the presence of morpholine as catalyst. The reaction mixture was heated and refluxed at 50°C for 4 hours, leading to the formation of new oxazolidinic derivatives, which were purified by successive washings with distilled water and ethyl alcohol.

Chemical characterization

Reactions were monitored with analytical thin-layer chromatography in silica gel 60 F254 plates and visualized under UV light (254nm). The compounds LPSF/NB, 5a-e were purified by successive crystallizations or flash chromatography in silica gel 60. Melting points were determined on a Quimis 340 capillary melting point apparatus (Quimis, Brazil) and were not corrected. Infrared spectra were recorded as KBr discs using a BRUKER (IFS66) infrared spectrophotometer (Bruker, USA). Nuclear magnetic resonance ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra were recorded in a VMMRS 400 MHz VARIAN spectrometer (VARIAN, USA) using tetramethylsilane (TMS) as the internal standard and DMSO-d₆ as the solvent. Chemical shifts (δ , ppm) were assigned according to the internal standard signal of TMS in DMSO-d₆ (δ , ppm). Coupling constants (J) are reported in Hz. ^1H NMR spectra are reported in the following order: chemical shift, multiplicity, number and type of proton and coupling constant(s). MS were recorded on a MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics, USA).

5-(4-Bromo-benzylidene)-3-ethyl-2-thioxo-1,3-oxazolidin-4-one (LPSF/NB-2, 5a)

Molecular Formula: $C_{12}H_{10}BrNO_2S$; Exact Mass: 310.9616 g/mol; Melting Point: 165-166°C; Yield: 80%; Ratio Front System: 0.54 n-Hexano/AcOEt 9:1. 1H NMR (400 MHz, $[D_6]DMSO$): δ = 1.21 (t, 3H, J = 7.2 Hz, CH_3), 3.81 (q, 2H, J = 7.2 Hz, CH_2), 6.97 (s, 1H, =CH-), 7.61 (d, 2H, J = 8.8 Hz, aromatic), 7.89 (d, 2H, J = 8.8 Hz, aromatic). ^{13}C NMR (400MHz, $[D_6]DMSO$): δ = 11.69 (CH_3), 37.78 (CH_2), 110.96 (=CH-), 129.36 (CH), 129.96 (C4), 132.62 (CH), 135.21 (C4), 139.44 (C=S), 161.50 (C=O), 183.19 (C=O). MS: m/z calculated for $C_{12}H_{10}BrNO_2S$: 310.9616. Found: 311.003.

5-(4-chloro-benzylidene)-3-ethyl-2-thioxo-1,3-oxazolidin-4-one (LPSF/NB-3, 5b)

Molecular Formula: $C_{12}H_{10}ClNO_2S$; Exact Mass: 267.0121 g/mol Melting Point: 146-147°C. Yield: 90%; Ratio Front System: 0.59 n-Hexano/AcOEt 9:1. 1H NMR (400 MHz, $[D_6]DMSO$): δ = 1.21 (t, 3H, J = 7.2 Hz, CH_3), 3.81 (q, 2H, J = 7.2 Hz, CH_2), 6.95 (s, 1H, =CH-) 7.75 (d, 2H, J = 8.8 Hz, aromatic), 7.81 (d, 2H, J = 8.8 Hz, aromatic). ^{13}C NMR (400MHz, $[D_6]DMSO$): δ = 11.69 (CH_3), 37.78 (CH_2), 111.03 (=CH-), 124.20 (C4), 130.26 (C4), 132.29 (CH), 132.77 (CH), 139.51 (C=S), 161.51 (C=O), 183.19 (C=O). MS: m/z calculated for $C_{12}H_{10}ClNO_2S$: 267.0121. Found: 267.056.

3-ethyl-5-(4-pyrrolidin-1-ylbenzylidene)-2-thioxo-1,3-oxazolidin-4-one (LPSF/NB-4, 5c)

Molecular Formula: $C_{16}H_{18}N_2O_2S$; Exact Mass: 302.1089 g/mol; Melting Point: 149-150°C; Yield: 51%; Ratio Front System: 0.49 n-Hexano/AcOEt 9:1. 1H NMR (400 MHz, $[D_6]DMSO$): δ = 1.21 (t, 3H, J = 7.2Hz, CH_3), 1.99-1.97 (m, 4H, pyrrolidinyl), 3.34-3.32 (m, 4H, pyrrolidinyl), 3.82 (q, 2H, J = 7.2Hz, CH_2), 6.66 (d, 2H, J = 8.4 Hz,

aromatic), 6.82 (s, 1H, =CH-), 7.72 (d, 2H, J = 8.4 Hz, aromatic). ^{13}C NMR (400MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 11.65 (CH_3), 24.73 (CH_2), 24.73 (CH_2), 37.35 (CH_2), 47.19 (CH_2), 47.19 (CH_2), 112.07 (CH), 115.44 (CH), 115.44 (CH), 117.34 (C4), 133.37 (CH), 133.37 (CH), 134.96 (C4), 149.20 (C4), 160.96 (C=O), 189.39 (C=O). MS: m/z calculated for $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$: 302.1089. Found: 302.125.

5-(3,4-bis-benzyloxy-benzilidene)-3-ethyl-2-thioxo-oxazolidin-4-one (LPSF/NB-5, 5d)

Molecular formula: $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{NO}_4\text{S}$; Exact Mass: 445.1348 g/mol; Melting Point: 85-86°C; Yield: 85%; Ratio Front System: 0.57 n-Hexano/AcOEt 8:2. ^1H NMR (400 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 1.20 (t, 3H, J = 7.2 Hz, CH_3), 3.80 (q, 2H, J = 7.2 Hz, CH_2), 5.17 (s, 2H, OCH_2), 5.22 (s, 2H, OCH_2), 6.84 (s, 1H, =CH-), 7.23 (d, 1H, J = 8.4 Hz, aromatic), 7.32 (d, 1H, J = 8.4 Hz, aromatic), 7.41-7.35 (m, 5H, benzyloxy), 7.50-7.46 (m, 5H, benzyloxy), 7.60 (s, 1H, benzylidene). ^{13}C NMR (400MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 11.74 (CH_3), 37.66 (CH_2), 69.87 (OCH_2), 70.03 (OCH_2), 113.13 (CH), 114.12 (CH), 116.47 (CH), 123.81 (C4), 125.82 (CH), 127.72 (CH), 127.82 (CH), 127.93 (CH), 127.97 (CH), 128.46 (CH), 136.62 (C4), 136.69 (C4), 137.59 (C4), 147.92 (C4), 150.64 (C4), 161.42 (C4), 183.01 (C=O). MS: m/z calculated for $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{NO}_4\text{S}$: 445.1348. Found: 445.059.

3-ethyl-5-(4-piperidin-1-ylbenzylidene)-2-thioxo-1,3-oxazolidin-4-one (LPSF/NB-6, 5e)

Molecular Formula: $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$; Molecular Weight: 316.1245 g/mol; Melting Point: 152-153°C; Yield: 52%; Ratio Front System: 0.45 n-Hexano/AcOEt 9:1. ^1H NMR (400 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 1.21 (t, 3H, J = 6.8 Hz, CH_3), 1.60 (m, 6H, piperidiny), 3.38 (m, 4H, piperidiny), 3.82 (q, 2H, J = 7.2 Hz, CH_2), 6.82 (s, 1H, =CH-), 7.02 (d, 2H, J = 8.8 Hz, aromatic), 7.72 (d, 2H, J = 8.8 Hz, aromatic). ^{13}C NMR (400MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$):

δ = 11.63 (CH₃), 23.77 (CH₂), 24.77 (CH₂), 37.42 (CH₂), 47.55 (CH₂), 113.91 (CH) , 114.54 (CH), 118.93 (C4), 133.18 (CH), 135.75 (C4), 152.08 (C4), 161.07 (C4), 182.56 (C=O). MS: *m/z* calculated for C₁₇H₂₀N₂O₂S: 316.1245. Found: 316.132.

Biological assays

MTT Assay

The cytotoxicity of the compounds was tested against nine human tumor cell lines: HL-60 (acute promyelocytic leukemia), HL60/MX1 (mitoxantrone-resistant acute promyelocytic leukemia), CCRF-CEM (acute lymphoblastic leukemia), NG97 (glioblastoma), T47-D (mammary ductal adenocarcinoma), Raji (Burkitt's lymphoma) and Jurkat (T-cell leukemia). All cell lines were obtained from Rio de Janeiro Tissue Cell Bank except NG97 cells that were kindly provided by University of São Paulo. Cells were cultured in RPMI-1640 medium, supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine, 100 mg/mL streptomycin and 100 U/mL penicillin at 37°C with 5% CO₂. For experiments, cells were plated in 96-well plates (10⁴ cells/well). After 24 h, the compounds (1 to 75 μM) dissolved in DMSO were added to each well and incubated for 3 days (72 h). Control groups received the same amount of DMSO (0.1%). Amsacrine was used as positive control. Growth of tumor cells was quantified by the ability of living cells to reduce the yellow dye 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) to a blue formazan product. At the end of 72 h incubation, 20 μL of 0.5 mg/mL of MTT 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% 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.

Toxicity in peripheral blood mononuclear cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from heparinized blood from healthy, non-smoking donors who had not taken any drugs for at least 15 days prior to sampling (n=6), and the PBMC were isolated via a standard method of density-gradient centrifugation over Ficoll-Hypaque (GE Healthcare). Cells were counted in a Neubauer chamber, and viability was determined by the trypan blue exclusion method. Cells were only used when viability was >98%. All donors signed an informed consent form and the study was approved by the human research ethics committee of UFPE health sciences center (CEP/CCS/UFPE N° 11006/12). Cells were plated in 96-well plates (10^6 cells/well). After 24h, the compounds (25 to 75 μ M) were added and plates were incubated for 2 days (48h). After this, the procedures were performed as described previously, in MTT assay section.

Cell apoptosis and cell cycle assays

Apoptosis detection and cell cycle analysis assays were performed using Apo-BrdU Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences, San Diego, CA). HL-60 cells (5.5×10^5) were seeded in 12-well plates, incubated overnight and then treated with LPSF/NB-2, LPSF/NB-3, LPSF/NB-4 and LPSF/NB-5 at their respective IC_{50} concentrations (27.18, 17.84, 21.19 and 16.44 μ M, respectively) for 48 hours. Cells treated with Camptothecin (12 μ M) for 4 hours were used as positive control. After incubation, the cells were collected and washed twice with wash buffer and resuspended in 12.5 μ L DNA Labeling Solution (2.5 μ L TdT Reaction Buffer, 0.188 μ L TdT Enzyme, 2 μ L BrdUTP and 8.138 μ L Milli-Q Water) for 1 h at 37 °C. Subsequently, cells were washed twice with rinse buffer, resuspended in 25 μ L of Antibody Solution (1.25 μ L FITC-anti-BrdU mAb and 24.75 μ L rinse buffer) and placed in the dark for 30 min. Then, 125 μ L of

PI/RNase A solution were added and incubated for 15 min at room temperature in the dark. Samples were analyzed by BD Accuri™ C6 flow cytometry (BD Biosciences, San Diego, CA). Experiments were performed in duplicate.

Quantitative Real-Time PCR

Total-RNA from cells was extracted using Trizol® (Life Technologies) according to manufacturer's instructions. Next, cDNA synthesis was obtained from 3-4µg of total RNA using the High Capacity Archive kit (Applied Biosystems). PPARγ (TaqMan Hs01115513_m1), p21 (TaqMan Hs00355782_m1), BID (TaqMan Hs00609632_m1), GADD153 (TaqMan Hs00358796_g1), RIP-3 (TaqMan Hs00819388_m1) and BECN1 (TaqMan Hs01007018_m1) mRNA levels were measured by real time PCR using 18S ribosomal gene (Hs03928990_g1) as reference gene. Real-time PCR reactions were performed on ABIPrism 7900HT sequence detection PCR machine (Applied Biosystem) according to the manufacturer's protocol. The relative gene expression was calculated by $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, considering cells treated with amsacrine as control.

Statistical analysis

All results in this article were analyzed by univariate comparisons using nonparametric tests with $p < 0.05$ considered a significant association. All quantitative data were plotted with GraphPad Prism 5 software. IC₅₀ values and 95% confidence intervals were obtained by nonlinear regression with the OriginPro program (ver. 8.0, OriginLab, Northampton, MA, USA).

Results

Chemistry

The synthetic pathways of LPSE/NB 5a-e can be seen in Figure 1. Initially, compounds 3a-e were prepared from the reaction of aromatic aldehydes [1] with ethyl cyanoacetate [2] in a Knoevenagel Condensation lead to 2-cyano-3-phenyl-acrylic acid ethyl ester (IP) (23). The Michel Addition in position 5 of the 3-ethyl-2-thioxo-oxazolidin-4-one [4] using ethanol in the presence of morpholine lead to the final compounds LPSE/NB, 5a-e. The presence of the arylidene proton peak in the ^1H NMR spectra of the compounds confirmed that the Michael addition reaction was successful. The identity of the compounds was confirmed by mass spectrometry data obtained in positive- or negative-ion mode, and the IR spectra of the compounds showed peaks characteristic of a carbonyl group and an arylidene group ($\text{HC}=\text{}$). The derivative (NB 2-6) was isolated as a single isomer. The presence of the arylidene proton peak in ^1H NMR for the synthesized derivatives 5-benzylidene-3-ethyl-2-thioxo-oxazolidin-4-one (NB) confirmed the completion of the nucleophilic addition reaction.

Figure 1

Biological Evaluation

Toxicity in peripheral blood mononuclear cells

We initially performed *in vitro* cytotoxicity of the oxazolidine-based compounds against non-tumor cells. While amsacrine, the positive control, is quite toxic to normal cells ($\text{IC}_{50}=3.73\mu\text{M}$), the synthesized compounds showed no significant toxicity towards peripheral blood mononuclear cells from healthy individuals ($\text{IC}_{50}>75\mu\text{M}$) (Table 1).

Antineoplastic activity

The series of compounds synthesized were subjected to screening against HL60, HL60/MX1, T47D, NG97, Raji, Jurkat and CCRF-CEM cancer cells to determine their anticancer potential. Some compounds showed typical dose-response curves, including NB-5 in most of cell lines tested and NB-4 in HL-60 and CCRF-CEM cells (Figure 2). Among all tested compounds, NB-5 displayed the best results, inhibiting the growth of all cell lines tested (IC_{50} value of $16.44 \pm 1.67 \mu M$ against HL60; $28.98 \pm 3.9 \mu M$ against CCRF-CEM; $39.73 \pm 9.54 \mu M$ against T47D; $36.55 \pm 3.34 \mu M$ against NG97, $23.86 \pm 2.81 \mu M$ against Raji; $22.54 \pm 6.79 \mu M$ against Jurkat (Table 1).

Modulation of cell cycle and induction of apoptosis by oxazolidinone derivatives

Most of the oxazolidinone derivatives showed efficient antitumor activity in acute leukemia cells (HL60). Therefore we decided to investigate cell death mechanisms of oxazolidinone derivatives in this cell line.

We performed a flow cytometry assay using BRDU/PI staining and we found that LPSF/NB-4 compound strongly induced apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells (HL60) ($60.18\% \pm 3.22$; $p=0.0017$) compared to cells not treated ($2.95\% \pm 0.50$) (Table 2).

We also investigated whether oxazolidinone compounds have effects on cell cycle distribution. In HL60 cells, oxazolidinone derivatives did not alter the cell cycle distribution (Figure 3).

Gene modulation by oxazolidinone derivatives

In order to identify molecular targets modulated by the compounds, we decided to investigate the expression of genes involved in different cell death mechanisms in

HL-60 cells.

BID (BH3 interacting domain death agonist gene), RIPK3 (receptor-interacting serine-threonine kinase 3), DDIT3 (DNA-damage-inducible transcript 3, also known as growth arrest- and DNA damage-inducible gene 153, GADD153), CDKN1A (p21), PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) and BECN1 (beclin) expression were evaluated in HL-60 cells treated with NB-2, NB-3, NB-4 and NB-5 (25 μ M), for 10 hours. Untreated control and positive control (PPAR γ agonist Rosiglitazone) were performed. We also used the standard drug amsacrine at 0.1 μ M (Figure 2). NB-2 compound caused a significant increase in CDKN1A/p21 gene expression in HL-60 cells (1.74-fold, $p=0.03$) compared to untreated (Figure 4a). NB3 induced an increase of GADD153 levels when compared to untreated cells (15.49-fold; $p=0.0147$) and compared to amsacrine (3.56-fold; $p=0.0064$). NB2 also increased GADD153 mRNA levels when compared to amsacrine (3.36-fold; $p=0.0463$) (Figure 4b).

The NB-4 derivative showed significant difference in PPAR γ expression (2.86-fold; $p=0.0072$) compared to untreated cells (Figure 4c). NB4 also induced significantly BID expression compared to untreated cells (39.58-fold, $p=0.0003$). The NB2 and NB5 compounds also increased BID expression in 42.24-fold ($p=0.003$) and 33.86-fold ($p=0.0207$), respectively. NB3 caused an increase of 38.79-fold ($p=0.0008$) (Figure 4d)

Our results showed that NB-3 HL-60 treated cells had higher expression of RIPK3 (5.58-fold; $p=0.0258$) when compared to untreated cells. In relation to amsacrine, NB2 and NB3 treatment induced upregulation of 1.88-fold ($p=0.0463$) and 1.83-fold ($p=0.0165$), respectively.

All compounds induced BECN1 expression when compared to untreated cells. NB2 caused an increase of 20.08-fold, $p=0.0218$; NB3 (18.40-fold, $p=0.0225$), NB4 (12.69-fold, $p=0.0427$) and NB5 (14.5-fold, $p=0.0103$).

Discussion

Comparing the molecular structures of the synthesized compounds, the results indicate that the bis-benzyloxy group of NB-5 was responsible for increasing the anticancer activity of this molecule. Testing potential hypoglycemic agents, Dow et al. [10] verified that benzyloxazolidine-2,4-dione compounds gave enhanced activity. A study with oxazolidine ring derivatives showed activity against HL60 (IC_{50} 4-18 μ M) and MDA-MB231 (IC_{50} 25-37 μ M), a breast cancer cell line, with similar IC_{50} values found in our study [27].

Among the tested compounds, NB-4 showed the highest cytotoxicity to Jurkat cells ($IC_{50} = 15.19 \pm 3.67\mu$ M) and to HL60 cells ($IC_{50} = 21.19 \pm 1.01\mu$ M). This result may be due to the pyrrolidine group in the molecule, which is part of various compounds with anticancer activity, whose mechanism of action is based on inhibition of type II α -mannosidases [28]. Alterations in the glycosylation pattern of cellular glycoproteins are linked to cancer development [29]. NB-2 and NB-3 displayed higher anticancer effects against hematological HL60 and Jurkat cancer cells. NB-6 was cytotoxic only for Jurkat cells ($IC_{50} = 28.99 \pm 7.62\mu$ M). We also evaluated the effects of oxazolidinone derivatives on acute leukemia cells that are cross resistant to etoposide, teniposide and bisantrene (HL60-MX1). However only NB-3 showed reasonable anticancer effect ($IC_{50} = 56.33 \pm 12.11\mu$ M) (Table 1). This result could be interesting, since resistance of cancer cells remains an important impediment to successful chemotherapy.

In relation to modulation of apoptosis by these molecules, probably, anticancer effect of LPSF/NB-4 could be associated with induction of apoptosis via Bid action. Bid is an essential protein during extrinsic apoptosis mediated by death receptors activation. Bid cleavage on the mitochondria causes membrane permeabilization and consequently cytochrome c release by caspase 8 [30-31]. Although NB2, NB3 and NB-5 derivatives increased BID gene expression, they did not induce apoptosis in HL60 cells. These results suggested that these compounds might induce cell death by other mechanisms, including necroptosis and cell death by ER stress.

NB-2 compound caused a significant increase in CDKN1A/p21 gene expression in HL-60 cells. Overexpression of p21 increases the susceptibility to apoptosis induced by anticancer drugs in glioma cell lines and several p53 deficient cell lines [32, 33]. Studies have demonstrated a correlation between the low levels of p21 expression and acute myeloid leukemia patients survival [34] or with tumor stage and lymph node metastasis in laryngeal squamous carcinoma [35]. Many anticancer drugs, such as histone deacetylase inhibitors, function (at least partially) promoting induction of p21 [36]. On the other hand, some studies have shown that p21 can function as an oncogene [37,38]. As this protein participates in pathways involving genomic stability, apoptosis, senescence and DNA repair, therapeutic interventions that alter these pathways should be better studied.

NB3 and NB2 derivatives also increased RIPK3 in HL60 cells. RIPK3 has emerged as a key player in necroptosis and induction of this programmed necrosis is an antitumor strategy to be considered, since many cancers are resistant to apoptosis - the mechanism of action of several chemotherapeutic agents [39]. To date, there is no clear evidence to indicate whether necrosis is beneficial or harmful in cancer [40]. As this death mechanism also promotes inflammation, this effect in the tumor

microenvironment needs to be carefully evaluated [41]. Thus, more studies are needed before this death pathway can be used in the treatment of cancer.

Induction of GADD153 also may represent a new approach in the treatment of cancer and can be used to sensitize tumor cells to the action of other chemotherapeutic agents, functioning as adjuvant therapy. The potential induction of endoplasmic reticulum stress in cancer treatment has been evaluated by several groups [42,43]. Pae et al. [42] demonstrated that curcumin induced apoptosis and caused stress in HL-60 cells, evidenced by GADD153 protein expression.

Only the compound NB-2 showed significant difference in PPAR γ expression. Based on bioisosterism between oxazolidinones and thiazolidines, Agrawal et al. [9] synthesized oxazolidine-based derivatives as PPAR γ agonists, confirming this interaction by analysis of metabolites found in liver microsomes from rats, dogs, monkeys and humans, as well as cytochrome P450 enzymes Recombinant human. This effect of inducing the expression of PPAR γ may be interesting because it adds an anti-inflammatory to anti-cancer effect. Studies indicate that inflammation contributes to the development and spread of tumors [44]. Thus, the search for new chemotherapeutic agents which have this dual effect, anti-tumor and anti-inflammatory, will be of great importance for an effective treatment.

The proapoptotic gene BID expression was also modulated by all oxazolidinones tested compared to cells not treated. HL-60 cell line is very sensitive to various apoptotic stimuli, especially anticancer agents [45, 46], although this cell line expresses Bcl-2 gene [47] but not p53 protein [48]. Sax et al. [49] has demonstrated that BID is transcriptionally regulated by p53 following treatment with adriamycin, 5-fluorouracil and UV-C irradiation. Tumor cells often have mutations in the p53 gene,

inactivating its regulatory function in apoptosis [47]. This lack of apoptosis triggered by p53 can cause chemotherapy resistance [50].

Bonofiglio et al. [51] used breast cancer cell lines, MCF7 (p53 wild type), SKBR3 and T47D (both with mutated p53 and consequently with compromised transcriptional activity) to evaluate the mechanism of apoptosis triggered by ligands of PPAR γ (rosiglitazone) and RXR (acid 9-cis retinoic). The authors observed increased expression of PPAR γ caused by Bid protein, showing that the regulation of Bid occurred independently of p53. Because the HL-60 cell line does not express the p53 protein, our results indicate that Bid expression may have been induced by PPAR γ .

Autophagy plays an important role in cancer-cell survival under extreme circumstances such as metabolic stress [52]. Apoptosis and autophagy can work either antagonistically or cooperatively in response to various anticancer agents to induce cytotoxicity in different cancer cell lines. According to Carew et al. [54], the inhibition of autophagy is unfavorable to cancer cell survival. In contrast, uncontrolled autophagy may cause high expenditure of cellular components leading to cell death [55]. Additionally, excessive autophagy can induce deregulation of lysosomal enzymes and activate caspase-dependent apoptosis [56, 57]. Therefore, the damaging expenditure of metabolic components caused by overactivated autophagy can be target for cancer therapy [58].

Lisiak [53] also showed that HIMOXOL, a synthetic derivative of oleanolic acid (OA), is a promising compound for the treatment of breast cancer due to its ability to induce both autophagy and apoptosis. These responses are mediated by the proapoptotic Bax and autophagic LC3-II and beclin 1 protein expression. Additionally, autophagy is also related to the translocation of p53 to the nucleus and decreases intracellular levels of NF κ B, increasing breast cancer cell death rate.

Autophagy is a complex process that takes several phases to be complete and is regulated by many proteins. Beclin 1 is a protein involved in the formation of the pre-autophagosomal structure (PAS) and mediates vesicle nucleation. This is an important step to the maturation of the autophagolysosome, which will carry autophagic degradation [52, 59]. All oxazolidine derivatives, when compared to untreated cells, upregulated the expression of BECN1 (Beclin 1 gene), suggesting that these derivatives might also be involved in autophagic cell death and its induction of apoptosis.

A simple insult to the cell can trigger molecularly different pathways to cell death such as apoptosis, necroptosis and autophagy. The relationship between these routes is still aim of many scientific studies. Nevertheless, these routes are constantly targeted while developing promising anticancer compounds [60]. Therefore, discovering a drug that is able to converge these pathways and upregulate the genes involved, such as the oxazolidine derivatives, may be a way to overcome the many resistance systems presented by the tumor.

Although we tried to identify some targets of different cell death pathways possibly modulated by oxazolidinones derivatives, it will be necessary to evaluate more genes and proteins of these pathways to better elucidate mechanisms of anti-cancer activity of these compounds.

Five novel oxazolidinic derivatives were synthesized showing in good yields (all above 51%), and their chemistry structures were fully characterized. All compounds have shown to be nontoxic for normal human cells. Oxazolidinone derivatives showed efficient antitumor activity against different tumor cells, modulating the expression of genes involved in apoptosis, ER stress, necroptosis and inflammation. The compounds 3-ethyl-5-(4-pyrrolidin-1-yl-benzylidene)-2-thioxo-oxazolidin-4-one (NB-4) and 5-(3,4-bis-benzyloxy-benzilidene)-3-ethyl-2-thioxo-oxazolidin-4-one (NB-5) showed more

pronounced cytotoxic activity, particularly for leukemia cells and they are promising compounds for *in vivo* and combination therapy studies against cancer.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- [1] Pandit N, Singla R, Shrivastava B. Current updates on oxazolidinone and its significance. *Int J Med Chem* 2012; 159285. doi: 10.1155/2012/159285.
- [2] Robert B. Fugitt, Raymond W. Luckenbaugh. 5-halomethyl-3-phenyl-2-oxazolidinones. U.S. patent 1978; 4 (128): 654.
- [3] Zhou C, Swaney S, Shinabarger D, Stockman B. ¹H nuclear magnetic resonance study of oxazolidinone binding to bacterial ribosomes. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(3): 625-9.
- [4] Stevens D, Dotter B, Madaras-Kelly K. A review of linezolid: the first oxazolidinone antibiotic. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2004; 2: 51–59.
- [5] Barrett J. Linezolid Pharmacia Corp. *Curr Opin Investig Drugs* 2000; 1(2):181-7.
- [6] Shaw K, Barbachyn M. The oxazolidinones: past, present, and future. *Ann N Y Acad Sci.* 2011; 1241:48-70.
- [7] Wu S, Yang T, Luo Y, Li X, Zhang X, Tang J et al. Efficacy of the novel oxazolidinone compound FYL-67 for preventing biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69(11): 3011-9.
- [8] Devi K, Asmat Y, Jain S, Sharma S, Dwivedi J. An Efficient Approach to the Synthesis of Novel Oxazolidinones as Potential Antimicrobial Agents. *J Chem* 2013, v, 2013: 1-5; doi:10.1155/2013/252187
- [9] Agrawal A, Hop C, Pang J, Silva Elipe M, Desai R, Leung K et al. In vitro metabolism of a new oxazolidinedione hypoglycemic agent utilizing liver microsomes and recombinant human cytochrome P450 enzymes. *J Pharm Biomed Anal* 2005; 37(2): 351-8.
- [10] Dow R, Bechle B, Chou T, Clark D, Hulin B, Stevenson R. Benzyloxazolidine-2,4-diones as potent hypoglycemic agents. *J Med Chem.* 1991; 34(5): 1538-44.

- [11] Kombian S, Phillips O. Novel Actions of Oxazolidinones: In vitro Screening of a Triazolyloxazolidinone for Anticonvulsant Activity. *Med Princ Pract* 2013; 22(4): 340-5.
- [12] Singh A, Ha H, Park J, Kim J, Lee W. 3,4-Disubstituted oxazolidin-2-ones as constrained ceramide analogs with anticancer activities. *Bioorg Med Chem* 2011; 19(21): 6174-81.
- [13] Tadesse M, Svenson J, Jaspars M, Strom M, Abdelrahman M, Andersen J, et al. A bicyclic member of the synoxazolidinone family with antibacterial and anticancer activities. *Tetrahedron Lett* 2011; 52: 1804–1806.
- [14] Naresh A, Venkateswara Rao M, Kotapalli S, Ummanni R, Venkateswara Rao B. Oxazolidinone derivatives: cytoxazone-linezolid hybrids induces apoptosis and senescence in DU145 prostate cancer cells. *Eur J Med Chem* 2014; 10;80:295-307.
- [15] Pal T, Joshi H, Ramaa C. Design and development of oxazol-5-ones as potential partial PPAR- γ agonist against cancer cell lines. *Anticancer Agents Med Chem* 2014; 14(6): 872-83.
- [16] Grommes C, Landreth G, Heneka M. Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists. *Lancet Oncol* 2004; 7: 419–429.
- [17] Theocharis S, Margeli A, Vielh P, Kourakli. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ ligands as cell cycle modulators. *Cancer Treat Rev* 2004; 6: 545–554.
- [18] Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P, Evans R, Martin K, Zhang M et al. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR γ . *Mol Cell* 1998; 1(3): 465–470.
- [19] Elstner E, Müller C, Koshizuka K, Williamson E, Park D, Asou H, et al. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptory and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(15): 8806–8811.
- [20] Pighetti G, Novosad W, Nicholson C, Hitt D, Hansens C, Hollingsworth A, et al. Therapeutic treatment of DMBA-induced mammary tumors with PPAR ligands. *Anticancer Res* 2001; 21(2A): 825-9.
- [21] Suh N, Wang Y, Williams C, Risingsong R, Gilmer T, Willson T, et al. A new ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ), GW7845, inhibits rat mammary carcinogenesis. *Cancer Res* 1999; 59(22): 5671–5673.

- [22] Barros F, Silva T, Pitta M, Bezerra D, Costa-Lotufo L, de Moraes M, et al. Synthesis and cytotoxic activity of new acridine-thiazolidine derivatives. *Bioorg Med Chem* 2012; 1; 20 (11):3533-9.
- [23] Mourão R, Silva T, Soares A, Vieira E, Santos J, Lima M, et al. Synthesis and Biological Activity of Novel Acridinylidene and Benzylidene thiazolidinediones. *Eur J of Med Chem* 2005; 40: 1129-1133.
- [24] Tan Sau-F, Ang K, Fong Y. (Z)- and (E)-5-arylmethylenehydantoins: spectroscopic properties and configuration assignment. *J Chem Soc, Perkin Trans. 2* 1996; 12: 1941-1944.
- [25] De Simone C, Zukerman-Schpector J, Pereira M, Luu-Duc C, Pitta I, Galdino S, et al. 3-(4-Bromobenzyl)-5-(4-fluorobenzylidene)-imidazolidine-2,4-dione. *Acta Crystallogr C Struct Chem* 1995; 2620–2621.
- [26] Karolak-Wojciechowska J, Szymanska E, Mrozek A, Kiec-Kononowicz K. Crystallographic and spectroscopic studies of 5-arylidene-2-amino-imidazol-4-ones. *J Mol Struct* 2009; 930: 126–134.
- [27] Andrad S, Campos E, Teixeira C, Bandeira C, Lavorato S, Romeiro N, et al. Synthesis of novel 2,3,4-trisubstituted-oxazolidine derivatives and in vitro cytotoxic evaluation. *Med Chem* 2014; 10(6): 609-18.
- [28] Fiaux H, Kuntz DA, Hoffman D, Janzer RC, Gerber-Lemaire S, Rose DR, et al. Functionalized pyrrolidine inhibitors of human type II alpha-mannosidases as anti-cancer agents: optimizing the fit to the active site. *Bioorg Med Chem.* 2008 Aug 1;16(15):7337-46.
- [29] Brooks S, Carter T, Royle L, Harvey D, Fry S, Kinch C, et al. Altered glycosylation of proteins in cancer: what is the potential for new anti-tumour strategies. *Anticancer Agents Med Chem* 2008; 8(1): 2-21.
- [30] Schug Z, Gonzalvez F, Houtkooper R, Vaz F, Gottlieb E. BID is cleaved by caspase-8 within a native complex on the mitochondrial membrane. *Cell Death Differ* 2011; 18(3): 538-48.
- [31] Garcia-Perez C, Roy S, Naghdi S, Lin X, Davies E, Hajnóczky G. Bid-induced mitochondrial membrane permeabilization waves propagated by local reactive oxygen species (ROS) signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 201; 109(12): 4497-502.

- [32] Kondo S, Barna B, Kondo Y, Tanaka Y, Casey G, Liu J, et al. WAF1/CIP1 increases the susceptibility of p53 non-functional malignant glioma cells to cisplatin-induced apoptosis. *Oncogene* 1996; 13(6): 1279-85.
- [33] Lincet H, Poulain L, Remy J, Deslandes E, Duigou F, Gauduchon P, et al. The p21(cip1/waf1) cyclin-dependent kinase inhibitor enhances the cytotoxic effect of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Lett* 2000; 161(1): 17-26.
- [34] Zolota V, Sirinian C, Melachrinou M, Symeonidis A, Bonikos D. Expression of the regulatory cell cycle proteins p21, p27, p14, p16, p53, mdm2, and cyclin E in bone marrow biopsies with acute myeloid leukemia: Correlation with patients' survival. *Pathol Res Pract* 2007; 203(4): 199-207.
- [35] Huang Y, Li Z, Zhong Q, Li G, Zhang Y, Huang Z. Association of TBX2 and P21 expression with clinicopathological features and survival of laryngeal squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Med* 2014; 7(12): 5394-402.
- [36] Ocker M, Schneider-Stock R. Histone deacetylase inhibitors: signalling towards p21cip1/waf1. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39(7-8): 1367-74.
- [37] Roninson I. Oncogenic functions of tumour suppressor p21 (Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. *Cancer Lett* 2002; 179(1): 1-14.
- [38] Gartel A. Is p21 an oncogene? *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 1385–1386.
- [39] Mandal P, Berger S, Pillay S, Moriwaki K, Huang C, Guo H, et al. RIP3 induces apoptosis independent of pronecrotic kinase activity. *Mol Cell* 2014; 56(4): 481-95.
- [40] Moriwaki K, Chan F. RIP3: a molecular switch for necrosis and inflammation. *Genes Dev* 2013; 27(15): 1640-9.
- [41] Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008; 454(7203): 436-44.
- [42] Pae H, Jeong S, Jeong G, Kim K, Kim H, Kim S, et al. Curcumin induces pro-apoptotic endoplasmic reticulum stress in human leukemia HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 353(4): 1040-5.
- [43] Farooqi A, Li K, Fayyaz S, Chang Y, Ismail M, Liaw C, et al. Anticancer drugs for the modulation of endoplasmic reticulum stress and oxidative stress. *Tumour Biol* 2015; 36(8): 5743-52.
- [44] Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646-674.

- [45] Lennon S, Martin S, Cotter T. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif* 1991; 24(2): 203–214.
- [46] Bertrand R, Solary E, Jenkins J, Pommier Y. Apoptosis and its modulation in human promyelocytic HL-60 cells treated with DNA topoisomerase I and II inhibitors. *Exp Cell Res* 1993; 207(2): 388-97.
- [47] Delia D, Aiello A, Soligo D, Fontanella E, Melani C, Pezzella F, et al. bcl-2 proto-oncogene expression in normal and neoplastic human myeloid cells *Blood* 1992; 79(5): 1291-8.
- [48] Wolf D, Rotter V. Major deletions in the gene encoding the p53 tumor antigen cause lack of p53 expression in HL-60 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82(3): 790–794.
- [49] Sax J, Fei P, Murphy M, Bernhard E, Korsmeyer S, El-Deiry W. BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nat Cell Biol* 2002; 4(11): 842-9.
- [50] Marin J, Briz O, Monte M, Blazquez A, Macias R. Genetic variants in genes involved in mechanisms of chemoresistance to anticancer drugs. *Curr Cancer Drug Targets* 2012; 12(4): 402-38
- [51] Bonofiglio D, Cione E, Vizza D, Perri M, Pingitore A, Qi H, et al. Bid as a potential target of apoptotic effects exerted by low doses of PPAR γ and RXR ligands in breast cancer cells. *Cell Cycle* 2011; 10(14): 2344-54.
- [52] Janku F, McConkey D, Hong D, Kurzrock R. Autophagy as a target for anticancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 8: 528–539.
- [53] Lisiak N, Paszel-Jaworska A, Bednarczyk-Cwynar B, Zaprutko L, Kaczmarek M, Rybczyńska M. Methyl 3-hydroxyimino-11-oxoolean-12-en-28-oate (HIMOXOL), a synthetic oleanolic acid derivative, induces both apoptosis and autophagy in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Chem Biol Interact* 2014; 208:47-57
- [54] Carew J, Medina E, Esquivel-II J, Mahalingam D, Swords R, Kelly K, et al. Autophagy inhibition enhances vorinostat-induced apoptosis via ubiquitinated protein accumulation. *J Cell Mol Med* 2010; 14(10): 2448-2459
- [55] Tormo D, Checińska A, Alonso-Curbelo D, Pérez-Guijarro E, Cañón E, Riveiro-Falkenbach E, et al. Targeted activation of innate immunity for therapeutic induction of autophagy and apoptosis in melanoma cells. *Cancer Cell* 2009; 16: 103–114.

- [56] Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon H, Kimchi A. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ* 2009; 16: 966–975.
- [57] Maiuri M, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 741–752.
- [58] Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, Thompson CB. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 2005; 120: 237–248.
- [59] Kang R, Zeh H, Lotze M, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ* 2011; 18(4): 571–580.
- [60] Lalaoui N, Lindqvist LM, Sadow JJ, Ekert PG. The molecular relationships between apoptosis, autophagy and necroptosis. *Semin Cell Dev Biol*. 2015; 39: 63-69.

Figure 1. Scheme of oxazolidinone synthetic pathway.

Figure 2. Dose-response curves from new synthesized 2-thioxo-oxazolidin-4-one derivatives against (a) CCRF-CEM, (b) Jurkat, (c) Raji, (d) NG97, (e) T47D and (f) HL-60 cancer cell lines.

Figure 3. Effect of new synthesized 2-thioxo-oxazolidin-4-one derivatives (LPSF/NBs) derivatives on cell cycle-phase distribution in HL60 cells.

Figure 4. Effect of new synthesized 2-thioxo-oxazolidin-4-one derivatives (LPSF/NBs) in p21 (a), GADD153 (b), PPAR γ (c), BID (d), RIPK3 (e) and BECN1 (f) gene expression in HL-60 tumor cell line. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

Table 1. IC₅₀ values (μM) of synthesized 2-thioxo-oxazolidin-4-one derivatives in tumor cells and PBMC. * All experiments were performed in triplicate and were repeated at least three times. The standard deviation of less than 10%.

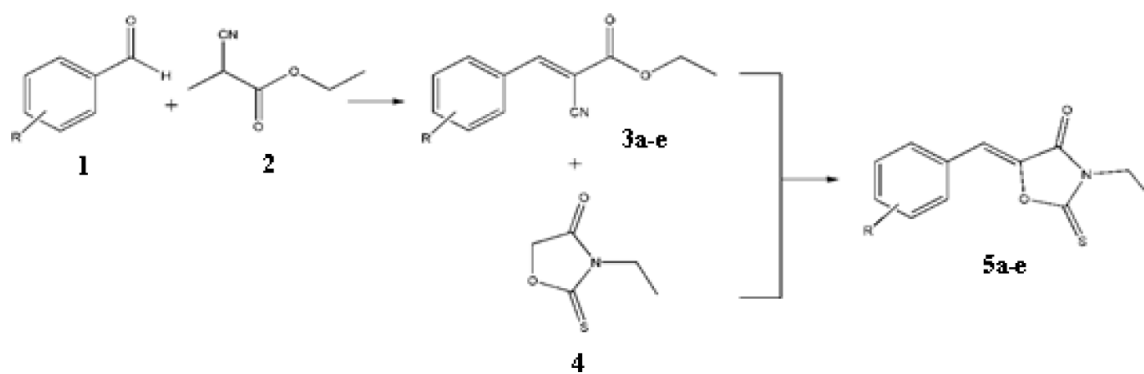
^a Amsacrine was used as a positive control.

Compounds	HL60	HL60/ MX1	CCRF- CEM	T47D	NG97	Raji	Jurkat	PBMC
NB-2	27.18	>75	42.89	>75	55.26	>75	24.18	>75
NB-3	17.84	56.33	42.84	>75	>75	>75	32.14	>75
NB-4	21.19	>75	45.53	>75	>75	>75	15.19	>75
NB-5	16.44	>75	28.98	39.73	36.55	23.86	22.54	>75
NB-6	>75	>75	>75	>75	>75	>75	28.99	>75
Amsacrine ^a	<1	1.3	<1	12.18	2.1	4.15	<1	3.73

Table 2. Effect of synthesized 2-thioxo-oxazolidin-4-one derivatives in apoptosis. HL60 cells were incubated with BRDU-FITC after oxazolidinones treatment during 48 hours.

% apoptotic cells	
Cells not treated	2.95 ± 0.71
LPSE/NB-2	2.2 ± 2.69
LPSE/NB-3	2.22 ± 1.45
LPSE/NB-4	60.18 ± 3.22
LPSE/NB-5	2.55 ± 0.35

Figure 1



Compound	R
NB-2 (5a)	4-bromo
NB-3 (5b)	4-chloro
NB-4 (5c)	4-pyrrolidine
NB-5 (5d)	3,4-bis-benzyloxy
NB-6 (5e)	4-piperidine

Figure 2

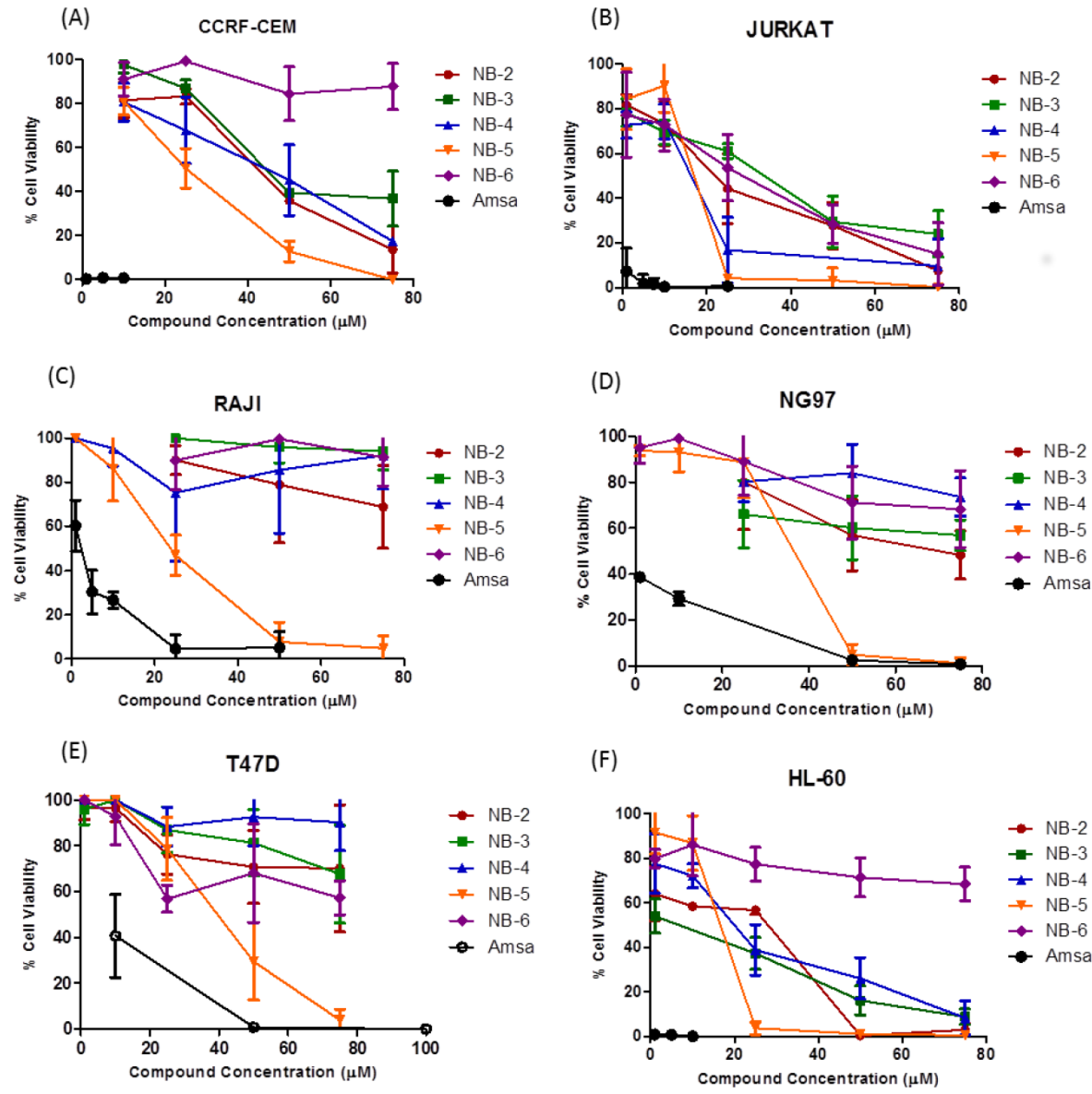


Figure 3

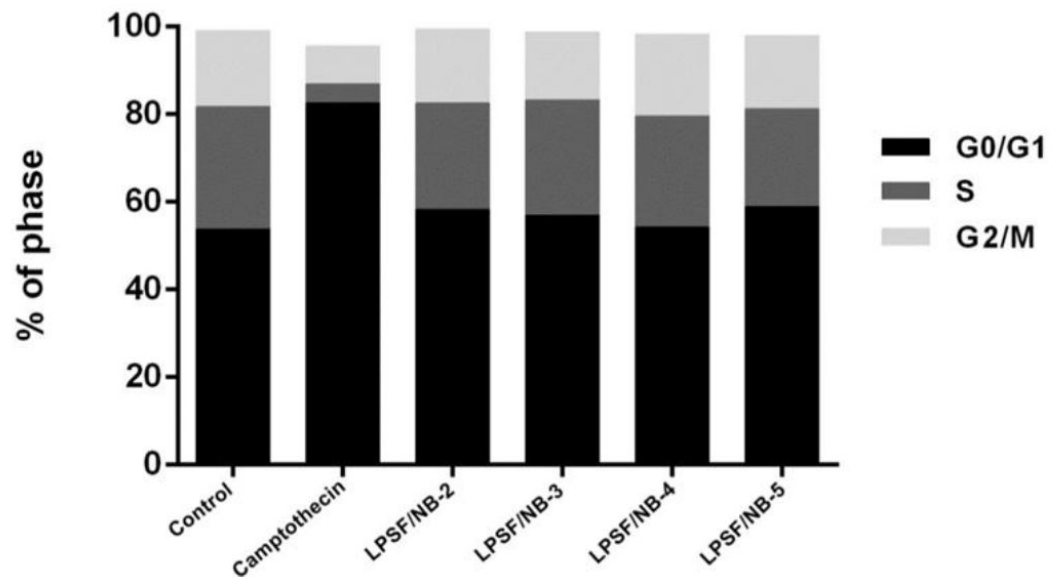
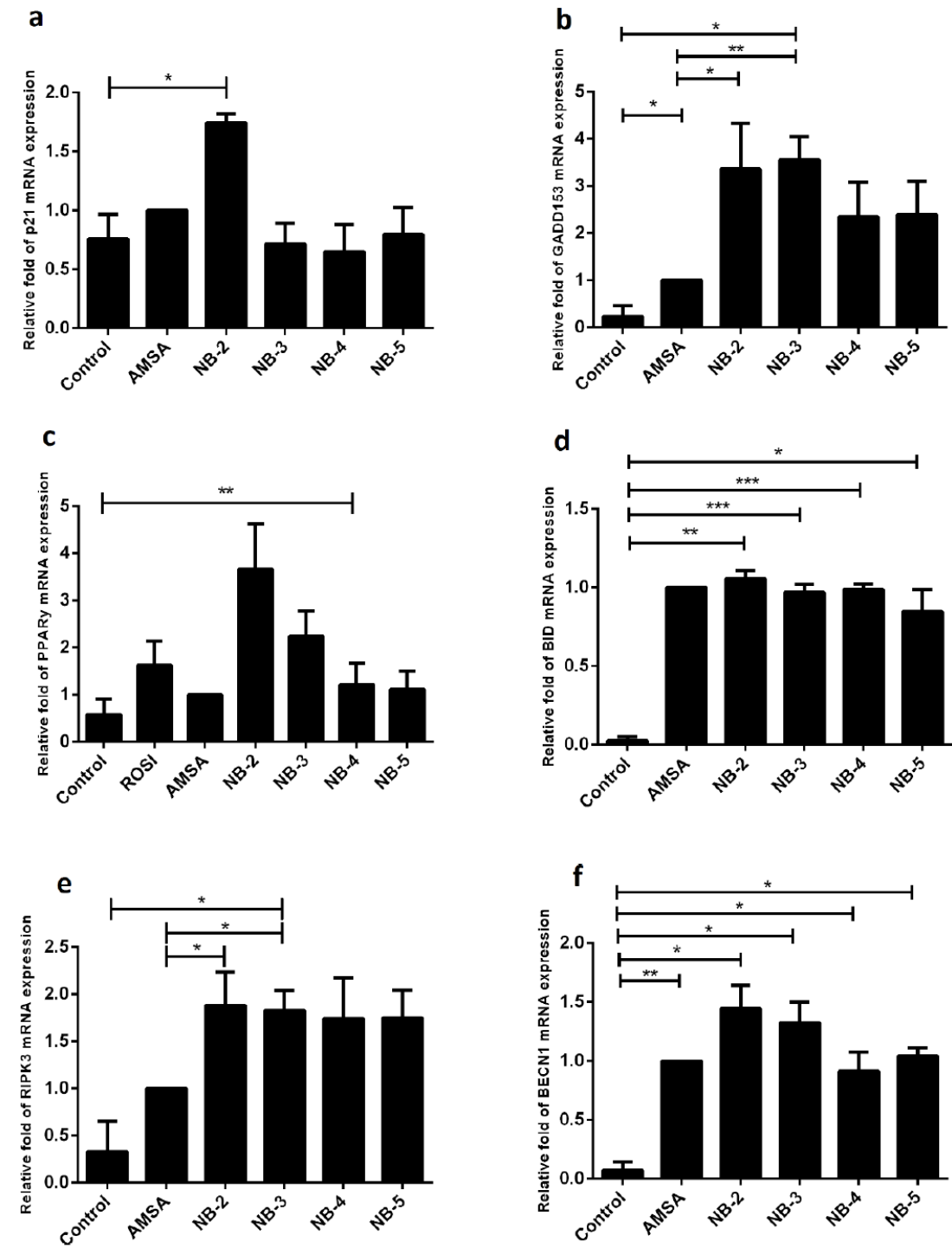
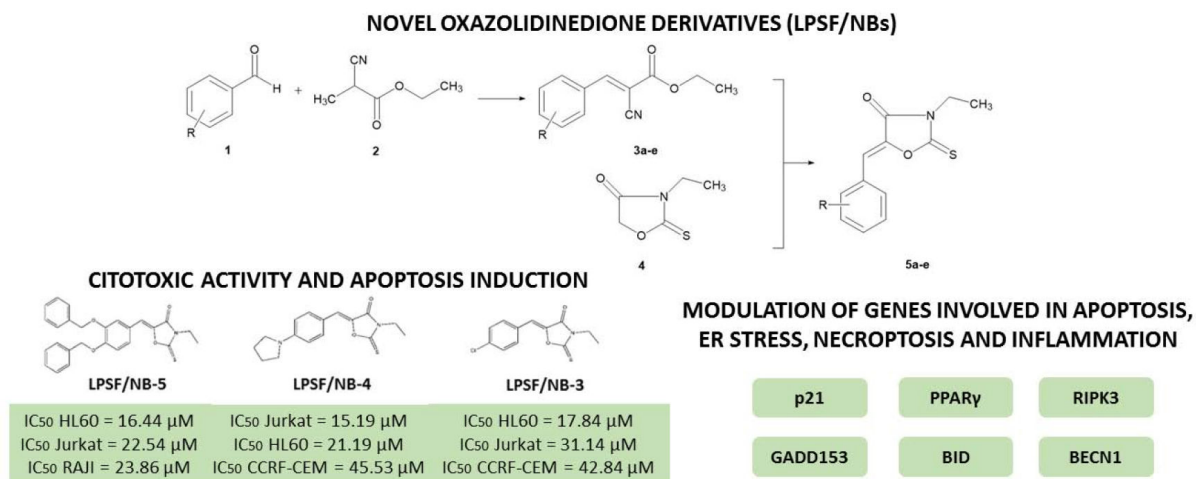


Figure 4



Graphical abstract



APÊNDICE C – Espectros RMN ^1H , IV e MS

5-(4-bromo-benzilideno)-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona - LPSF/NB-2

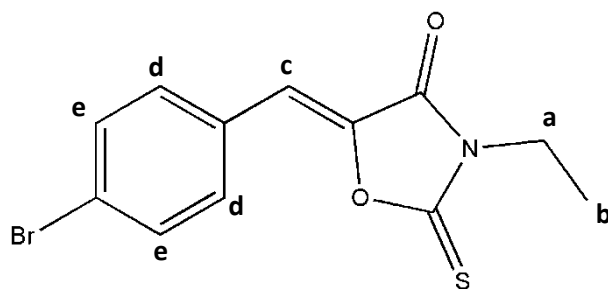


Figura 20. Espectro RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400MHz) – LPSF/NB-2.

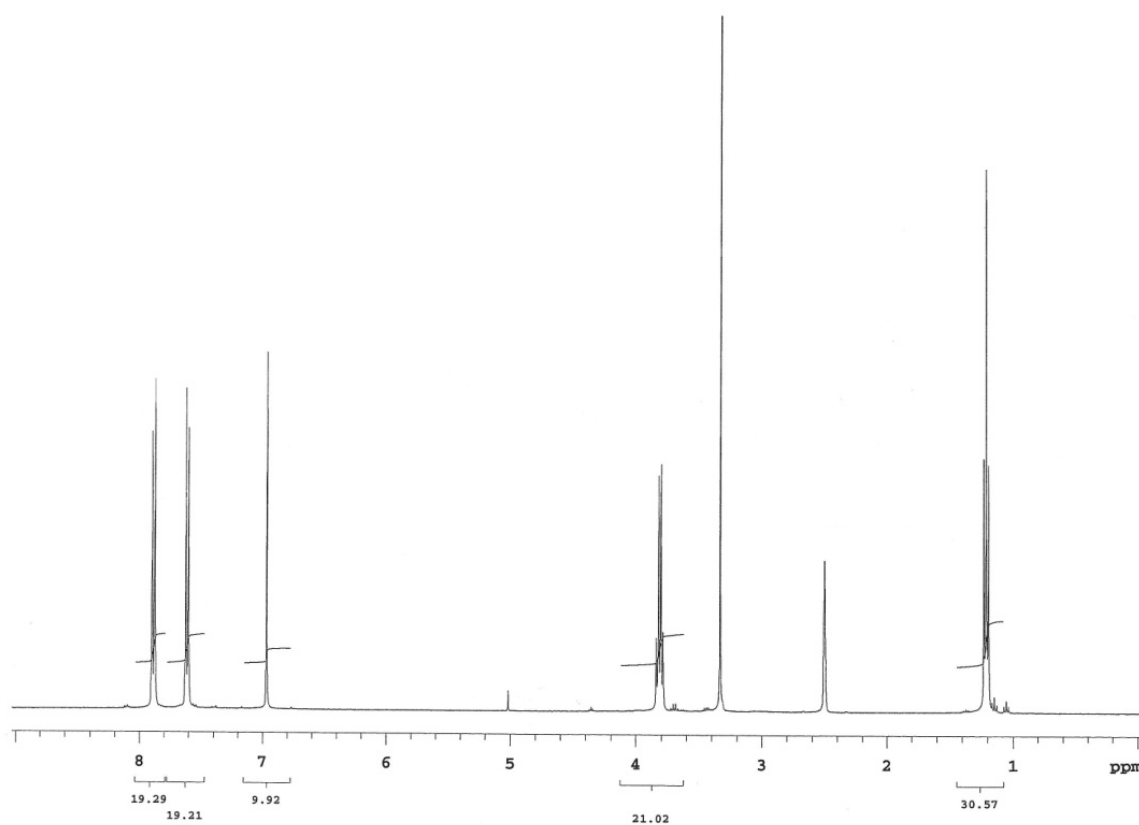
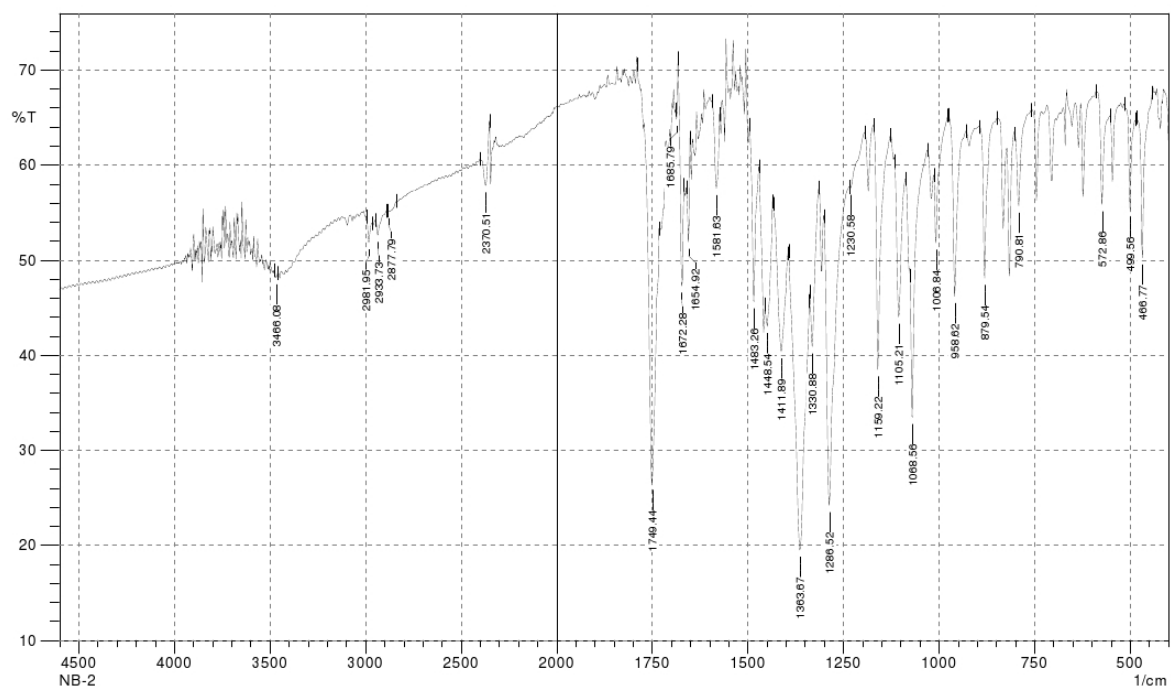
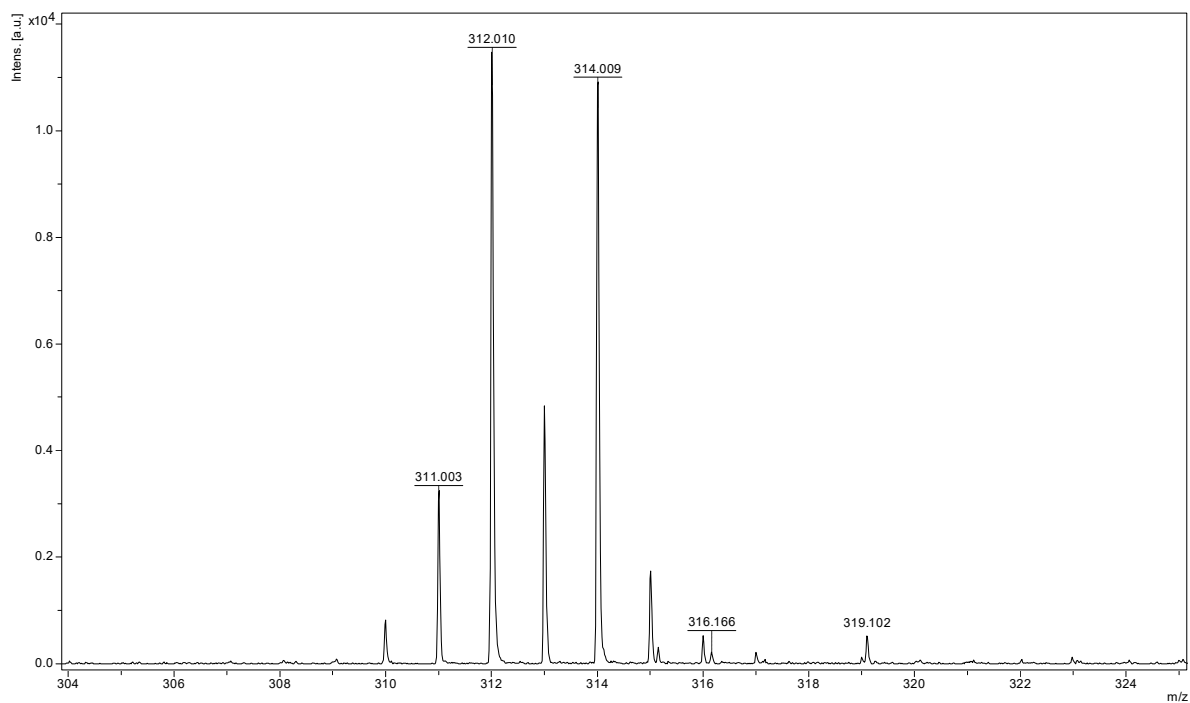


Figura 21. Espectro IV (KBr, cm^{-1}) – LPSF/NB-2.**Figura 22.** Espectro MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ – LPSF/NB-2.

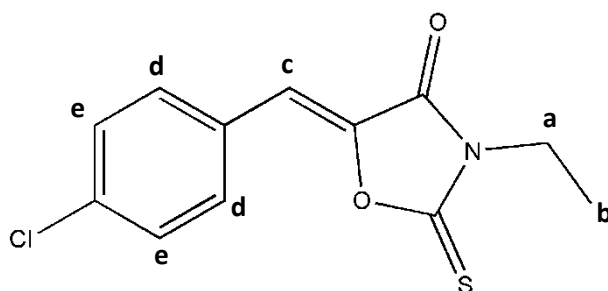
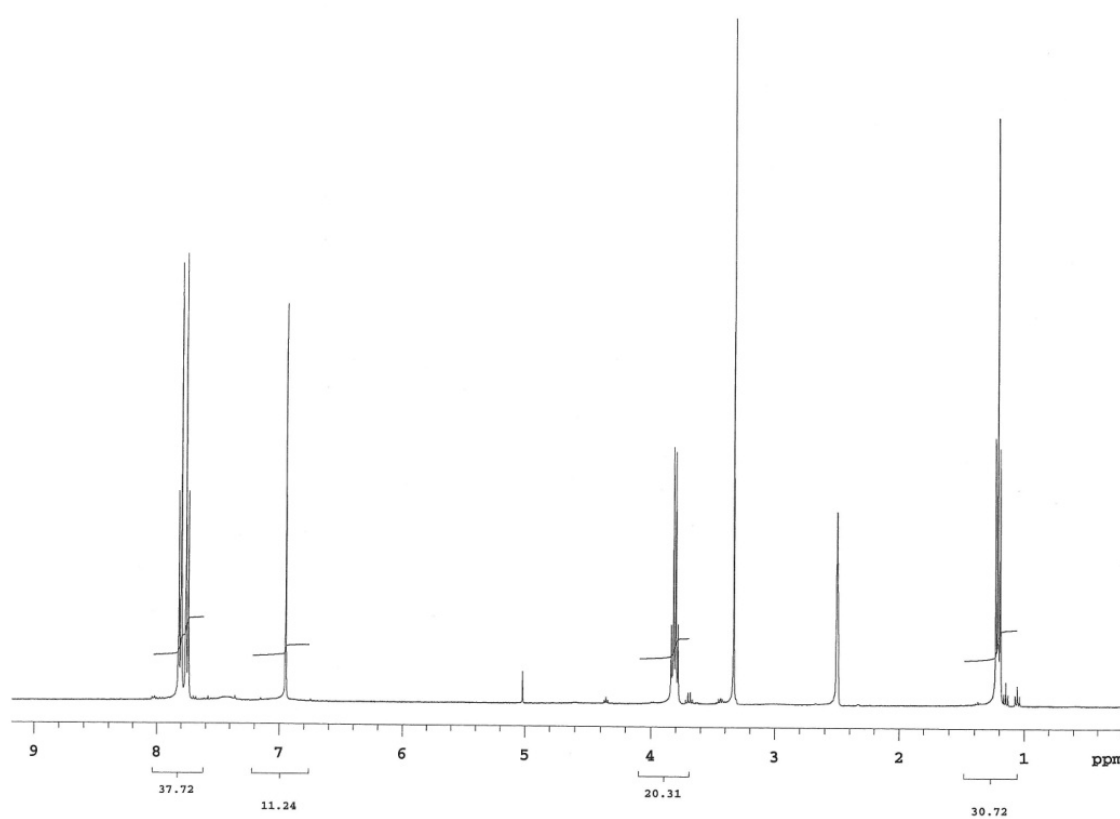
5-(4-cloro-benzilideno)-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona - LPSF/NB-3**Figura 23.** Espectro RMN ^1H (DMSO-d_6 , 400MHz) – LPSF/NB-3.

Figura 24. Espectro IV (KBr, cm^{-1}) – LPSF/NB-3.

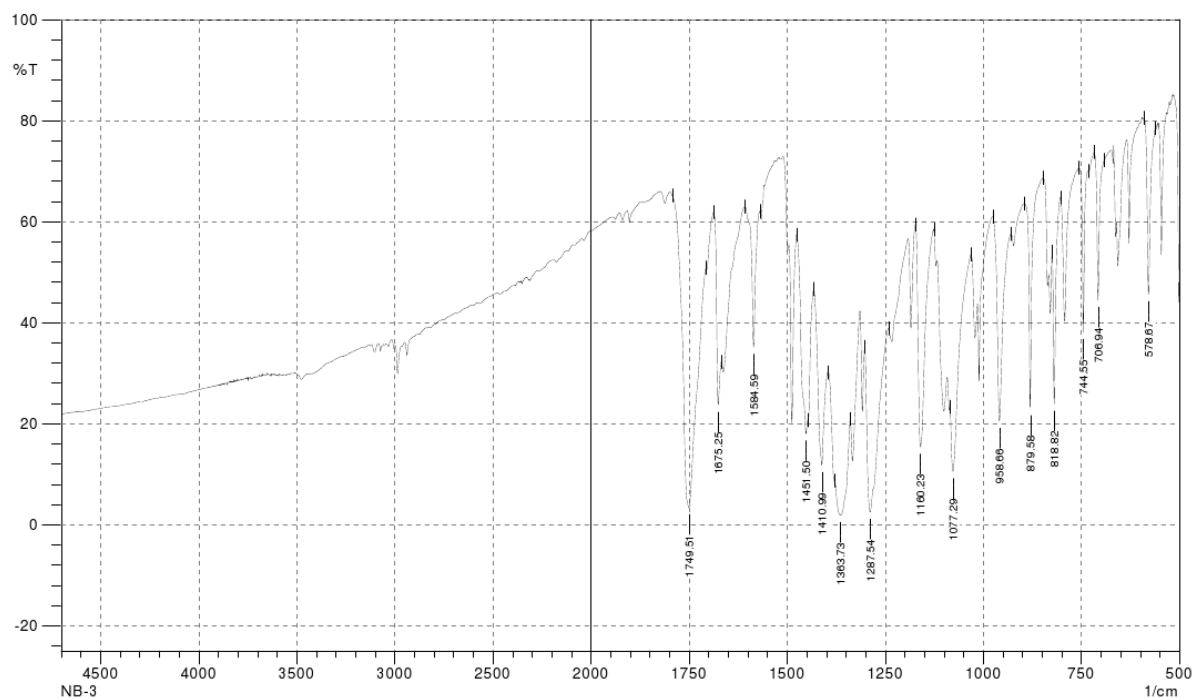
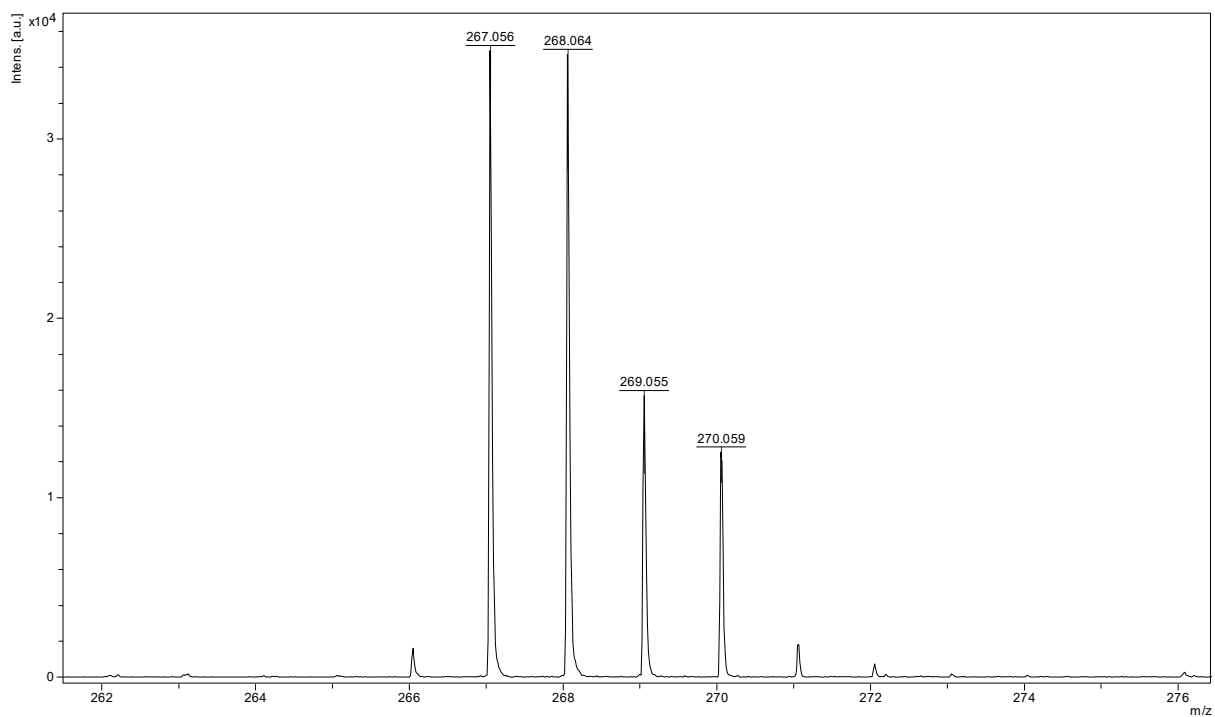


Figura 25. Espectro MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ – LPSF/NB-3.



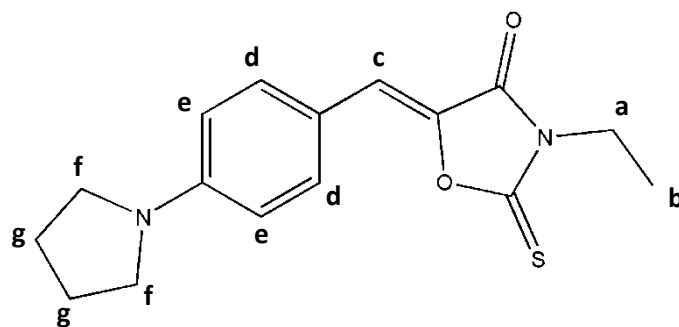
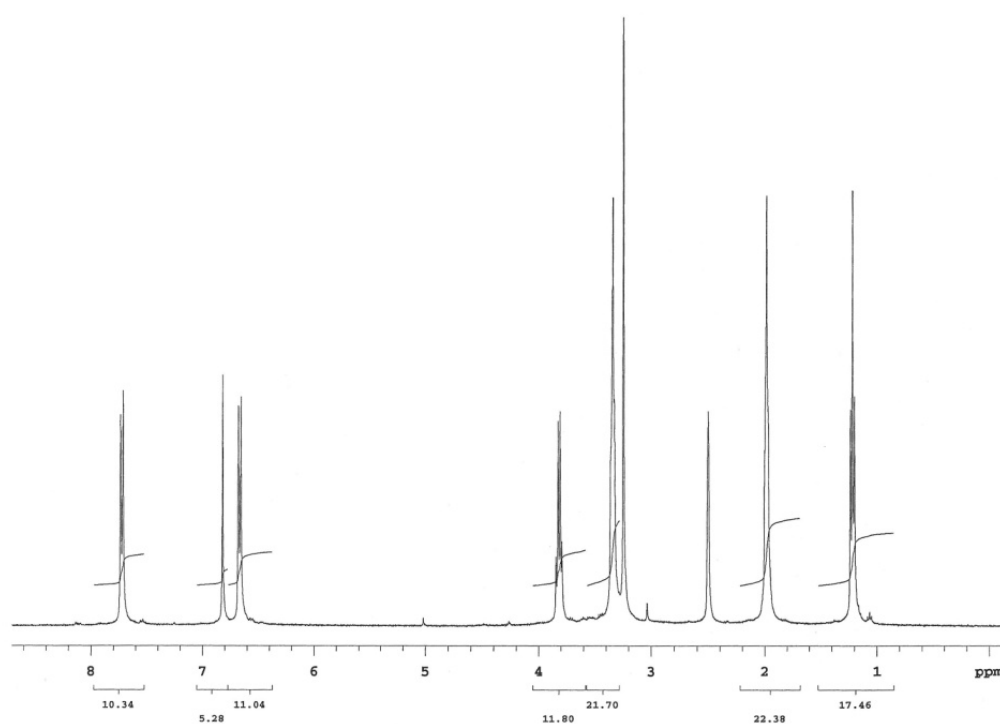
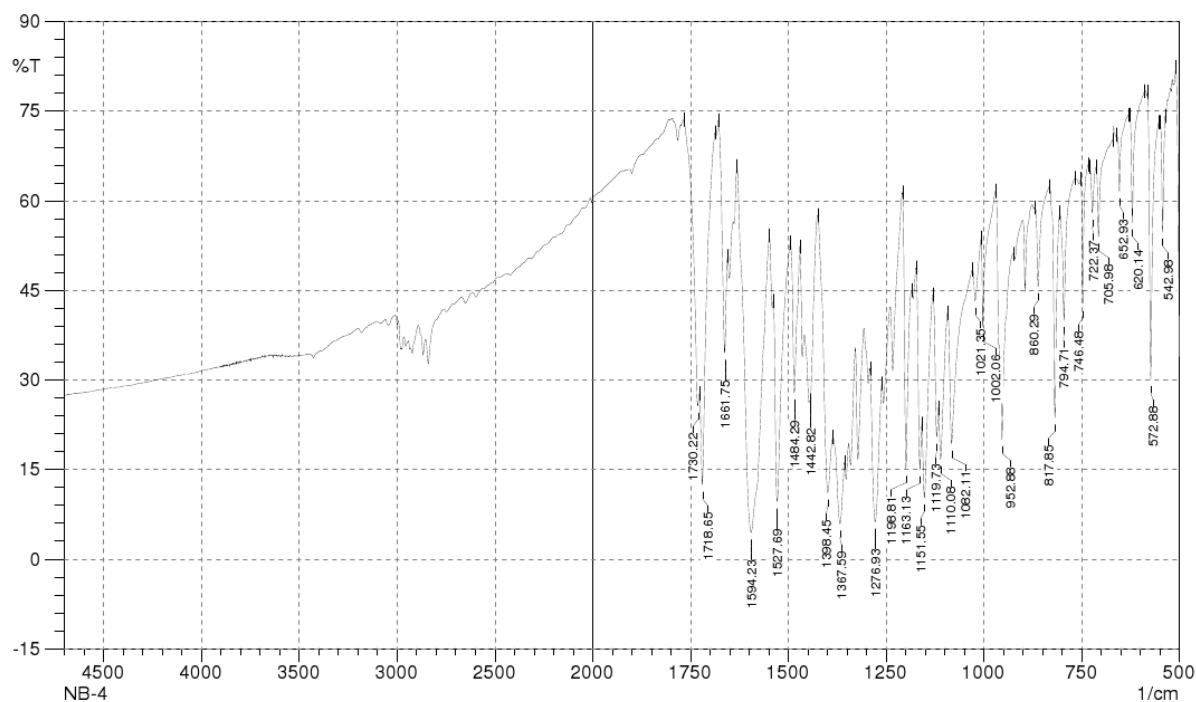
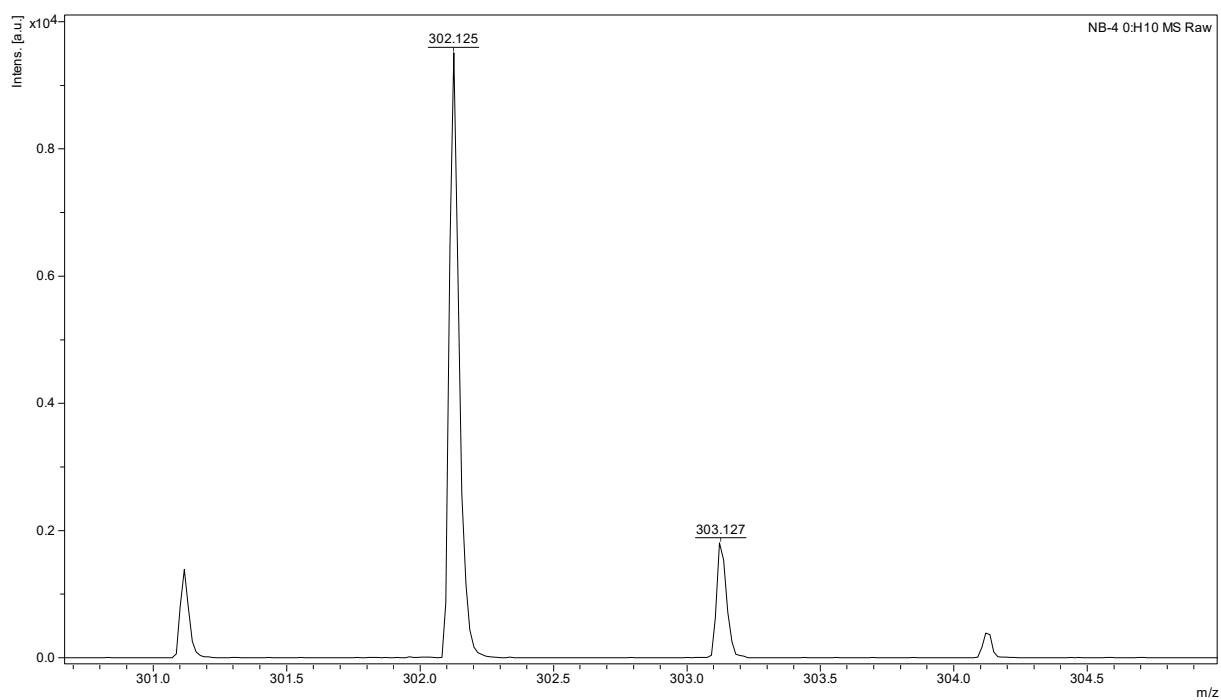
3-etil-5-(4-pirrolidin-1-il-benzilideno)-2-tioxo-oxazolidin-4-ona- LPSF/NB-4**Figura 26.** Espectro RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400MHz) – LPSF/NB-4.

Figura 27. Espectro IV (KBr, cm^{-1}) – LPSF/NB-4.**Figura 28.** Espectro MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ – LPSF/NB-4.

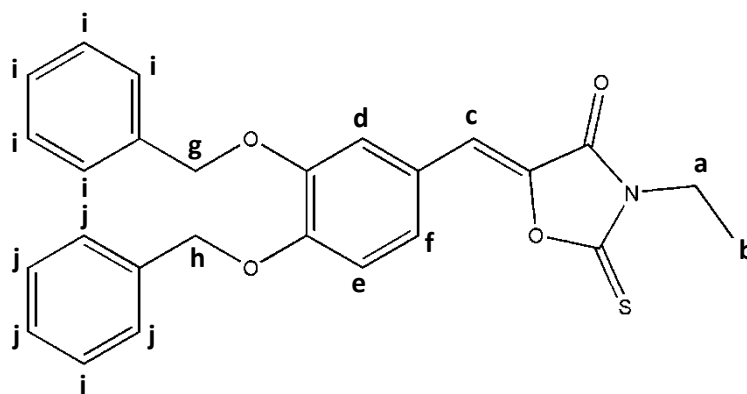
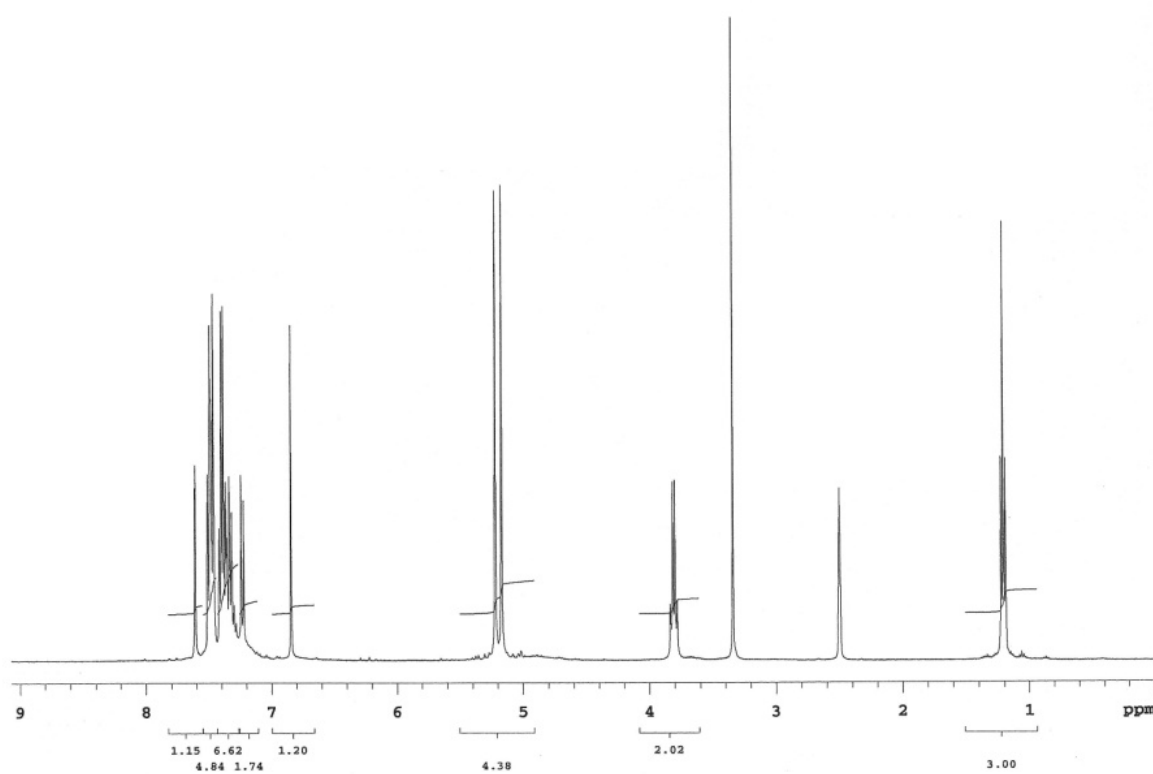
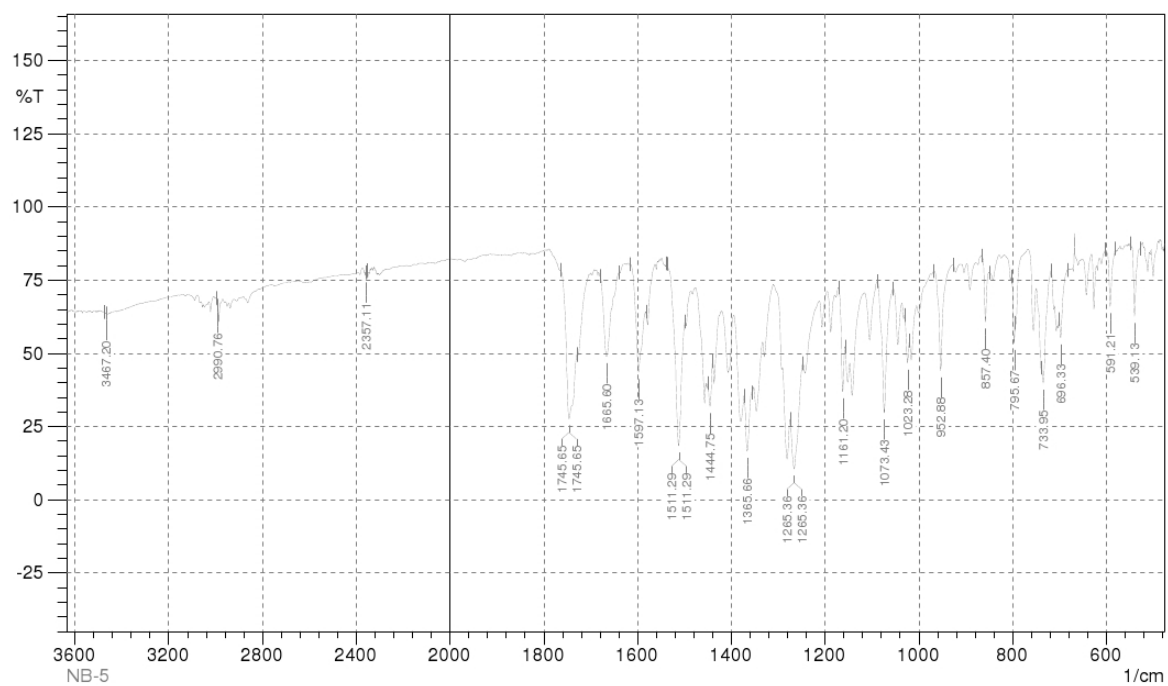
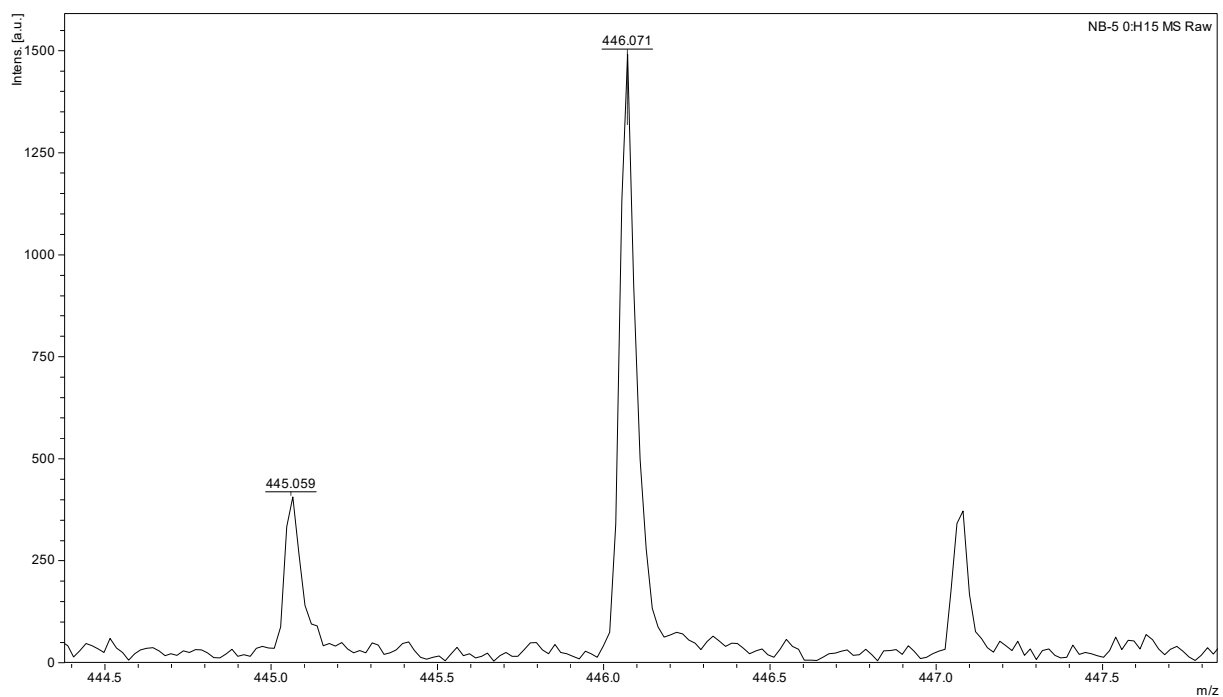
5-(3,4-bis-benzilóxi-benzilideno)-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona - LPSF/NB-5**Figura 29.** Espectro RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400MHz) – LPSF/NB-5.

Figura 30. Espectro IV (KBr, cm^{-1}) – LPSF/NB-5.**Figura 31.** Espectro MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ – LPSF/NB-5.

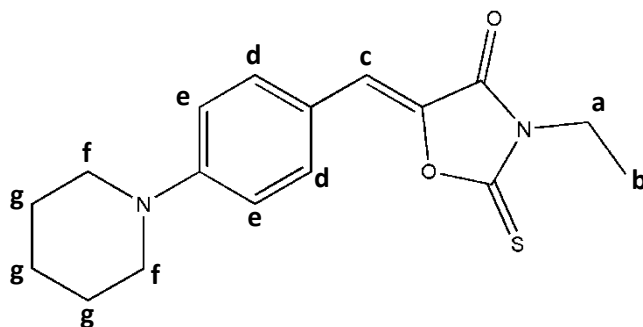
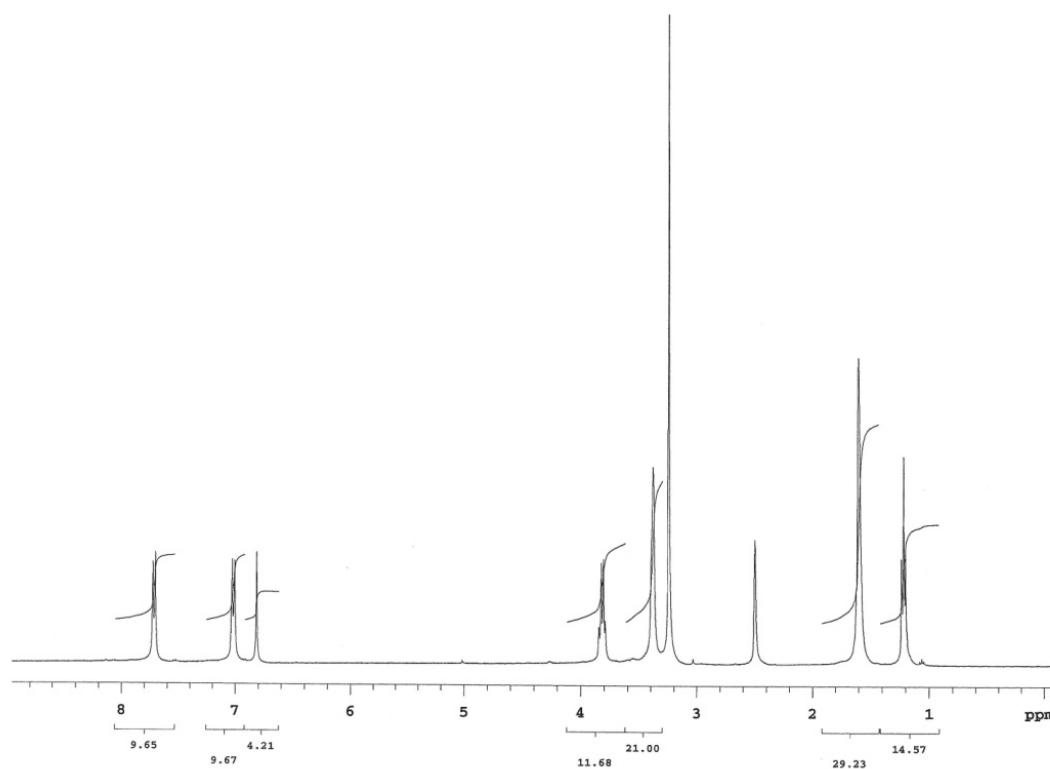
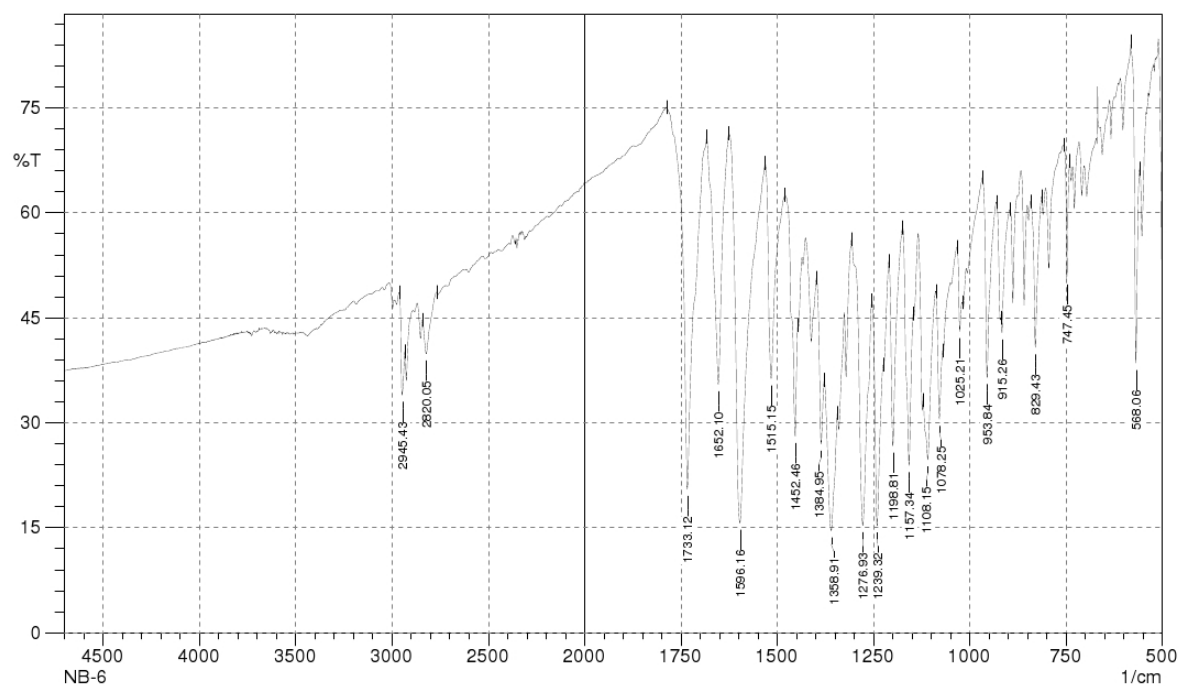
3-etil-5-(4-piperidin-1-il-benzilideno)-2-tioxo-oxazolidin-4-ona - LPSF/NB-6**Figura 32.** Espectro RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400MHz) – LPSF/NB-6.

Figura 33. Espectro IV (KBr, cm^{-1}) – LPSF/NB-6.**Figura 34.** Espectro MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ – LPSF/NB-6.