



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

TEMÍSTOCLES ITALO DE SANTANA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE DERIVADOS DO TIAZOL,
TIAZOLINONAS E TIOSSEMICARBAZONAS**

RECIFE

2018

TEMÍSTOCLES ITALO DE SANTANA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE DERIVADOS DO TIAZOL,
TIAZOLINONAS E TIOSSEMICARBAZONAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Cristina Lima Leite

RECIFE

2018

S232a Santana, Temístocles Italo de.
Avaliação da atividade antitumoral de derivados do tiazol, tiazolinonas e tiossemicarbazonas / Temístocles Italo de Santana. – 2018.
118 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Teresinha Gonçalves da Silva.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2018.

Inclui referências e anexos.

1. Câncer. 2. Tiazóis. 3. Citotoxicidade. 4. Atividade antitumoral. 5. Mecanismo de ação. I. Silva, Teresinha Gonçalves da (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2018-141)

TEMÍSTOCLES ITALO DE SANTANA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE DERIVADOS DO TIAZOL,
TIAZOLINONAS E TIOSSEMICARBAZONAS**

Defesa de Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco.

Aprovada em: 28/02/2018.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva - UFPE
Membro interno

Profa. Dra. Sandrine Maria de Arruda Lima - UFPE
Membro externo

Profa. Dra. Gardênia Carmen Gadelha Militão - UFPE
Membro externo

Profa. Dra. Jeyce Kelle Ferreira de Andrade - UFRPE
Membro externo

Profa. Dra. Silene Carneiro do Nascimento - UFPE
Membro externo

Ao meu pai Antônio Luiz de Santana Filho (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

À Deus pela sua presença constante em minha vida e por não desistir de mim mesmos nos momentos mais desafiadores;

À minha mãe Maria Suzete pelo seu amor incondicional e por todo o incentivo nessa caminhada;

Aos meus irmãos Teógenes, Tálamo e Tomásia por todas as palavras de apoio;

À minha namorada Cynthia Layse pela paciência, por todo amor, dedicação e pelo incentivo em atos, palavras e ações;

Meus sobrinhos lindos Tainá e Antônio Luiz que trouxeram uma nova luz para essa caminhada;

À minha orientadora a professora Dra. Teresinha Gonçalves da Silva pela confiança em mim depositada e por acreditar no meu trabalho. Pela orientação, compreensão, paciência e atenção que sempre demonstrou ter;

À minha co-orientadora professora Dra. Ana Cristina Lima Leite por ter fornecido as moléculas deste trabalho sem as quais este trabalho não seria possível;

A todos os meus amigos que compõem a família FEBRACIS. Sem vocês essa caminhada seria IMPOSSÍVEL. Com vocês aprendi o essencial para que a minha caminhada se tornasse mais leve. Equilibrar razão/emoção numa pós-graduação é indispensável para quem quer se manter saudável. Vocês são incríveis, fica aqui a minha eterna gratidão;

À professora Gardênia Carmen Gadelha Militão por toda paciência em esclarecer minhas dúvidas nesta caminhada;

À professora Paloma Lys de Medeiros pela colaboração na análise histopatológica;

As minhas amigas Jeyce, Sandrine e Natalie por toda colaboração, amizade, companheirismo, dedicação, risadas, aniversários, cafés e conversas jogadas fora. A presença de vocês abrandou esta jornada;

A todos os meus colegas que compõem o Laboratório de Prospecção Farmacotoxicológica de Produtos Bioativos (BIOFARMATOX);

A todos os meus colegas de doutorado 2014.1 por todo o convívio durante as disciplinas;

À Nerilin e Rilvan por toda a atenção durante esse período de doutorado, todos os Programas de Pós-graduação deveriam ter funcionários como vocês que realmente se importam com os alunos;

À Samara por todos os momentos de risadas, experimentos e lanches pela madrugada a dentro em experimentos;

À Anita por todos os momentos durante as aulas, risadas e força durante os momentos mais desafiadores;

Ao meu amigo Stefênio Barreto ao qual conheci por telefone e sempre se mostrou solícito a tirar dúvidas relacionadas a metodologia e pela amizade que foi adquirida durante este período;

À Larissa por toda a ajuda nos ensaios citotóxicos;

À Jamilka por sua disponibilidade em ceder amostras de controles positivos para o andamento deste trabalho;

À Míria por sintetizar as moléculas necessárias para o andamento do trabalho;

À Paulo André por todo o apoio durante a finalização do primeiro artigo;

Ao meu tio Geraldo pela amizade e por todo incentivo e receptividade durante este período de pós-graduação;

Aos meus primos Hugo e Brunno pelo convívio durante este período;

Aos professores que compõem o corpo docente do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas;

À FACEPE pelo auxílio financeiro que me permitiu dedicação exclusiva para o bom andamento deste trabalho.

A todos, minha gratidão!

**“Acorde para viver o melhor da sua vida hoje, acorde para ser feliz agora,
acorde para realizar as suas metas mais importantes e as menos importantes
também, afinal elas são suas.”**

Paulo Vieira

RESUMO

O câncer, doença de característica genética, é marcada por um crescimento celular desordenado que ocorre após alterações pontuais no DNA em regiões responsáveis pelo crescimento e diferenciação da célula. No presente trabalho, foi avaliada a citotoxicidade, em células tumorais, de trinta novas moléculas pertencentes a três classes de compostos: tiosemicarbazonas, tiazolinonas e tiazóis. A seletividade dos compostos mais ativos foi avaliada em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) e em hemácias, em seguida, foi investigado os possíveis mecanismos de ação *in vitro* e *in vivo* do composto mais promissor. *In vitro* foram avaliados o ciclo celular, fragmentação do DNA, medida do potencial transmembrânico mitocondrial e ensaio da apoptose. *In vivo* foram realizados o ensaio de toxicidade não-clínica aguda e atividade antitumoral em animais portadores do carcinoma ascítico de Ehrlich. O mecanismo de ação *in vivo* foi avaliado pelos mesmos métodos *in vitro* e, também foram realizadas análises hematológicas, bioquímicas e histopatológicas. Doze moléculas apresentaram-se promissoras na citotoxicidade e todas foram mais seletivas para as linhagens tumorais do que para as células normais. O derivado MB 1.4 foi escolhido para os estudos *in vitro* em linhagem do tipo K562 e ele foi capaz de induzir despolarização mitocondrial, parada de ciclo celular na fase G1, fragmentação do DNA e apoptose nas concentrações de 17 e 34 μM . *In vivo*, o derivado MB 1.4 apresentou DL_{50} de aproximadamente 500 mg/kg. Sobre o tumor ascítico de Ehrlich ele não reduziu a quantidade de células tumorais, porém reduziu a viabilidade celular, induziu apoptose nas doses de 5 e 10 mg/kg e degradação celular na dose de 20 mg/kg, parada de ciclo celular nas fases S (5 e 10 mg/kg) e G2/M (20 mg/kg), fragmentação do DNA e despolarização mitocondrial. Foram observadas alterações histológicas no rim e no fígado dos animais submetidos ao ensaio antitumoral, apesar disso, não foram observadas alterações bioquímicas e eritrocitárias. Entretanto, houve aumento dos leucócitos totais e redução das plaquetas na dose de 20 mg/kg. O derivado MB 1.4 é uma molécula inédita e um candidato a fármaco anticâncer promissor. Contudo, estudos mais aprofundados devem ser realizados para elucidar melhor seu mecanismo de ação e sua segurança farmacológica.

Palavras chave: Câncer. Tiazóis. Citotoxicidade. Atividade antitumoral. Mecanismo de ação.

ABSTRACT

Cancer, a disease of genetic trait, is marked by disordered cell growth that occurs after point changes in the DNA in regions responsible for cell growth and differentiation. In the present work, cytotoxicity was evaluated in tumor cells of thirty new molecules belonging to three classes of compounds: thiosemicarbazones, thiazolinones and thiazoles. The selectivity of the most active compounds was evaluated in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and in red blood cells, and the possible mechanisms of in vitro and in vivo action of the most promising compound were investigated. Cell cycle, DNA fragmentation, mitochondrial transmembrane potential measurement and apoptosis assay were evaluated in vitro. In vivo, the acute non-clinical toxicity and antitumor activity in animals with Ehrlich's ascitic carcinoma were performed. The mechanism of action in vivo was evaluated by the same in vitro methods and hematological, biochemical and histopathological analyzes were also performed. Twelve molecules were promising in cytotoxicity and all were more selective for tumor lines than for normal cells. The compound MB 1.4 was chosen for the in vitro studies in K562 type strain and was able to induce mitochondrial depolarization, G1 phase cell cycle arrest, DNA fragmentation and apoptosis at concentrations of 17 and 34 μM . In vivo, MB 1.4 had LD50 of approximately 500 mg / kg. On Ehrlich's ascites tumor, he did not reduce the number of tumor cells, but reduced cell viability, induced apoptosis at doses of 5 and 10 mg / kg and cell degradation at a dose of 20 mg / kg, cell cycle arrest at the S (5 and 10 mg / kg) and G2 / M (20 mg / kg), DNA fragmentation and mitochondrial depolarization. Histological changes were observed in the kidney and liver of the animals submitted to the antitumor assay; however, no biochemical and erythrocytic changes were observed. However, total leukocytes increased and platelets reduced at a dose of 20 mg / kg. MB 1.4 derivative is an unpublished molecule and a promising anticancer drug candidate. However, further studies should be performed to better elucidate its mechanism of action and its pharmacological safety

Key words: Cancer. Thiazole. Cytotoxicity. Antitumor activity. Mechanism of action.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Características das células tumorais.	23
Figura 2 - Distribuição dos principais tipos de câncer entre homens e mulheres mais incidentes estimados para 2016.	25
Figura 3 - A história da quimioterapia.	27
Figura 4 - Características moleculares da autofagia, necrose e apoptose.	29
Figura 5 - Duas principais vias de morte celular por apoptose em células de mamíferos.	30
Figura 6 - Mecanismos envolvidos na formação de vesículas autofágicas	32
Figura 7 - Morte celular por necroptose	35
Figura 8 - Esquema dos derivados tiossemicarbazônicos	36
Figura 9 - Estrutura do núcleo tiazol.	38
Figura 10: - Esquema de obtenção dos derivados tiossemicarbazônicos	43
Figura 11 - Esquema dos derivados aril-1,3-tiazóis.	44
Figura 12 - Derivados aril-4-tiazolinonas.	45
Figura 13 - Estrutura molecular do derivado MB 1.4 ((E)-4-(2,4-diclorofenil)-2-(2-(4(trifluorometil)benzilideno)hidrazinil)tiazol.	70

- Figura 14** - Efeito do composto MB 1.4 e doxorrubicina sobre a linhagem celular K562 determinado sobre citometria de fluxo sobre a despolarização mitocondrial após 48 h de incubação. 72
- Figura 15** - Efeito do composto MB 1.4 e doxorrubicina sobre a linhagem celular K562 determinado sobre citometria de fluxo usando o ciclo celular após 48 h de incubação. 73
- Figura 16** - Efeito do composto MB 1.4 e doxorrubicina sobre a linhagem celular K562 determinado por citometria de fluxo sobre a fragmentação do DNA após 48 h de incubação. 75
- Figura 17** - Efeito do composto MB 1.4 e doxorrubicina sobre a linhagem celular K562 determinado por citometria de fluxo sobre externalização da fosfatidil serina pelo ensaio de anexina V/7AAD após 48 h de incubação. 76
- Figura 18** - Fotomicrografias do fígado, rins e baço de animais do grupo controle e tratado com o derivado MB 1.4 na dose de 300 mg/kg no teste de toxicidade aguda. 83
- Figura 19** - Efeito do composto MB 1.4 e ciclofosfamida (CTX) sobre a viabilidade celular em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich após sete dias de tratamento. 85
- Figura 20** - Efeito do composto MB 1.4 e ciclofosfamida (CTX) sobre a indução de morte celular por apoptose em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich após sete dias de tratamento. 87
- Figura 21** - Efeito do composto MB 1.4 e ciclofosfamida (CTX) sobre o ciclo celular em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich após sete dias de tratamento. 89

Figura 22 - Efeito do composto MB 1.4 e ciclofosfamida (CTX) sobre a fragmentação do DNA em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich após sete dias de tratamento. 90

Figura 23 - Efeito do composto MB 1.4 e ciclofosfamida (CTX) sobre o potencial transmembrânico mitocondrial em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich após sete dias de tratamento. 91

Figura 24 - Fotomicrografias do fígado de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich. 96

Figura 25 - Fotomicrografias dos rins de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich. 98

Figura 26 - Fotomicrografias do baço de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich. 100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Derivados tiossemicarbazônicos e seus respectivos radicais de substituição.	43
Tabela 2 - Derivados tiazóis e seus respectivos radicais de substituição.	44
Tabela 3 - Novos derivados tiazolinônicos e seus respectivos radicais.	45
Tabela 4 - Linhagens celulares utilizadas nos experimentos de citotoxicidade <i>in vitro</i> .	46
Tabela 5 - Percentual de inibição (%) dos derivados do tiazol, tiazolinonas e tiossemicarbazonas <i>in vitro</i> pelo ensaio do MTT, no período de 72 horas, frente diversas linhagens de câncer humano na concentração de 25 µg/mL.	60
Tabela 6 - Valores de IC ₅₀ (µM) de derivados tiossemicarbazônicos contra diferentes linhagens de câncer humano.	62
Tabela 7 - Valores de IC ₅₀ (µM) dos novos derivados da série Aril-1,3-tiazóis que apresentaram melhor atividade citotóxica em diferentes linhagens de câncer humano.	65
Tabela 8 - Valores de IC ₅₀ (µM) das tiazolinonas contra diferentes linhagens de câncer humano.	67
Tabela 9 - Atividade hemolítica e citotoxicidade em CMSP de derivados tiossemicarbazônicos, tiazolinônicos e do tiazol.	68
Tabela 10 - Potencial citotóxico dos derivados MB 01, MB 1.4 e MG 2.5 frente à linhagem de K562 após 24, 48 e 72 horas de tratamento.	69

Tabela 11 - Efeito intraperitoneal da dose única de MB 1.4 em camundongos (n=3).	78
Tabela 12 - Efeitos da administração intraperitoneal do derivado MB 1.4 (300 mg/kg) e NaCl 0,9% (controle negativo) sobre o consumo de ração e água, evolução de massa corpórea e índice dos órgãos em camundongos fêmeas, durante 14 dias.	79
Tabela 13 - Efeito da administração intraperitoneal de NaCl 0,9% (controle negativo) e MB 1.4 sobre os parâmetros hematológicos de camundongos fêmeas, durante 14 dias.	80
Tabela 14 - Efeito da administração intraperitoneal de NaCl 0,9% (controle negativo) e MB 1.4 nos parâmetros bioquímicos de camundongos fêmeas, após 14 dias.	80
Tabela 15 - Percentual de viabilidade celular e percentual de inibição de células obtidas de tumor ascítico de Ehrlich após sete dias de tratamento com derivado MB 1.4.	84
Tabela 16 - Efeito do derivado MB 1.4 e NaCl 0,9% (controle CAE) sobre os parâmetros hematológicos de camundongos machos portadores do tumor ascítico de Ehrlich durante sete dias de tratamento.	92
Tabela 17 - Efeito do derivado MB 1.4 e NaCl 0,9% (controle CAE) sobre os parâmetros bioquímicos no soro de camundongos machos portadores do tumor ascítico de Ehrlich durante sete dias de tratamento.	93
Tabela 18 - Efeito do tratamento do composto MB 1.4 sobre o consumo de água, ração, avaliação de massa corpórea e índice dos órgãos de animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich (n=6).	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
céls/mL	Células por mL
CI₅₀	Concentração Inibitória Média
CMSP	Células Mononucleares do Sangue Periférico
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
EDTA	Ácido etileno diamonotetracético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
HEp-2	Linhagem Celular de Carcinoma Epidermoide de Laringe
HL-60	Linhagem Celular de Leucemia Promielocítica Aguda
HT-29	Linhagem Celular de Adenocarcinoma de Cólon
INCA	Instituto Nacional do Câncer
K562	Linhagem Celular de Leucemia Mieloide Crônica
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-tetrazólio
NCI-H292	Linhagem Celular de Carcinoma de Pulmão

PBS	Solução tampão fosfato
PI	Iodeto de Propídeo
RPMI	<i>Roswell Parrk Memorial Institute Medium</i>
RR	Ribonucleotido-Resutase
SFB	Soro Fetal Bovino

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVOS	22
2.1	Objetivo Geral	22
2.2	Objetivos Específicos	22
3	REFERENCIAL TEÓRICO	23
3.1	Câncer	23
3.2	Epidemiologia	24
3.3	História da oncologia	25
3.4	Vias de morte celular	28
3.4.1	Apoptose	28
3.4.2	Autofagia	32
3.4.3	Necrose	33
3.5	Tiossemicarbazonas	35
3.6	Tiazóis	38
3.7	Tiazolinonas	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1	Obtenção dos derivados	43
4.2	Avaliação da atividade antiproliferativa <i>in vitro</i>	45
4.2.1	Linhagens celulares.....	45
4.2.2	Manutenção das linhagens celulares	46
4.2.3	Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (CMSP)	47
4.3	Ensaio de citotoxicidade - MTT	47
4.4	Ensaio do Alamar Blue: Avaliação da atividade citotóxica em células mononucleares do sangue periférico humano	48
4.5	Ensaio de atividade hemolítica	49

4.6	Aspectos éticos para o ensaio do <i>alamar blue</i> e ensaio de atividade hemolítica.	50
4.7	Análise de citometria de fluxo	51
4.7.1	Análise do ciclo celular e fragmentação do DNA	51
4.7.2	Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial	52
4.7.3	Avaliação da apoptose por Externalização da Fosfatidilserina	54
4.8	Ensaio <i>in vivo</i>	55
4.8.1	Animais e aspectos éticos	55
4.8.2	Avaliação da toxicidade não-clínica aguda	55
4.8.3	Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> em animais portadores do carcinoma ascítico de Ehrlich	56
4.8.4	Mecanismo de ação em células do tumor ascítico de Ehrlich	56
4.8.4.1	Ensaio de viabilidade celular	56
4.8.5	Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos	57
4.8.6	Avaliação dos índices dos órgãos	57
4.8.7	Análise histopatológica	58
4.9	Análises estatísticas	58
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1	Experimentos <i>in vitro</i>	59
5.1.1	Triagem citotóxica dos derivados tiossemicarbazônicos, tiazolinônicos e tiazólicos	59
5.1.2	Determinação das IC ₅₀ dos derivados tiossemicarbazônicos, tiazolinônicos e do tiazol	61
5.1.3	Atividade hemolítica em eritrócitos humanos	68
5.1.4	Mecanismo de ação <i>in vitro</i> do derivado MB 1.4 em K562	69
5.1.4.1	Ensaio do Potencial Transmembrânico Mitocondrial	70
5.1.4.2	Análise do ciclo celular	73
5.1.4.3	Análise da fragmentação do DNA	74

5.1.4.4	<i>Ensaio de morte celular por apoptose</i>	75
5.2	Experimentos <i>in vivo</i>	77
5.2.1	Avaliação da toxicidade não-clínica aguda	77
5.2.1.1	<i>Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos</i>	79
5.2.1.2	<i>Análise histopatológica</i>	82
5.2.2	Teste antitumoral <i>in vivo</i>	84
5.2.2.1	<i>Análise da viabilidade celular</i>	84
5.2.2.2	<i>Ensaio de morte celular por anexina V</i>	85
5.2.2.3	<i>Ensaio do ciclo celular</i>	87
5.2.2.4	<i>Avaliação da fragmentação do DNA</i>	89
5.2.2.5	<i>Avaliação do ensaio do potencial transmembrânico mitocondrial</i>	90
5.2.2.6	<i>Parâmetros hematológicos e bioquímicos de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich</i>	92
5.2.2.7	<i>Análise histopatológica de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich</i>	95
6	CONCLUSÃO	102
	REFERÊNCIAS	103
	ANEXO A – Artigo publicado	118

1 INTRODUÇÃO

O câncer é considerado uma doença genética que pode acometer todos os tipos de tecido do organismo, que resulta de uma alteração patológica na informação contida no DNA. O câncer surge a partir de mutações que alteram a expressão de genes codificadores de proteínas comprometidas com o controle da proliferação e da diferenciação celular ou, ainda, envolvidas nos mecanismos de reparo do DNA. Em consequência dessas alterações, as células adquirem vantagens proliferativas sobre as suas congêneres normais, formando tumores, invadindo tecidos circunvizinhos e podendo propagar-se à distância (KLUG; CUMMINGS, 2002; THOMAS, 2003).

O câncer atualmente é considerado um grande problema de saúde pública. No Brasil, a estimativa da incidência de câncer para o ano de 2016 é de aproximadamente 596 mil casos. Para o gênero masculino são esperados aproximadamente 295.200 casos e entre o gênero feminino 300.800 novos casos, incluindo casos de pele não melanoma, tipo mais incidente para ambos os sexos (INCA, 2016).

O tratamento padrão para o câncer, embora não específico, baseia-se na cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Frequentemente, a ressecção cirúrgica e a radioterapia são técnicas bem sucedidas na erradicação do tumor primário, embora um problema comumente encontrado seja a recidiva da doença devido a células tumorais residuais e/ou metástases. Por isso, estas estratégias terapêuticas são geralmente seguidas pela quimioterapia (WAYTECK et al., 2014).

Os agentes farmacológicos utilizados no tratamento do câncer incluem uma grande variedade de compostos que atuam de várias formas, interferindo nos mecanismos de sobrevivência, proliferação e migração celulares. O desenvolvimento de agentes anticâncer com acentuada seletividade para células tumorais é essencial, particularmente àqueles que podem vencer a resistência a terapias estabelecidas. Diversas classes de moléculas vêm sendo estudadas visando a atividade antitumoral. Os derivados tiossemicarbazônicos vêm recebendo especial interesse, assim como os compostos derivados de tiazóis. Novas agentes anticâncer cujo alvo é a enzima ribonucleotido-resutase (RR) têm sido desenhados (RICHARDSON, 2002; KALINOWSKI; RICHARDSON, 2005).

Moléculas do tipo tiossemicarbazonas têm sido extensivamente estudadas por apresentarem atividade antiparasitária, antibacteriana e antitumoral, e dentro desta classe, moléculas como o *marboran* ou *triapina* foram utilizadas na prática clínica. Seu mecanismo de ação é ainda controverso em muitos aspectos, mas já é bem conhecido que derivados heterocíclicos da tiossemicarbazonas agem inibindo a ribonucleotideo redutase, enzima responsável pela síntese de precursores do DNA e, conseqüentemente, da divisão celular (LI et al., 2009).

Tiazóis, por sua vez, pertencem a uma classe de compostos heterocíclicos que contém átomo de enxofre, molécula importante para os organismos vivos. Esta porção heterocíclica está presente em compostos naturais e sintéticos e apresentam um amplo espectro de atividades biológicas incluindo, antibacteriana (sulfatiazol), anticonvulsivante (riluzol), antiparkinsoniano (talipexole), antiviral (ritonavir) e anticâncer (dasatinib) (SHI, et al., 2010). Destaca-se a potente ação citotóxica frente a diferentes tipos de tumores tais como carcinoma de pulmão, adenocarcinoma de cólon, glioblastoma, melanoma, câncer de próstata e leucemia (DE SOUZA et al., 2005; ALIABADI et al., 2010; FALLAH-TAFTI et al., 2011; LEFRANC, 2013).

Nos últimos anos, compostos com atividade anticâncer têm sido extensivamente desenhados e testados como boa perspectiva pelos químicos medicinais, como a possibilidade de desenvolvimento de novos protótipos promissores para o tratamento do câncer. Assim, neste trabalho, novos derivados tiossemicarbazônicos, tiazolinônicos e do anel tiazol foram desenhados, sintetizados e avaliados com o propósito de se obter substâncias menos tóxicas e mais seletivas para o tratamento do câncer.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar a atividade citotóxica em células tumorais de novos derivados tiossemicarbazônicos, tiazolinônicos e tiazólicos, bem como investigar seus possíveis mecanismos de ação *in vitro* e *in vivo* do composto mais promissor.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* dos novos derivados tiossemicarbazônicos, tiazolinônicos e do tiazol em diferentes linhagens de células tumorais;
- Determinar a atividade citotóxica dos compostos mais ativos em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) e hemácias de indivíduos saudáveis;
- Selecionar o melhor composto entre as três classes e estudar possíveis mecanismos de ação antitumoral *in vitro*
- Determinar a toxicidade não-clínica aguda *in vivo* do derivado mais ativo;
- Avaliar a ação antitumoral do derivado mais ativo em carcinoma ascítico de Ehrlich *in vivo*;

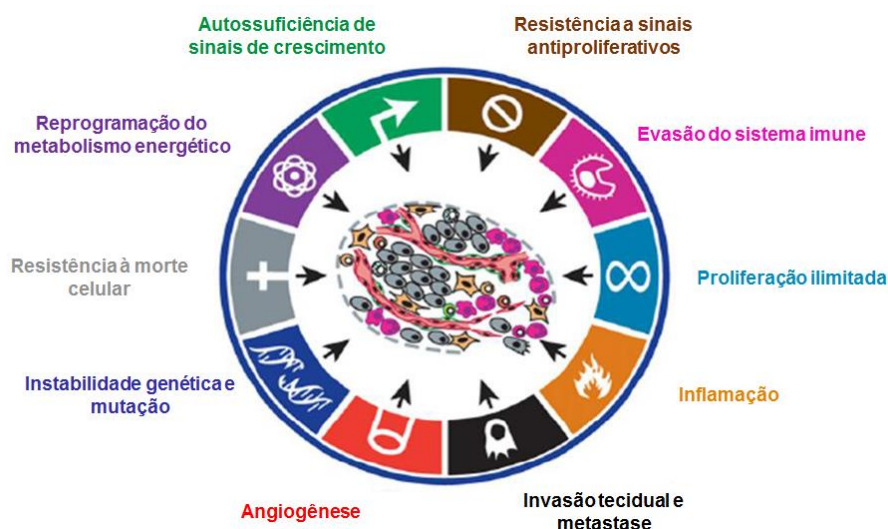
3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Câncer

Câncer é um termo dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm como característica comum o crescimento celular desordenado causado a partir de alterações no DNA em regiões responsáveis pelo controle de crescimento da célula (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015). O câncer é uma doença complexa de característica genética que por muito tempo foi considerada um processo celular autônomo, decorrente da aquisição de mutações sucessivas em oncogenes e genes supressores de tumor que resultam em uma progressiva proliferação e resistência a morte celular (KENNY, LEE, BISSELL, 2007; OUYANG et al., 2012).

As células de cancerígenas possuem defeitos nos mecanismos que governam a proliferação celular normal. Entre as características do tumor maligno estão a resistência a sinais antiproliferativos, evasão do sistema imune, proliferação ilimitada, inflamação, autossuficiência de sinais de crescimento, reprogramação do metabolismo energético, resistência a morte celular, instabilidade genética e mutação, angiogênese e metástase (HANAHAAN; WEINBERG, 2011).

Figura 1 - Características das células tumorais.



Fonte: Adaptado de (HANAHAAN; WEINBERG, 2011).

Atualmente a terapia anticâncer envolve um padrão de estratégias não específicas para o seu tratamento. Cirurgia, radioterapia e a quimioterapia são as abordagens mais utilizadas. Embora a ressecção cirúrgica e a radioterapia sejam, muitas vezes, bem sucedidas na erradicação de tumores primários, um problema comumente encontrado é a recidiva da doença devido células tumorais residuais e/ou metástases (VANNEMAN; DRANOFF, 2012).

3.2 Epidemiologia

O câncer é o principal problema de saúde pública em muitos países no mundo, inclusive nos Estados Unidos (EUA), onde atualmente é a segunda principal causa de morte. Em poucos anos, deverá superar as doenças cardiovasculares, e para 2015 foi projetada a incidência de 1.658.370 novos casos de câncer e um total de 589.430 mortes nos EUA (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2015).

Desde 1995, são elaborados relatórios sobre a estimativa da Incidência de Câncer no Brasil. Para o ano de 2016 estima-se que o país deva registrar aproximadamente 596 mil casos de câncer. Para os homens são esperados aproximadamente 295.200 casos e entre as mulheres 300.800 mil novos casos, incluindo os casos de pele não melanoma, que é o tipo mais incidente para ambos os sexos, seguido por câncer de mama, cólon e reto, colo de útero, pulmão e estômago para o sexo feminino e câncer de próstata, pulmão, colo e reto, estômago e de boca para o sexo masculino (Figura 2), o que reforça a gravidade do câncer no país (INCA, 2016).

Figura 2 - Distribuição dos principais tipos de câncer entre homens e mulheres mais incidentes estimados para 2016.



Fonte: INCA, 2016.

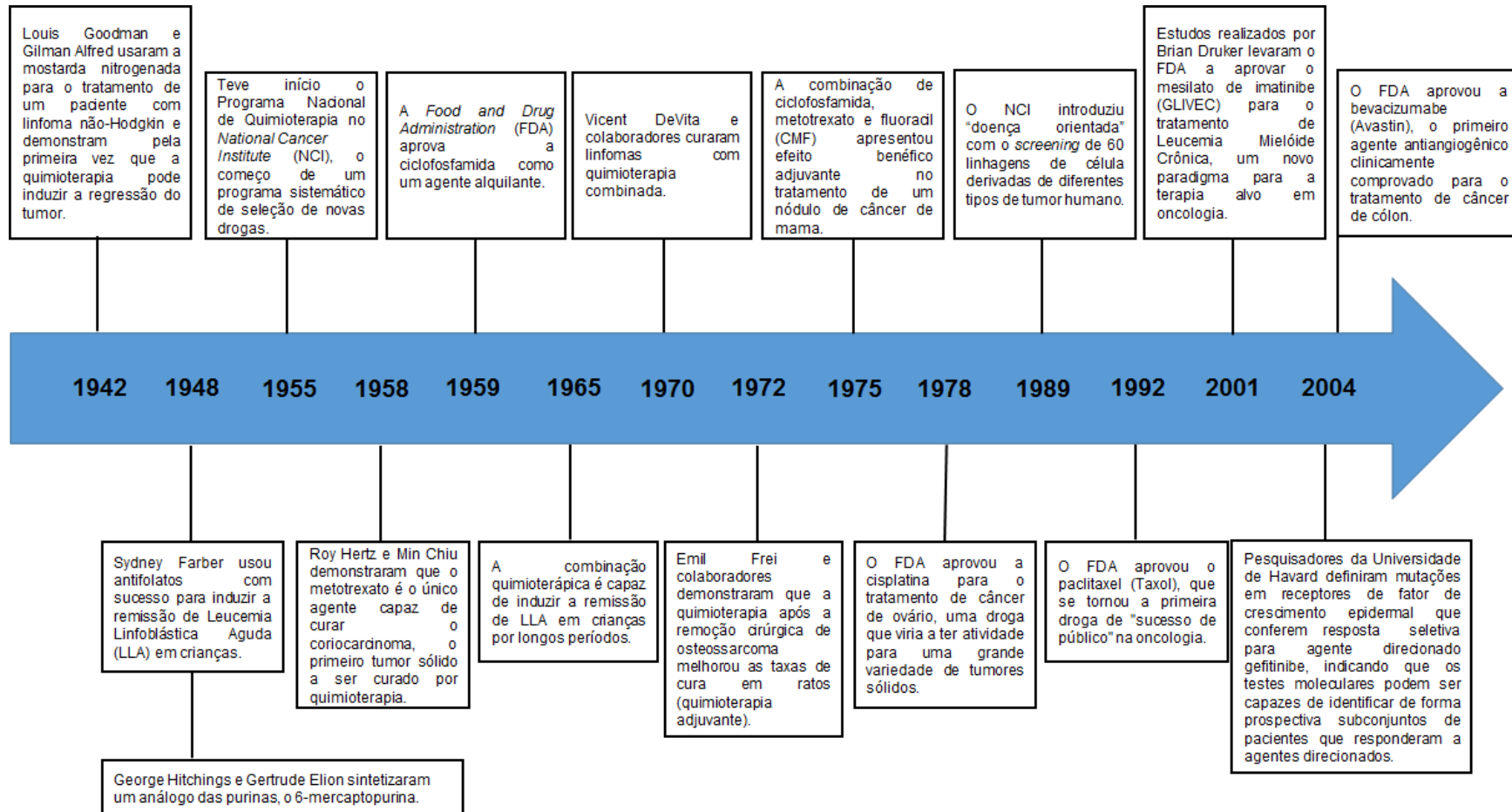
3.3 História da oncologia

Embora o processo neoplásico seja reconhecido há séculos, pouco se sabia sobre os mecanismos biológicos de transformação e progressão tumoral até o surgimento da medicina molecular durante a última metade do século XX. Até 1950, o tratamento compreendia basicamente a remoção cirúrgica do tumor (CHABNER; ROBERTS Jr, 2005). Apesar de ser a terapia individual mais antiga no tratamento oncológico, a cirurgia evoluiu nas últimas décadas (WYLD; AUDISIO; POSTON, 2015).

Em seguida, durante a década de 1960 a radioterapia tornou-se uma ferramenta valiosa para o controle local e regional da doença. Entretanto, assim como a cirurgia, a terapia com radiação não foi capaz de erradicar o câncer metastático. Logo, o tratamento mais eficaz necessitava agir de forma sistêmica em todos os órgãos, como a terapêutica por quimioterápicos (CHABNER; ROBERTS Jr, 2005).

Os primeiros quimioterápicos, como as mostardas nitrogenadas e os fármacos antifolatos, começaram a surgir a partir de 1940. Na Figura 3 é possível observar a progressão histórica do desenvolvimento dos fármacos antineoplásicos até o início do século XXI.

Figura 3 - A história da quimioterapia.



Fonte: Adaptado de CHABNER; ROBERTS Jr, 2005.

Uma estratégia mais recente de combate ao câncer é a imunoterapia, também chamada de vacina contra o câncer. Seu principal objetivo é estimular o sistema imunológico dos pacientes a destruir células transformadas. A imunoterapia é utilizada para desencadear proteção dos pacientes portadores de tumor, principalmente por suprimir metástase a longo prazo e recidiva tumoral (QIAN; LIU; JIANG, 2018). Atualmente, outra estratégia como a hormônioterapia também encontra-se disponível (NAIKI et al., 2012; ABRAHAM; STAFFURTH, 2016).

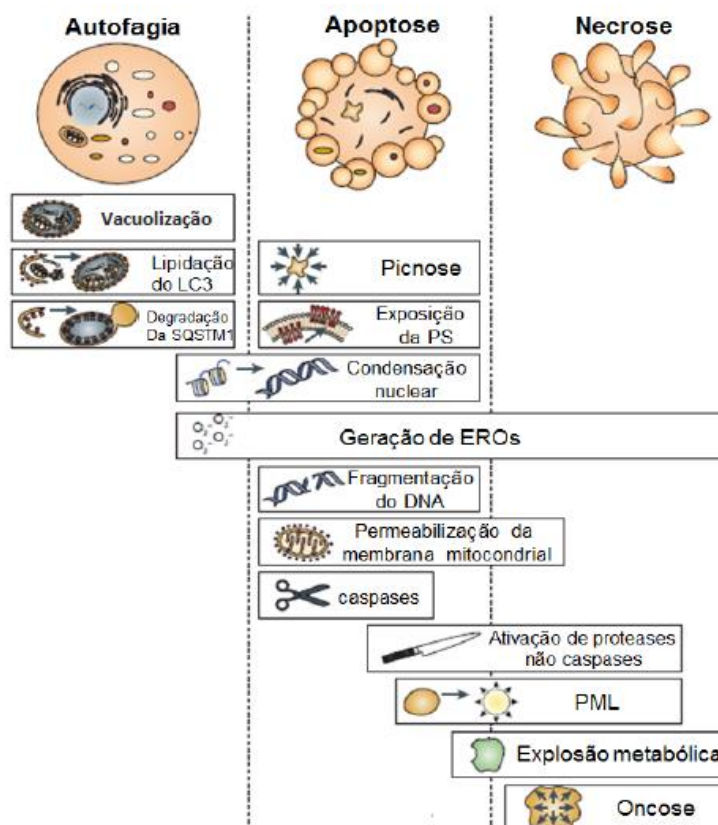
Embora muitos fármacos antitumorais eficazes estejam disponíveis, alguns ainda apresentam elevada toxicidade. O câncer também pode desenvolver resistência a certos agentes terapêuticos, por esta razão, a cancerologia pode ser considerada uma área de grande necessidade ainda não atendida (UTKU, 2011). Em geral, as combinações de antineoplásicos provaram ser mais eficazes que quando tratados isoladamente, tanto em pacientes com metástase quanto em pacientes com alto risco de recaída após o tratamento cirúrgico do tumor primário (CHABNER; ROBERTS Jr, 2005). A radiação também pode ser realizada em combinação com outras modalidades de tratamento como a cirurgia, quimioterapia ou imunoterapia. Quando utilizada em combinação com a cirurgia, a radiação pode ser usada como terapia neoadjuvante, onde a mesma é usada antes da cirurgia e tem por objetivo a redução tumoral ou pode ser usada como terapia adjuvante após a cirurgia com a finalidade de destruir possíveis células tumorais residuais que não foram removidas cirurgicamente (BASKAR et al., 2012).

3.4 Vias de morte celular

3.4.1 Apoptose

Apoptose, necrose e autofagia são as principais vias de morte celular envolvidas no câncer e podem ser distintas por suas diferenças morfológicas e moleculares (KEEP et al., 2011; OUYANG et al., 2012). Estas diferenças estão descritas na Figura 4.

Figura 4 - Características moleculares da autofagia, necrose e apoptose.



Fonte: Adaptado de (KEPP et al., 2011).

* LC3 – Também conhecido como MAP1LC3 (Proteínas 1 Associadas a Microtúbulos de Cadeia Leve 3)

* SQSTM1 – Sequestossoma 1

* MMP – Permeabilização da membrana mitocondrial

* PML – Permeabilização da membrana lisossomal

* PS – Fosfatidil serina

* EROS – Espécies reativas de oxigênio

O termo apoptose foi descrito pela primeira vez por Kerr et al.(1972) (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972). É caracterizada como processo de morte celular programada onde ocorrem uma sequência de eventos moleculares bem compreendidos e controlados. São observadas alterações na morfologia nuclear como a condensação e fragmentação nuclear, clivagem do DNA cromossômico em internucleossômico, formação de *bleb's* de membrana e de corpos apoptóticos. Estes são reconhecidos e removidos por células fagocíticas e apresentam como característica marcante, a ausência de inflamação ao redor das células mortas (EDINGER; THOMPSON, 2004; HANAHAN; WEINBERG,

apoptose por clivagem de proteínas celulares essenciais (HANAHAN; WEINBERG, 2011; VERBRUGGE; JOHNSTONE; SMYTH, 2010).

Diversos estímulos podem desencadear a via intrínseca da apoptose independente dos receptores de morte, como a ação por fármacos anticâncer, toxinas e radiação que causam alterações nas propriedades e funções da membrana mitocondrial (HUANG; FRETER, 2015).

A apoptose pela via intrínseca é desencadeada por estresses intracelulares que induzem a permeabilização da membrana mitocondrial externa e consequente liberação de proteínas pró-apoptóticas do espaço intermembranar da mitocôndria, marcadamente o citocromo c, para o citosol. O citocromo c tem importante papel na cadeia transportadora de elétrons. Quando liberado pela mitocôndria, o citocromo c adota um papel letal que é essencial para a ativação de caspases (LOPES; TAIT 2015; TAIT et al., 2010).

No citosol, o citocromo c interagem com proteínas apoptóticas ativando o fator de ativação de protease apoptótica (Apaf-1) e procaspase-9, para formar o complexo de ativação de caspases, o apoptossomo (HENGARTNER, 2000; HUANG; FRETER, 2015). Este tem a função de ativar a caspase-9 e consequente ativação de caspases 3 e 7, para assim induzir a apoptose. Proteínas como SMAC/Diablo e Omi/HtrA2 também podem ser liberadas pela mitocôndria através da permeabilização da membrana mitocondrial externa e ativar caspases, por inibir a ação da proteína inibidora de apoptose (XIAP) (LOPES; TAIT 2015; TAIT et al., 2010).

As células em apoptose externalizam resíduos de fosfatidilserina, normalmente encontrados na face interna da membrana, fornecendo sinalização para os macrófagos para que possam ser reconhecidas e eliminadas (HASSAN et al., 2014; MAHONEY; RENNERT; FREEMAN, 2015).

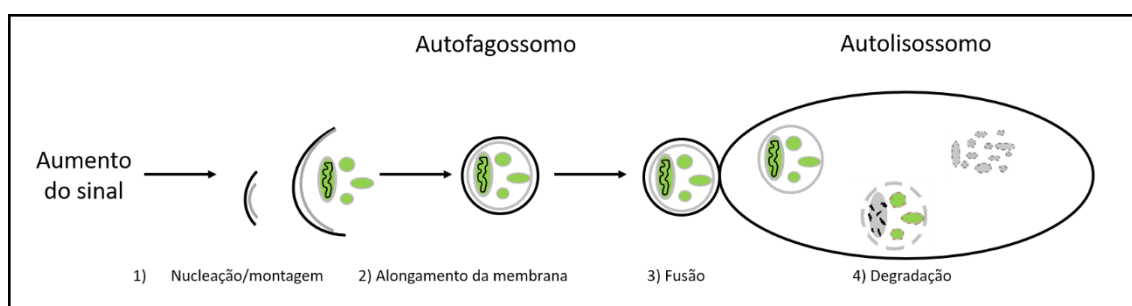
A evasão da apoptose pode contribuir para o desenvolvimento, progressão e resistência do tumor ao tratamento. A maioria das terapias anticâncer disponíveis, incluindo quimioterapia, radioterapia e imunoterapia, atuam principalmente por ativar vias de morte celular, ou seja, apoptose em células tumorais. Assim, uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes a resistência dos tumores à morte celular por apoptose é esperada para fornecer a base de uma abordagem racional no desenvolvimento de terapias molecular específicas (MOHAMMAD et al., 2015).

3.4.2 Autofagia

Mecanismos alternativos de morte celular têm sido descritos. Um importante processo de morte celular associado a apoptose é chamado de autofagia (FUCHS; STELLER, 2015). No entanto, a autofagia é um processo mais lento que a apoptose (LOCKSHIN; ZAKERI, 2007).

Autofagia ou macroautofagia é um processo no qual as células digerem e reciclam seus próprios constituintes (Figura 6). Palavra derivada do Grego que significa “comendo a si mesmo”, a autofagia compreende um processo conservado evolutivamente desde as leveduras aos mamíferos (NAGELKERKE et al., 2015). Em níveis basais, a autofagia assegura a homeostase celular por prevenir o acúmulo de resíduos e por remover organelas danificadas e velhas. Inicia-se com a formação de vesículas de dupla membrana, autofagossomos, que sequestram proteínas e organelas. A degradação do conteúdo dos autofagossomos ocorre quando há a fusão com os lisossomos. O ambiente ácido e a presença de enzimas hidrolíticas neste compartimento desintegram os componentes e retornam os seus constituintes (GOZUACIK; KIMCHI, 2004; NAGELKERKE et al., 2015).

Figura 6 - Mecanismos envolvidos na formação de vesículas autofágicas



Adaptado de GOZUACIK; KIMCHI, 2004.

Além de atuar na homeostasia celular, a autofagia ou a falta dela, pode contribuir para o desenvolvimento e aumento de diversas condições patológicas, incluindo o câncer (NAGELKERKE et al., 2015).

Várias proteínas e vias relacionadas à sinalização autofágica são desreguladas durante o processo de transformação maligna o que resulta na redução do processo autofágico e consequente desenvolvimento do câncer. Além desta relação, células malignas podem entrar em autofagia quando sofrem ação de alguns quimioterápicos (GOZUACIK; KIMCHI, 2004). O benefício terapêutico, reconhecido como um importante mecanismo de sobrevivência celular no câncer, pode ser realizado de duas maneiras: por inibição, onde a função citoprotetora da autofagia é eliminada, induzindo formas não autofágicas de morte celular; por estimulação, na qual a degradação autofágica excessiva do conteúdo citoplasmático estimula a morte celular autofágica. Ambas as estratégias podem ser combinadas com os tratamentos convencionais do câncer para melhorar a eficácia terapêutica (NAGELKERKE et al., 2015).

3.4.3 Necrose

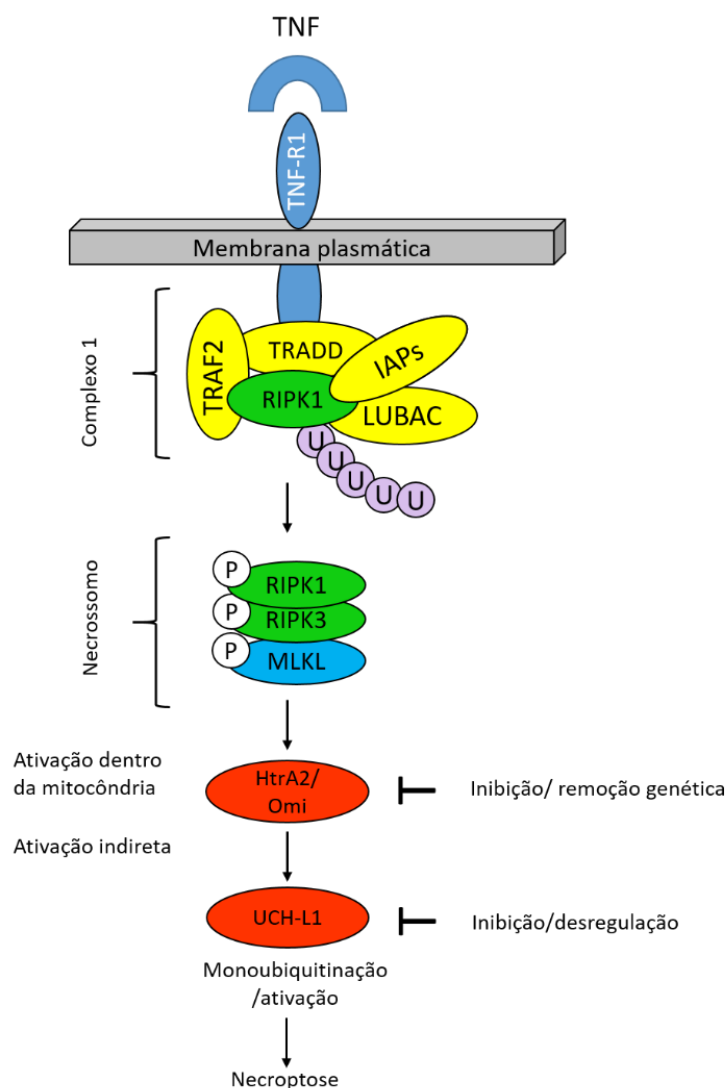
Outro importante mecanismo de morte celular é a necrose. Durante muito tempo, este mecanismo de morte esteve associado a danos acidentais ou injúrias que encaminhavam a célula a uma morte prematura. Atualmente é considerada um processo de morte celular controlada geneticamente (DE ALMAGRO; VUCIC, 2015).

Neste processo de morte celular, a destruição do tecido é irreversível e ocorre após alterações na função bioenergética da célula ou por elevados níveis de cálcio citosólico e espécies reativas de oxigênio (EROs) (BAUMANN, 2012).

A necrose é caracterizada pelo inchaço de organelas e células (oncoses), além do rompimento da membrana plasmática e extravasamento de conteúdos intracelulares (VANDEN BERGHE et al., 2014). Estudos recentes têm demonstrado que este mecanismo de morte celular é composto por diferentes subtipos que podem ser claramente definidos (DE ALMAGRO; VUCIC, 2015). Os subtipos já identificados são: necroptose, ETose, NETose, partanatos, oxitose, pironecrose, ferroptose e piroptose. Todos estes processos são caracterizados por apresentarem peculiaridades no processo de morte celular e considerados como um processo regulado de morte celular por necrose (VANDEN BERGHE et al., 2014).

A necroptose (Figura 7) não é uma via de morte padrão, mas um processo altamente regulado e bem compreendido a nível molecular (DE ALMAGRO; VUCIC, 2015; VANDEN BERGHE et al., 2014). Pode ser também considerado um mecanismo de *back-up* para as células que são destinadas a morte quando a via apoptótica estiver comprometida (DE ALMAGRO; VUCIC, 2015). A necroptose ocorre após a ativação de proteína que interage com o receptor 1 (RIP1, também conhecido como RIPK1) em resposta a ligação do fator de necrose tumoral (TNFR) e a formação do complexo RIP1-RIP3 (necrossomo) (PAPATRIANTAFYLLOU, 2012).

Figura 7 - Morte celular por necroptose



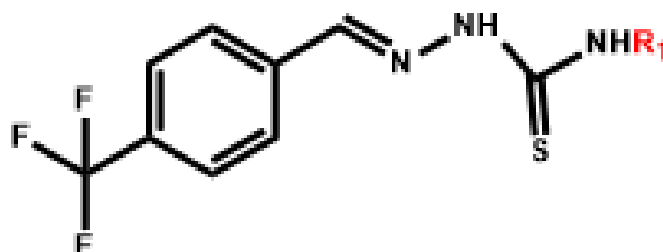
Regulação da necroptose induzida por TNF pelas proteases HtrA2/Omi e UCH-L1. Após a ligação ao ligando, a sinalização necrótica por TNF-R1 desencadeia a montagem de RIPK1, RIPK3 e MLKL e formação de necrossome. Por mecanismos ainda desconhecidos, a sinalização necrótica induz a ativação de HtrA2 / Omi dentro das mitocôndrias. O HtrA2 / Omi ativado enxerga os substratos intramitochondriais não identificados que causam a monobitinação indireta (U) e a ativação da UCH-L1 citosólica, resultando em morte celular necroptótica. Isso pode ser prevenido por inibição farmacológica ou ablação genética de HTRA2 / Omi, ou inibição ou downregulation de UCHL1. "P" indica fosforilação. Adaptado de CHICO; SAGGAU; ADAM, 2017.

3.5 Tiossemicarbazonas

Tiossemicarbazonas são compostos que podem ser sintetizados a partir da condensação de uma cetona ou um aldeído com uma tiossemicarbazida (Figura 8) (ANDERSON; DUCA; SCUDI, 1951; GINGRAS; SOMORJAI;

BAYLEY, 1961). Seus derivados possuem diversas atividades biológicas já descritas na literatura.

Figura 8 - Esquema dos derivados tiossemicarbazônicos



Fonte: Barbosa, 2014.

Estudos recentes têm demonstrado a atividade de novos derivados aril-tiossemicarbazonas e fenoximetil-tiossemicarbazonas sobre larvas em estágio L4 de *Aedes aegypti*, vetor responsável por transmitir doenças como a dengue e a febre amarela (DA SILVA et al., 2015).

As tiossemicarbazonas têm sido classificadas como detentoras de atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. Espíndola et al. (2015) sintetizaram 32 novos derivados aril-tiossemicarbazonas e observaram que os derivados 1-(4-bromofenil)-2-(3-cloro-4-fluorofenoxi)etan-1-ona tiossemicarbazona e 1-(4-bromofenil)-2-(3,4-diclorofenoxi)etan-1-onatiossemicarbazona apresentaram elevada redução da carga parasitária por inibir a cruzaina (enzima chave para a replicação intracelular do parasito).

Moreira et al. (2014) avaliaram a atividade de 24 novos derivados aril-tiossemicarbazônicos contra *T. cruzi*. Os melhores compostos contra *T. cruzi*, N-(4-(((3-(tiossemicarbazida)butan-2-ilideno)oxi)fenil) acetamida e 2-(3-([1,10-bifenil]-2-iloxi)butan-2-ilideno) tiossemicarbazida, foram capazes de inibir a proliferação das formas epimastigotas e demonstraram toxicidade contra tripomastigotas, entretanto não afetaram a viabilidade de esplenócitos. Estes compostos foram capazes de inibir a ação da cruzaina, mas induziram a morte de *T. cruzi* por induzir a morte por apoptose.

Dez novos derivados do 3,4-metilenodioxida-6-X-benzaldeído-tiossemicarbazona tiveram sua atividade testada contra *Leishmania*

amazonensis. Os compostos que apresentaram os substituintes 6-I e 6-CN mostraram significativa atividade leishmanicida e índice de seletividade mais elevada que a pentamidina, fármaco padrão. Estes resultados sugerem que estes compostos podem ser usados como protótipos promissores para o desenvolvimento de fármacos contra leishmaniose (DE MELOS et al., 2015).

Altıntop et al. (2016) sintetizaram dez novos derivados tiossemicarbazônicos que tiveram atividade antifúngica e citotóxica testadas. Dois compostos (4-(naftalen-1-il)-1-(2,3-difluorobenzilideno)tiossemicarbazida e 4-(naftalen-1-il)-1-(2,5-difluorobenzilideno)tiossemicarbazida foram os melhores compostos com atividade anticândida. Além desta atividade, não foram observadas potencial genotóxico ou mutagênico para estas substâncias. O derivado (4-(naftalen-1-il)-1-(2,4-difluorobenzilideno)tiossemicarbazida se apresentou como o agente anticâncer mais promissor quando testado contra linhagem celular de adenocarcinoma de pulmão (A549) e potencial não tóxico contra linhagem celular de fibroblastos de camundongos (NHI/3T3). Entretanto, para melhor compreensão desses resultados, os mecanismos de ação destes compostos devem ser melhor investigados.

Como detentores de atividade antiproliferativa, uma das vias de atuação dos derivados tiossemicarbazônicos pode ser a interação com DNA/proteínas, sobre a atividade de nucleases e inibição da topoisomerase I, mesmo em baixas concentrações (VIKNESWARAN et al., 2016).

Estudos realizados utilizando complexos metálicos associados a tiossemicarbazonas apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*) e gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*), além de apresentarem atividade contra espécies de fungos como *Candida albicans* e *Aspergillus niger* (NETALKAR; NETALKAR; REVANKAR, 2015). Estudos recentes têm demonstrado a ação de derivados isatina- β -tiossemicarbazona frente a bactérias gram-positivas, especialmente para linhagens de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina e a *Enterococcus* resistentes à vancomicina, no entanto, não foram capazes de inibir o crescimento de bactérias gram-negativas (ZHANG et al., 2015).

Estudos *in vivo* também demonstraram a atividade de iodetos aromáticos de tiossemicarbazonas com atividade contra o *Plasmodium falciparum*, parasita responsável por transmitir a malária (DUAN; ZHANG, 2011).

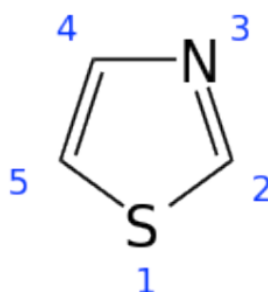
3.6 Tiazóis

O tiazol é um composto orgânico, heterocíclico, que possui estrutura em anel com cinco membros, contendo três carbonos, um enxofre e um átomo de nitrogênio e fórmula molecular C_3H_3NS (Figura 9) (KASHYAP et al., 2012; SIDDIQUI et al., 2011).

O anel tiazólico está presente em diversos produtos naturais e sintéticos e podem apresentar diversas atividades biológicas que estão diretamente relacionadas a modificações em várias posições do anel (SIDDIQUI et al., 2011).

O tiazol é utilizado como intermediário para fabricação de fármacos sintéticos, fungicidas e corantes. É também encontrado naturalmente na vitamina B1 (tiamina) (KASHYAP et al., 2012; SIDDIQUI et al., 2009).

Figura 9 - Estrutura do núcleo tiazol.



Em um estudo realizado por Gomha, Ahmed, Abdelhamid (2015) foram sintetizados doze novos compostos derivados do tiazol e avaliados quanto a sua atividade antitumoral. Os compostos foram avaliados contra as linhagens tumorais de carcinoma de mama humano (MCF-7) e carcinoma hepatocelular humano (HepG2). O composto 4-Metill-2-(2-(1-(5-metil-1-fenil-1H-1,2,3-triazol-4-il)etileno)hidrazinil)-5-(fenildiazenil)-tiazolapresentou a melhor atividade antiproliferativa ($IC_{50}=1,19$ e $3,4 \mu M$, respectivamente).

Uma série de derivados arilideno-hidrazinil-tiazol foram sintetizados e tiveram sua citotoxicidade *in vitro* avaliada em duas linhagens de carcinoma

humano (MDA-MB231 e HeLa). O derivado 2-(2-benzilideno-hidrazinil)-4-metiltiazol exibiu atividade antiproliferativa significativa para a linhagem MDA-MB-231 ($IC_{50} = 3,92 \mu\text{g/mL}$) (GROZAV et al., 2014).

Turan-Zitouni et al.(2016) sintetizaram 10 novos derivados bis-tiazóis e testaram sua atividade antiproliferativa contra linhagens de adenocarcinoma de pulmão humano (A549), glioma de rato (C6), fibroblasto embrionário de rato com transformação do oncogenes H-ras (5RP7) e fibroblasto embrionário de camundongo (NHI/3T3) pelo método do MTT. O composto 3,30-dimetoxi-N4,N40-bis(4-(4-bromofenil)tiazol-2-il)-[1,10-bifenil]-4,40-diamina foi identificado como o agente anticâncer mais promissor por inibir notavelmente células de A549 e C6 e apresentar baixa toxicidade na linhagem NHI/3T3. Além disso,ele foi capaz de inibir a síntese de DNA em células A549 pelo método BrdU.

Derivados amino tiazóis apresentaram atividade antineoplásica por inibir a ação da tirosina quinase e induzir a morte celular por apoptose em mastócitos humanos com mutação em D816V KIT, que confere característica de células com resistência a inibidores tirosina quinase (JIN et al., 2014).

Abdellatif et al. (2015) testaram a atividade antimicrobiana de uma série de novos dialquilaminoalquil-o-cresóis incorporados com núcleos de purina, benzotiazóis ou tiazóis. Neste estudo foi possível observar que os compostos que continham o núcleo tiazol em sua estrutura apresentaram melhor atividade antimicrobiana. A substância 4-(2-amino-4-p-tol-il-tiazol-5-ilazo)-2-dimetilaminometilfenol apresentou a melhor atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *S. aureus* Meticilina Resistente (MRSA) e *Candida albicans* com MIC de 200, 12,5, 12,5, 12,5, 12,5 μM , respectivamente.

Uma série de 1,3,4-tiadiazóis incorporados com o radical 1,3 tiazol foi sintetizada e avaliada quanto a sua atividade antimicrobiana. Foram utilizadas quatro espécies de fungos *Aspergillus flavus*, *Syncephalastrum racemosum*, *Geotricum candidum*, e *Candida albicans*, duas bactérias Gram-positivas *Streptococcus pyogenes* e *Bacillus subtilis* e duas bactérias Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.

Os compostos 5-[(5-fenilazo-tiazol-4-ona-2-idileno)hidrazono]acetil-2-benzoilimino-3-fenil-1,3,4 tiadiazol, 5-[(3-amino-4-metil-5-(4-clorofenilazo)-tiazol-2-idileno)hidrazono]acetil-2-benzoilimino-3-fenil-1,3,4-tiadiazol e 5-[(3-(2-

benzoilimino-3-fenil-1,3,4-tiadiazol-5-idileno)acetil)amino-4-oxi-5-(4 metilfenilazo)-tiazol-2-idileno)hidrazono]acetil-2-benzoilimino-3-fenil-1,3,4-tiadiazol apresentaram atividade antimicrobiana superior aos fármacos de referência testados em relação a alguns micro-organismos. Este aumento da atividade se deve provavelmente a incorporação do anel tiazólico à estrutura (FARGHALY et al., 2015).

Uma extensa revisão de literatura realizada por Mishra, Kumari e Tiwari (2015) relatou a atividade de derivados do tiazol sobre o sistema nervoso central em diversos alvos tais como receptores da adenosina, dopamina, 5-HT (serotonina), glutamato, óxido nítrico sintase do tipo neuronal (nNOS), ácido γ aminobutírico (GABA), acetilcolina, opiáceos, bem como receptor canabinoide. Também foram relatadas atividade como agentes Anti-Alzheimer, neuroprotetores e anticonvulsivantes.

Estudos *in vivo* e *in vitro* também têm demonstrado derivados do tiazol como moléculas anti-inflamatórias com capacidade de inibir a ação da ciclooxigenase (COX) (El-Achkar et al., 2015).

Estudos recentes demonstraram a atividade anti-*Trypanosoma cruzi* de novos derivados 2-(piridin-2-il)-1,3-tiazol obtidos a partir do 2-piridinatiosemicarbazona. Os novos análogos apresentaram melhor atividade tripanossomicida que as tiossemicarbazonas de origem. A maioria dos compostos são inibidores da cruzaina e apresentaram inibição sobre a forma tripomastigota do parasito. Os compostos (2-(2-(Piridin-2-ilmetileno)hidrazinil)-4-(2,4-diclorofenil)-1,3-tiazol e (2-(2-(Piridin-2-ilmetileno)hidrazinil)-4-(3,4-diclorofenil)-1,3-thiazol se apresentaram como os tiazóis mais promissores com valor de $IC_{50}=1.2\mu M$ para cada composto. Este estudo demonstrou que esta série de tiazolil hidrazonas pode levar ao desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da doença de Chagas (CARDOSO et al., 2014).

3.7 Tiazolinonas

Tiazolinonas são compostos bioisósteros do tiazol e também são conhecidos por algumas atividades biológicas importantes.

Chen et al. (2007) descobriram que derivados de quinolinil-metileno-tiazolinona são potentes inibidores seletivos de CDK1 (quinase dependente de

ciclina), moléculas que atuam no controle e na progressão do ciclo celular. Dentre os compostos que apresentaram atividade sobre CDK1, os quatro melhores tiveram sua atividade antiproliferativa testada em linhagens de câncer de cólon (HCT 116, SW480, RKO), pulmão (H460a), mama (MDA435) e osteosarcoma (SJSA1). Os compostos apresentaram atividade antiproliferativa contra todas as linhagens testadas e suas IC₅₀ variaram entre 1-7 µM, destacando-se, assim, como compostos com excelente atividade antiproliferativa.

Leite et al. (2006) sintetizaram novos derivados 4-tiazolinônicos associados a derivados peptídicos. Foram testados seis compostos contra a linhagem de Sarcoma-180 em camundongos. Ao tratar os animais diariamente durante oito dias com uma dose de 250 mg/kg foi possível observar que a redução do tumor variou de 58-80%. Destacaram-se os produtos que continham resíduos de fenilalanina (80% de inibição) e o que continha resíduos de prolina (78% de inibição).

Estudos realizados demonstraram que derivados 4-tiazolinônicos apresentaram atividade antimicrobiana por inibir a MurB (enzima que atua na síntese de peptideoglicano). Esta atividade provavelmente ocorreu devido aos novos derivados atuarem mimetizando moléculas de difosfato (ANDRES et al., 2000).

Derivados do 5-benzilideno-2-fenil-tiazolinona apresentaram atividade anti-inflamatória por inibir a 5-lipoxigenase (5-LO). O composto (Z)-5-(4-metoxibenzilideno)- 2-(naftalen-2-il)-5H-tiazol-4-ona apresentou-se como um potente inibidor direto da 5-LO e não citotóxico com IC₅₀ de 0,08 µM e 0,12 µM para ensaio livre de células e células intactas, respectivamente. A caracterização desta atividade inibidora da 5-LO e da ausência da citotoxicidade foi atribuída à presença da porção tiazolinona na estrutura da molécula (BARZEN et al., 2012).

Ao avaliar novos derivados de 4-tiazolinonas contra *Trypanosoma cruzi*, Moreira et al (2012) identificou o composto 2-(1-fenoxipropan-2-ilidene)hidrazona-3-fenil-5-isopropiltiazolidin-4-ona (**18**) com alta eficiência tripanossomicida. Esta substância foi capaz de inibir a proliferação das formas epimastigotas e a morte das formas tripomastigotas, mas não foi capaz de causar toxicidade em esplenócitos de camundongos. Assim, concluíram que esta

classe de compostos heterocíclicos pode ser utilizados como protótipos para o desenvolvimento de novos agentes antichagásicos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

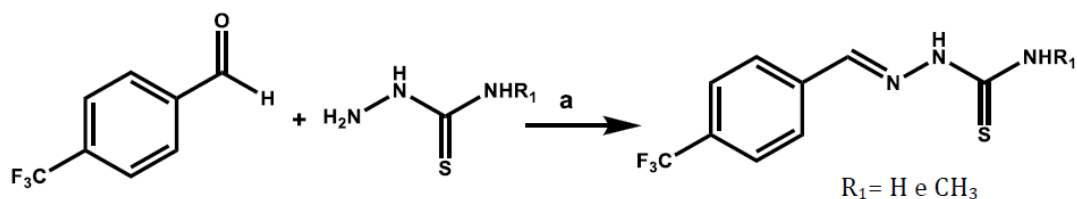
4.1 Obtenção dos derivados

Os derivados pertencentes as classes de tiazóis, tiazolinonas e tiossemicarbazonas foram fornecidos pelo Laboratório de Planejamento em Química Medicinal (LpQM) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), coordenado pela Profa. Dra. Ana Cristina Lima Leite.

Um total de 30 moléculas foram fornecidas, sendo três tiossemicarbazonas. A Figura 10 apresenta o esquema dos derivados tiossemicarbazônicos e seus radicais são apresentados na Tabela 1.

As amostras foram codificadas por (E)-2-(4-(trifluorometil)benzilideno)hidrazinacarbotoamida (**MB 01**), (E)-N-metil-2-(4-(trifluorometil)benzilideno)hidrazinacarbotoamida (**MB 02**) e (E)-N-fenil-2-(4-(trifluorometil)benzilideno)hidrazinacarbotoamida (**MB 03**).

Figura 10 - Esquema de obtenção dos derivados tiossemicarbazônicos



[a] 4'-trifluormetil benzaldeído, tiossemicarbazida equivalente, etanol, ácido correspondente, refluxo e temperatura 100° C, por até 48 horas.

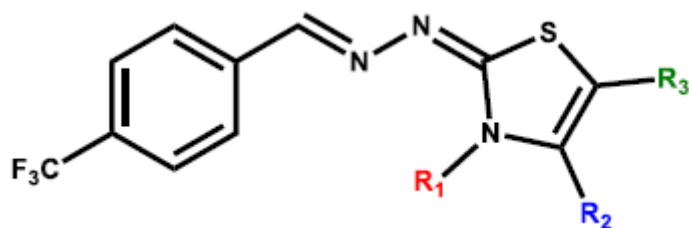
Fonte: Barbosa, 2014.

Tabela 1 - Derivados tiassemicarbazônicos e seus respectivos radicais de substituição.

Composto	R1
MB 01	H
MB 02	CH3
MB 03	Ph

Um total de 19 derivados tiazólicos foram fornecidos. A Figura 11 apresenta esquema dos derivados do tiazol e suas identificações e radicais são apresentados na Tabela 2.

Figura 11 - Esquema dos derivados aril-1,3-tiazóis.



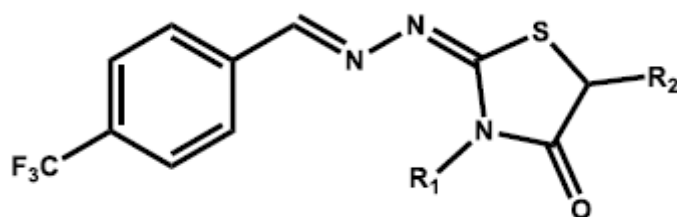
Fonte: Barbosa, 2014.

Tabela 2 - Derivados tiazóis e seus respectivos radicais de substituição.

Composto	R1	R2	R3
MB 1.1	H	Ph-Ph	H
MB 1.2	H	Ph-4'-NO ₂	H
MB 1.3	H	Ph-3'-NO ₂	H
MB 1.4	H	Ph-2',4'-diCl	H
MB 1.5	H	Ph-4'-MeO	H
MB 1.6	H	Ph-4'-Cl	H
MB 1.7	H	Ph-4'-Br	H
MB 1.8	H	Ph-3',4'-diCl	H
MB 1.9	H	Ph-Ph	CH ₃
MB 1.10	H	Ph-2'-naftil	H
MB 1.11	H	Ph-4'-CH ₃	H
MB 1.12	H	Ph-4'-F	H
MB 2.1	CH ₃	Ph-4'-MeO	H
MB 2.2	CH ₃	Ph-4'-NO ₂	H
MB 2.4	CH ₃	Ph-2',4'-diCl	H
MB 3.4	Ph	Ph-2',4'-diCl	H
MB 3.5	Ph	Ph-4'-MeO	H
MB 3.6	Ph	Ph-4'-Cl	H
MB 3.12	Ph	Ph-4'-F	H

Além dos derivados do tiazol, também foram fornecidos oito derivados tiazolinônicos. A Figura 12 apresenta esquema dos derivados tiazolinônicos e suas identificações e radicais são apresentados na Tabela 3.

Figura 12 - Derivados aril-4-tiazolinonas.



Fonte: Barbosa, 2014.

Tabela 3 - Novos derivados tiazolinônicos e seus respectivos radicais.

Composto	R1	R2	Composto	R1	R2
MG 1.1	H	Fenil	MG 2.1	CH ₃	Fenil
MG 1.2	H	Metil	MG 2.4	CH ₃	Etil
MG 1.3	H	H	MG 2.5	CH ₃	Isopropil
MG 1.4	H	Etil			
MG 1.5	H	Isopropil			

4.2 Avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro*

4.2.1 Linhagens celulares

As linhagens tumorais utilizadas para a avaliação da atividade antitumoral foram obtidas da seção de culturas celulares do Banco de Células do Rio de Janeiro e mantidas de acordo com o protocolo estabelecido pelo Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram obtidas de doadores saudáveis e serviram como modelo para avaliar a atividade citotóxica sobre células humanas normais (Tabela 4).

Tabela 4 - Linhagens celulares utilizadas nos experimentos de citotoxicidade *in vitro*.

Linhagem celular	Doença	Origem	Meio de cultivo	Concentração (células/mL)
NCI-H292	Carcinoma mucoepidermoide de pulmão	Humana	DMEM	10 ⁵
HEp-2	Carcinoma epidermoide de laringe	Humana	DMEM	10 ⁵
HT-29	Adenocarcinoma de Colón	Humana	DMEM	10 ⁵
HL-60	Leucemia Promielocítica Aguda	Humana	RPMI	0,3 x10 ⁶
K562	Leucemia mieloide crônica	Humana	RPMI	0,3 x10 ⁶
CMSP	Células mononucleares de sangue periférico	Humana	RPMI	1 x 10 ⁶

4.2.2 Manutenção das linhagens celulares

As linhagens celulares foram manuseadas em ambiente estéril de câmara de fluxo laminar vertical (Filterflux) e mantidas em incubadoras de CO₂ a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ (LABOVEN, modelo HF-212 UV).

As linhagens celulares foram cultivadas em garrafas de cultura de células. Os meios DMEM e RPMI 1640 suplementados com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina) foram utilizados. O tipo de meio utilizado variou de acordo com a linhagem celular utilizada (Tabela 4). A repicagem era realizada sempre que o crescimento celular atingia confluência necessária (cerca de 90%). Diariamente acompanhava-se o crescimento das células em microscópio invertido (LEITZ, modelo Diavert).

Para a manutenção de células aderidas, retirava-se o meio, lavava-se a garrafa 2x com PBS (*Phosphate Buffer Solution*) estéril e, em seguida, utilizava-se tripsina + EDTA (0,5%) para que as células se desprendessem da garrafa. Parte das células era removida da garrafa e o volume preenchido com meio completo. Para a manutenção de células suspensas trocava-se apenas parte do meio de cultura.

4.2.3 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (CMSP)

As células mononucleares (linfócitos e monócitos) foram obtidas a partir do sangue periférico de voluntários sadios coletados em tubos tipo *Vacutainer* contendo solução de Heparina (BD Vacutainer®) como anticoagulante. Após a coleta, 6mL de sangue foram diluídos em 3mL de PBS e adicionados vagarosamente em outro tubo contendo 2mL de Ficoll®-Hypaque (Sigma). Em seguida, foi realizada centrifugação a 1.500 rpm por 30 minutos para a separação das fases da solução. Graças ao Ficoll, devido à formação de um gradiente de densidade, as células mononucleares concentraram-se na camada localizada ao meio, entre o plasma (fase clara) e os eritrócitos (fase escura).

As CMSP foram transferidas para outro tubo ao qual foram acrescidos PBS até o volume final de 11mL, sendo então centrifugados por a 1000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de CMSP ressuspendido em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (para obter uma concentração final de 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina). Fitohemaglutinina (Sigma) 2%, um agente mitogênico, foi adicionado ao meio para estimular a proliferação dos linfócitos. As células foram contadas e diluídas para uma concentração final de 1×10^6 células/mL.

4.3 Ensaio de citotoxicidade - MTT

Princípio do teste

Este ensaio baseia-se na conversão do sal brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-tetrazólio (MTT) em cristais de formazan, pela ação da enzima succinil-desidrogenase presente na mitocôndria de células viáveis (ALLEY et al., 1988; MOSMANN, 1983).

Procedimento Experimental

As linhagens de células NCI-H292, HEp-2 e HT-29 foram cultivadas em meio DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (GIBCO®), e a linhagem HL-60 e K562 em meio RPMI 1640, ambos os meios suplementados com 10% de soro fetal bovino (GIBCO®), 1% de solução de antibiótico (penicilina 1000UI/mL e estreptomicina 250mg/mL) e 1% de L-glutamina 200 mM.

Suspensões celulares de 10^5 células/mL (NCI-H292, HEp-2, e HT-29) e $0,3 \times 10^6$ células/mL (K562 e HL-60) foram distribuídas em placas de 96 poços e incubadas a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ durante 24h. Em seguida os derivados do tiazol, tiazolinonas e tiossemicarbazonas (0,098 - 25 µg/mL) foram adicionados às placas. Após 69 horas de incubação dos produtos, foi adicionado em cada poço 25 µL de MTT (5 mg/mL). Após 3 h de incubação, o meio de cultura com MTT foi aspirado e 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado a cada poço para a dissolução dos cristais de formazan. A doxorrubicina (0,625 a 10 µg/mL) foi o fármaco de referência utilizado como controle positivo. A leitura óptica foi realizada em leitor automático de microplacas (560 nm). Cada amostra foi testada em triplicata em três experimentos independentes. A concentração que inibe 50% do crescimento celular em relação ao controle (CI₅₀) foi calculado a partir da regressão não linear no programa *GraphPad Prism* 5.0.

Para a análise do efeito tempo e concentração-dependente, este método também foi realizado após 24 e 48 h de tratamento com o melhor produto de cada classe na linhagem K562.

4.4 Ensaio do Alamar Blue: Avaliação da atividade citotóxica em células mononucleares do sangue periférico humano

Recentemente identificado como resazurina, o alamar Blue (AHMED; GOGAL; WALSH, 1994) é um indicador fluorescente e colorimétrico, com propriedades redox. O alamar blue é reduzido à resofurina na presença de células viáveis. A forma reduzida é de cor rosa (fluorescente/célula viável) e a forma oxidada é azul (não fluorescente/ célula não viável)

Procedimento experimental

Inicialmente, células na concentração de 1×10^6 células/mL foram plaqueadas em placas de 96 poços. Após 24 h de incubação, as amostras foram dissolvidas em DMSO e adicionadas em cada poço e incubadas por 72 h. Doxorrubicina (0,078 a 10 μ M) foi utilizada como controle positivo. Vinte e quatro horas antes do final do período de incubação, 10 μ L da solução estoque de alamar blue (0,312 mg/mL) foi adicionado a cada poço. As absorbâncias foram medidas nos comprimentos de onda de 570 nm (estado oxidado) e 595 nm (estado reduzido), utilizando um espectrofotômetro de placa.

Análise dos dados

A redução do alamar blue reflete a proliferação celular. A proliferação celular foi calculada utilizando a seguinte fórmula: $\% \text{ proliferação} = \frac{ALW - (AHW \times R_0)}{ALW} \times 100$, onde, ALW e AHW são as absorbâncias no menor e maior comprimento de onda, respectivamente. O R_0 foi calculado utilizando a seguinte fórmula: $R_0 = A_{OLW}/A_{OHW}$, onde, A_{OLW} e A_{OHW} são as absorbâncias do meio isolado subtraído das absorbâncias do meio adicionado ao alamar blue nos comprimentos de onda menor e maior, respectivamente.

4.5 Ensaio de atividade hemolítica

Princípio do Teste

Este método baseia-se na capacidade de substâncias em causar lesões na membrana de eritrócitos, seja pela formação de poros ou pela lise total da hemácia (COSTA-LOTUFO et al., 2002).

Procedimento experimental

Após a coleta, o sangue foi diluído em 150 mL de solução salina (NaCl 0,85% + CaCl_2 10mM). Os eritrócitos foram lavados três vezes em solução de

NaCl contendo cloreto de cálcio e centrifugados por 5 minutos a 1500 rpm. Após a terceira centrifugação foi preparada uma suspensão de eritrócitos a 2% em solução salina. Foram utilizadas placas de microdiluição contendo 96 poços. Cada poço da primeira coluna recebeu 100 µL de solução salina. Os poços da segunda coluna receberam 80 µL de solução salina e 20 µL de veículo de diluição das amostras teste (DMSO 50%). Os poços da 3ª coluna receberam 80 µL de solução salina e 20 µL de Triton X-100 a 1% (controle positivo). As diluições seriadas foram realizadas entre a 4ª a 12ª coluna, inicialmente cada poço da primeira linha recebeu 100 µL de solução salina e 100 µL de amostra na concentração de 1000 µg/mL. Em seguida, no sentido vertical foram realizadas as diluições seriadas (1:2) com concentração variando de 250 a 0,98 µg/mL. Também foi adicionado 100 µL da suspensão de eritrócitos a 2% em todos os poços, exceto no branco. Posteriormente a placa foi mantida em temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) sob agitação constante, por 1 h. Após este período, a placa foi centrifugada por 10 min a 2000 rpm e o sobrenadante transferido para outra placa para que pudesse ser realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro de placa a 450 nm. A hemólise foi determinada de maneira relativa ao valor dos controles negativo e positivo.

Análise dos resultados

Os resultados foram expressos como médias e respectivos erros-padrão. As amostras foram testadas em diluições seriadas. Um gráfico foi plotado pela absorbância x concentração e determinada a concentração efetiva média capaz de provocar 50% do efeito máximo (CE_{50}) e seu respectivo intervalo de confiança (IC95%) para cada amostra. Os resultados foram obtidos a partir da regressão não-linear utilizando o programa GraphPad Prism, versão 5.0.

4.6 Aspectos éticos para o ensaio do *alarmar blue* e ensaio de atividade hemolítica

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Pernambuco que está de acordo com a

resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e aprovado com parecer CAAE 62919816.2.0000.5208.

4.7 Análise de citometria de fluxo

As células da linhagem K562 (3×10^5 células/mL) foram ressuspensas em meio RPMI-1640 e tratadas com o composto MB 1.4 durante 48 h a 37 ° C com 5% de CO₂. O ensaio de viabilidade celular foi realizado utilizando o kit de detecção *via count* (Guava technologies) e os ensaio de ciclo celular e fragmentação do DNA utilizando o kit de detecção *cell cycle* (Guava technologies) de acordo com as instruções do fabricante. O experimento foi realizado em citometro de fluxo Guava EasyCyteHT (Merck-Millipore), adquirindo 5.000 eventos. Os dados foram analisados no software Guava-Soft™ versão 2.7. Foram realizadas duas experiências independentes, em duplicata.

4.7.1 Análise do ciclo celular e fragmentação do DNA

Princípio do teste

Este ensaio baseia-se na capacidade do iodeto de propídeo se ligar ao DNA. Primeiramente, para facilitar a entrada do iodeto de propídeo nas células e permitir a sua ligação ao DNA das células, um detergente é adicionado para permitir a permeabilidade da membrana celular. O iodeto de propídeo é capaz de se intercalar proporcionalmente à quantidade de DNA da célula o que permite diferenciar as fases do ciclo celular por meio da quantidade de DNA em cada fase do ciclo.

Procedimento experimental

As células da linhagem K562 foram cultivadas em placas de 24 poços e incubadas com o composto MB 1.4 (17 e 34 μ M) durante 48 horas. O controle negativo foi tratado com solução de NaCl + (DMSO 0,1%) e a doxorubicina 0,2 μ M foi utilizada como controle positivo.

Transcorrido o período de incubação, 200 µL das amostras foram transferidos para tubos de poliestireno. Em seguida foram centrifugados por cinco minutos a 450 x g. O sobrenadante foi removido e foram adicionados 200 µL de PBS. Em seguida as células foram homogeneizadas e centrifugadas nas mesmas condições. O sobrenadante foi removido e 200 µL de etanol gelado foram adicionados. Os tubos foram fechados e permaneceram em geladeira por uma hora. Após esse período, as células foram novamente centrifugadas nas condições estabelecidas anteriormente, o sobrenadante foi removido e o *pellet* lavado com PBS (200 µL) e centrifugado. Foi retirado 150 µL do sobrenadante e adicionado 50 µL do reagente *guava cell cycle*. A suspensão celular foi homogeneizada e permaneceram por 20 minutos em ambiente escuro e em seguida sua leitura realizada em citômetro de fluxo, utilizando o sistema Guava EasyCyteHT (Merck-Milipore). O software Guava-Soft™ versão 2.7. Cinco mil eventos foram analisados por amostra e os debris omitidos das análises.

Análise dos dados

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média. Os experimentos foram realizados em triplicata em dois experimentos independentes. As diferenças estatísticas entre os grupos foram realizadas através da análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Dunnet. As amostras foram consideradas significativas com $p < 0,05$.

4.7.2 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial

Princípio do teste

A rodamina 123, corante de característica fluorescente e nucleofílica, é capturada pela mitocôndria. Quando a mitocôndria apresenta seu potencial transmembrânico inalterado é possível observar alta fluorescência quando a rodamina é excitada pelo laser. Porém, quando há alterações neste potencial transmembrânico, é possível observar o efluxo de rodamina de dentro da mitocôndria. Este fenômeno é possível por gerar eventos que emitirão menor fluorescência quando comparados a fluorescência das células intactas. Assim,

neste ensaio é possível verificar se há envolvimento da mitocôndria no processo de morte celular, seja ele por dano ou despolarização mitocondrial.

Procedimento experimental

As células da linhagem K562 ($0,3 \times 10^6$ células/mL) foram cultivadas em placas de 24 poços e incubadas com o composto MB 1.4 (17 e 34 μM) durante 48 horas. O controle negativo foi tratado com DMSO 0,1% e a doxorubicina 0,5 μM foi utilizada como controle positivo.

Transcorrido o período de incubação, 500 μL das amostras foram transferidos para tubos de poliestireno devidamente identificados. Em seguida foram centrifugados por cinco minutos a 450 x g. O sobrenadante foi removido e foram adicionados 500 μL de PBS. Em seguida as células foram homogeneizadas e centrifugadas nas mesmas condições. O sobrenadante foi removido e 200 μL de solução de rodamina (0,1%) foram adicionados. Os tubos permaneceram abertos por 30 minutos em ambiente escuro.

Após esse período, as células foram novamente centrifugadas nas condições estabelecidas anteriormente, o sobrenadante foi removido e o *pellet* ressuspendidas em PBS (200 μL) e em seguida sua leitura realizada em citômetro de fluxo, utilizando o sistema Guava EasyCyteHT (Merck-Milipore). O software Guava-Soft™ versão 2.7. Cinco mil eventos foram analisados por amostra e os debris omitidos das análises.

Análise dos dados

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Os experimentos foram realizados em triplicata em dois experimentos independentes. As diferenças estatísticas entre os grupos foram realizadas através da análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Dunnet. As amostras foram consideradas significativas com $p < 0,05$.

4.7.3 Avaliação da apoptose por Externalização da Fosfatidilserina

Princípio do teste

Baseia-se na capacidade da fosfatidilserina, um fosfolípido de membrana, localizado na face interna da membrana celular se deslocar para a face externa (superfície celular). Este evento evidencia os primeiros estágios da apoptose. O objetivo do teste é diferenciar as células em viáveis, apoptóticas e necróticas a partir da fluorescência emitida. A fosfatidilserina apresenta uma alta afinidade pela proteína Anexina-V, que quando conjugada a ficoeritrina emite fluorescência verde. Esta fluorescência caracteriza a marcação de células em apoptose. O corante 7-AAD apresenta afinidade ao núcleo da célula e liga-se a ele quando membrana das células se encontram rompidas. Esta ligação emite fluorescência vermelha que caracteriza células em necrose. A reagente Guava® Nexin utiliza a estratégia de coloração dupla o que permite identificar quatro populações celulares distintas: células viáveis (sem marcação), células em apoptose inicial (coloração verde), células em apoptose tardia, estágio em que as células perdem a integridade da membrana (marcada pelos dois corantes verde/vermelho) e células necróticas (coloração vermelha).

Procedimento experimental

As células da linhagem K562 foram cultivadas em placas de 24 poços e incubadas com o composto MB 1.4 (17 e 34 μM) durante 48 horas. O controle negativo foi tratado com DMSO 0,1% e a doxorubicina 0,5 μM foi utilizada como controle positivo. Transcorrido o período de incubação, foi realizada uma centrifugação a 450 g por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e adicionado 200 μL de PBS. Uma alíquota de 50 μL da suspensão celular foi retirada e adicionada a 50 μL de solução do kit Guava Nexin® (Guava Technologies). A reação ocorreu em ambiente escuro por um período de 30 minutos e em seguida sua leitura realizada em citômetro de fluxo, utilizando o sistema Guava EasyCyteHT (Merck-Millopore). O software Guava-Soft™ versão 2.7. Foram analisados cinco mil eventos por amostra e os debris omitidos das análises.

4.8 Ensaios *in vivo*

4.8.1 Animais e aspectos éticos

Para a realização dos experimentos de toxicidade aguda e atividade antitumoral *in vivo* foram utilizados camundongos (n=48) albinos Swiss (*Mus musculus*), machos e fêmeas, pesando entre 30 e 35 g (aproximadamente 60 dias de nascidos), provenientes do Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA e mantidos no Biotério do Departamento de antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

Os animais foram mantidos sob temperatura de $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, em ciclo claro-escuro (12/12h) e água e ração *ad libidum*. Os protocolos experimentais realizados seguiram os princípios técnicos e éticos preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Pernambuco sob o número 23076.037512/2017-08.

4.8.2 Avaliação da toxicidade não-clínica aguda

Os ensaios de toxicidade aguda em camundongos foram realizados de acordo com o OECD “Guidelines for testing of chemicals” n. 423/2001. Camundongos Swiss, três fêmeas por grupo, incluindo o controle, foram submetidos a doses únicas de 300 e 2000 mg/kg do derivado tiazólico MB 1.4 por via intraperitoneal (i.p), e ao grupo controle foi administrado apenas veículo (solução de NaCl + cremophor a 5%). Em princípio, o método não se destina a permitir o cálculo preciso da DL_{50} (apesar de fornecer uma estimativa do seu valor), contudo, permite uma classificação das substâncias em categorias de acordo com o “Globally Harmonized Classification System” – GHS. Ao fim do período de observação de 14 dias, todos os animais sobreviventes foram anestesiados, o sangue coletado por punção cardíaca e eutanasiados em câmara de CO_2 . Os órgãos fígado, rins e baço foram removidos e pesados. O índice dos órgãos foi calculado seguindo a fórmula: Índice = peso do órgão (mg)/peso do animal (g).

4.8.3 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo* em animais portadores do carcinoma ascítico de Ehrlich

As células tumorais (Carcinoma de Ehrlich) foram obtidas de um animal doador portador do tumor. As células foram obtidas por aspiração do líquido ascítico após sete dias de implantação e introduzidas em animais receptores por via intraperitoneal. O número de células implantadas foi de (2×10^6 células/animal) em camundongos machos (n=8). Para implantação, foi considerado o doador que apresentou viabilidade celular maior que 90%. Após 24 horas do implante das células, o derivado MB 1.4 nas doses de 5, 10 e 20 mg/kg, cujas doses foram determinadas a partir dos resultados obtidos no ensaio de toxicidade não-clínica aguda, foi solubilizado em cremophor (5%) e administrados nos animais por via intraperitoneal (i.p.) durante sete dias consecutivos. Cliclofosfamida (CTX), 20 mg/kg, foi utilizada como controle positivo. Ao grupo controle negativo (Controle CAE) foi administrado solução de NaCl 0,9% + cremofor 5%. No dia seguinte após a administração da última dose, os animais foram anestesiados com cetamina (90 mg/kg) + xilazina (9 mg/kg) e seu sangue coletado por punção cardíaca com a finalidade de analisar os parâmetros hematológicos e bioquímicos. Em seguida, os animais foram eutanasiados e o tumor ascítico coletado da cavidade peritoneal. Os órgãos fígado, os rins e o baço foram extirpados, pesados e fixados em formaldeído (10%) para análise histopatológica.

4.8.4 Mecanismo de ação em células do tumor ascítico de Ehrlich

4.8.4.1 Ensaio de viabilidade celular

Este ensaio fundamenta-se na análise de integridade da membrana e na capacidade do iodeto de propídeo (IP) se ligar ao DNA das células cuja membrana esteja rompida (não-viáveis) emitindo alta fluorescência vermelha quando excitado pelo *laser*. As células viáveis, cuja membrana apresenta-se íntegra emite baixa fluorescência (SHAPIRO, 1995).

Procedimento experimental

Após o término do experimento (nono dia), uma alíquota de 100 μ L suspensão de células do tumor ascítico de Ehrlich de animais tratados e controle foram incubadas com 100 μ L do reagente *via count*. Em seguida as células foram incubadas por 10 minutos ao abrigo da luz e analisadas por citometria de fluxo.

Os demais ensaios de citometria de fluxo *in vivo* (ciclo celular, fragmentação do DNA, avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial e avaliação da apoptose por externalização da fosfatidil serina por anexina/7AAD seguiram os mesmos protocolos realizados nos ensaios *in vitro* (pág. 45).

4.8.5 Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos

Amostras de sangue dos animais tratados foram coletados por punção cardíaca após anestesia com cetamina (90 mg/kg) + xilazina (9 mg/kg). Para as análises hematológicas foi utilizado sangue coletado com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) para determinação da série branca e vermelha: leucograma e eritrograma, respectivamente. As análises foram realizadas no aparelho ABX micro 60. Também foi realizada a contagem diferencial dos leucócitos em lâmina corada com May-Grünwald-Giemsa. Para as análises bioquímicas foram utilizados Kits de diagnóstico LABTEST® para leitura em espectrofotômetro. Foram determinados os níveis de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), ureia e creatinina.

4.8.6 Avaliação dos índices dos órgãos

Após a coleta do sangue para análises bioquímicas e hematológicas, todos os animais foram eutanasiados e os órgãos (baço, fígado e rins) extirpados, pesados e examinados macroscopicamente para investigação de mudanças de coloração, hemorragias ou outras alterações. O índice dos órgãos foi calculado seguindo a fórmula: $\text{índice} = \frac{\text{peso do órgão (mg)}}{\text{peso do animal (g)}}$.

4.8.7 Análise histopatológica

Após a pesagem, os órgãos (baço, fígado e rins) foram seccionados, fixados em formalina (solução de formol a 10%) tamponada e após 24 horas foram resseccionados para o processamento histopatológico: desidratação com séries crescentes de álcool (70 a 100%), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina, segundo métodos habituais. Em micrótomo rotativo semi-automático (LEIKA®), os fragmentos tissulares emblocados em parafina, foram seccionados em espessura de 3,0 µm e subsequentemente submetidos à coloração hematoxilina-eosina. Em seguida foram examinados ao microscópio óptico.

4.9 Análises estatísticas

Nos ensaios de citotoxicidade em cultura de células foram calculadas as CI_{50} a partir das curvas dose-resposta por regressão não linear utilizando o programa *GraphPad Prism*® (versão 5). Para os demais ensaios os resultados serão apresentados como média $\pm$ erropadrão da média. As diferenças entre grupos experimentais foram comparadas por ANOVA (análise de variância) seguida pelo teste de Dunnett($p < 0,05$) utilizando o programa *GraphPad Prism*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Experimentos *in vitro*

5.1.1 Triagem citotóxica dos derivados tiossemicarbazônicos, tiazolinônicos e tiazólicos

Foi realizado uma triagem citotóxica de três derivados tiossemicarbazônicos, oito derivados aril-4 tiazolinônicos e 19 novos derivados aril-1,3-tiazol em cinco linhagens de células tumorais. Foram consideradas ativas as substâncias que apresentaram inibição acima de 75% em pelo menos duas linhagens do tipo aderida (NCI-H292, HEp-2 e HT-29) e uma linhagem do tipo suspensão (HL-60 e K562).

Entre as 30 substâncias testadas apenas 12, (E)-2-(2-(4-(trifluorometil)benzilideno)hidrazinil) tiazolidin-4-ona (**MG 1.3**), (E)-5-isopropil-3-metol-2-(2-(4-(trifluorometil)benzilideno) hidrazinil)tiazolidin-4-ona (**MG 1.5**), (E)-3-metil-5-fenil-2-(2-(4-(trifluorometil)benzilideno)hidrazinil) tiazolidin-4-ona (**MG2.1**), (E)-3-metil-5-isopropil-3-metol-2-(2-(4-(trifluorometil)benzilideno)hidrazinil)tiazolidin-4-ona (**MG 2.5**), **MB 01**, **MB 02**, (E)-4-(4-nitrofenil)-2-(2-(4-(trifluorometil)benzilideno)hidrazinil) tiazol (**MB 1.2**), (E)-4-(3-nitrofenil)-2-(2-(4-(trifluorometil)benzilideno)hidrazinil) tiazol (**MB 1.3**), ((E)-4-(2,4-diclorofenil)-2-(2-(4-(trifluorometil)benzilideno) hidrazinil)tiazol (**MB 1.4**), (E)-4-(4-metoxifenil)-2-(2-(4-(trifluorometil)benzilideno)hidrazinil)tiazol (**MB 1.5**), (E)-4-(3,4-diclorofenil)-2-(2-(4-(trifluorometil)benzilideno)hidrazinil)tiazol (**MB 1.8**) e ((E)-4-(4-metoxifenil)-5-metil-2-(2-(4-(trifluorometil)benzilideno)hidrazinil)tiazol (**MB 2.2**) apresentaram os critérios acima (Tabela 5) e em seguida tiveram sua IC₅₀, no período de 72 h, determinadas.

Tabela 5 - Percentual de inibição (%) dos derivados do tiazol, tiazolinonas e tiossemicarbonas *in vitro* pelo ensaio do MTT, no período de 72 horas, frente diversas linhagens de câncer humano na concentração de 25 µg/mL.

	NCI-H292 (%)	HEp-2 (%)	HT-29 (%)	HL-60 (%)	K562 (%)
MG 1.1	47,0 ± 1,9	17,2 ± 0,7	34,5 ± 2,2	47,4 ± 4,3	NT
MG 1.2	87,0 ± 2,0	78,4 ± 3,4	47,5 ± 2,3	54,5 ± 3,5	66,0 ± 2,4
MG 1.3	96,1 ± 1,5	80,9 ± 4,0	78,0 ± 2,1	90,3 ± 1,8	60,4 ± 3,3
MG 1.4	47,7 ± 2,1	25,3 ± 2,3	NT	44,2 ± 1,3	NT
MG 1.5	81,1 ± 0,1	77,4 ± 1,5	77,1 ± 8,1	92,2 ± 1,5	48,6 ± 1,5
MG 2.1	93,8 ± 1,6	92,9 ± 1,0	75,2 ± 1,7	94,8 ± 0,6	89,6 ± 0,5
MG 2.4	67,0 ± 1,3	54,2 ± 2,1	55,4 ± 2,4	75,0 ± 5,9	50,4 ± 1,9
MG 2.5	94,8 ± 0,4	92,9 ± 2,3	81,1 ± 1,7	95,9 ± 1,0	86,2 ± 0,9
MB 01	89,6 ± 2,3	91,8 ± 0,6	85,4 ± 0,1	95,4 ± 0,8	87,2 ± 0,8
MB 02	93,3 ± 0,6	88,1 ± 3,6	88,7 ± 0,4	94,6 ± 1,8	82,6 ± 0,2
MB 03	58,4 ± 1,9	63,6 ± 0,5	74,7 ± 1,9	37,7 ± 2,9	71,16 ± 1,8
MB 1.1	49,8 ± 4,7	34,7 ± 3,3	NT	40,6 ± 0,8	NT
MB 1.2	96,3 ± 1,6	90,0 ± 2,7	59,3 ± 1,8	80,2 ± 2,6	87,2 ± 0,9
MB 1.3	75,1 ± 2,6	84,3 ± 5,5	79,4 ± 1,4	77,4 ± 3,3	75,5 ± 0,5
MB 1.4	96,5 ± 0,3	96,6 ± 0,2	79,5 ± 4,2	91,1 ± 3,0	88,9 ± 0,3
MB 1.5	68,5 ± 5,4	78,2 ± 3,4	76,2 ± 0,4	89,14 ± 0,9	61,5 ± 3,4
MB 1.6	67,7 ± 6,3	33,0 ± 2,6	40,1 ± 3,1	61,4 ± 3,3	50,5 ± 1,2
MB 1.7	64,2 ± 4,2	17,1 ± 1,0	67,4 ± 6,7	46,7 ± 1,7	25,0 ± 1,1
MB 1.8	98,2 ± 4,2	83,5 ± 3,4	84,0 ± 1,6	96,4 ± 3,1	47,8 ± 1,5
MB 1.9	60,9 ± 2,5	29,5 ± 2,3	46,2 ± 2,9	30,9 ± 1,4	25,0 ± 1,8
MB 1.10	35,7 ± 1,0	28,5 ± 2,7	45,8 ± 1,5	39,1 ± 1,7	44,9 ± 3,0
MB 1.11	62,3 ± 3,5	59,9 ± 2,2	42,7 ± 1,9	45,2 ± 2,4	20,9 ± 0,1
MB 1.12	78,8 ± 2,1	62,6 ± 3,9	70,1 ± 1,4	58,1 ± 0,5	61,6 ± 1,4
MB 2.1	68,3 ± 0,4	53,7 ± 3,9	62,5 ± 1,8	67,8 ± 3,4	50,4 ± 1,2
MB 2.2	44,1 ± 2,6	84,8 ± 1,7	75,1 ± 1,1	83,2 ± 0,6	59,8 ± 2,5
MB 2.4	35,7 ± 1,9	33,5 ± 3,0	52,7 ± 1,7	43,5 ± 2,6	69,7 ± 0,4
MB 3.4	38,5 ± 0,6	NT	NT	14,4 ± 1,2	NT
MB 3.5	66,3 ± 4,8	81,8 ± 1,4	58,5 ± 1,9	36,7 ± 0,7	59,2 ± 2,1
MB 3.6	87,8 ± 6,7	58,7 ± 0,6	82,2 ± 0,9	28,4 ± 0,6	59,0 ± 1,5
MB 3.12	41,8 ± 1,1	22,0 ± 0,7	74,6 ± 5,2	26,2 ± 1,3	59,1 ± 2,7

*NT – NÃO TESTADO

5.1.2 Determinação das IC₅₀ dos derivados tiossemicarbazônicos, tiazolinônicos e do tiazol.

A atividade citotóxica *in vitro* de três derivados tiossemicarbazônicos foi avaliada nas linhagens celulares tumorais NCI-H292, HEP-2, HT-29, HL-60 e K562. Entretanto, apenas duas substâncias (**MB 01** e **MB 02**) apresentaram atividade citotóxica superior a 75% de inibição em pelo menos duas linhagens celulares com característica aderente e uma linhagem em suspensão.

Ao analisar os três derivados tiossemicarbazônicos **MB 01**, **MB 02** e **MB 03** (Tabela 5) foi possível observar que a simples adição do grupamento fenila na estrutura foi responsável por reduzir a citotoxicidade do composto **MB03** em células tumorais. No entanto, os compostos **MB 01** (presença de H) e **MB 02** (presença de metila) apresentaram-se promissores quanto a sua capacidade antiproliferativa para todas as linhagens tumorais testadas.

Os compostos **MB 01** e **MB 02** apresentaram atividade citotóxica em todas as linhagens tumorais testadas. No entanto, o composto **MB 01** apresentou melhor atividade para as linhagens NCI-H292, HEP-2, HL-60 e K562 com a IC₅₀ de 10,76, 6,27, 12,74 e 6,42 µM, respectivamente (Tabela 6). Este composto apresentou potente atividade citotóxica na linhagem de Leucemia Mieloide Crônica (K562), com IC₅₀=6,42 µM para esta linhagem e IC₅₀ =80,17 µM em CMSP o que confere uma seletividade de 12,5 vezes maior deste composto para esta linhagem tumoral que para células mononucleares do sangue periférico.

Tabela 6 - Valores de IC₅₀ (μM) de derivados tiossemicarbazônicos contra diferentes linhagens de câncer humano.

Composto	R1	NCI-H292	HEp-2	HT-29	HL-60	K562
----------	----	----------	-------	-------	-------	------

MB 01	H	10,76 9,34 – 12,46	6,27 5,14 – 7,64	9,02 7,66 – 10,62	12,74 11,18 – 14,51	6,42 5,31 – 7,76
MB 02	CH ₃	20,83 16,27 – 26,67	12,58 10,77 – 14,71	5,06 4,38 – 5,85	17,22 13,94 – 21,25	13,25 10,94 – 16,04
Doxorrubicina		0,19 0,15 – 0,24	1,21 0,52 – 2,41	0,69 0,52 – 0,86	0,19 0,16 – 0,21	1,38 1,20 – 1,55

Dentre os 19 novos derivados do tiazol testados em linhagens de células tumorais, seis (**MB 1.2**, **MB 1.3**, **MB 1.4**, **MB 1.5**, **MB 1.8** e **MB 2.2**) apresentaram atividade citotóxica significativa e tiveram sua IC₅₀ determinada (Tabela 7). No ensaio de citotoxicidade em dose única (25 μg/mL), no período de 72 h, apenas os compostos **MB 1.3** e **MB 1.4** apresentaram citotoxicidade significativa para todas as linhagens tumorais testadas, com inibição superior a 75% (Tabela 5).

Compostos que apresentam um grupo fortemente retirador de elétrons (NO₂) na posição *para* (ver Tabela 7), como observado nos compostos **MB 1.2** e **MB 2.2**, apresentam uma grande variação dos valores das IC₅₀ em todas as linhagens tumorais testadas. O composto **MB 1.2** apresentou IC₅₀ variando entre 7,41 - 27,33 μM, enquanto o composto **MB 2.2** apresentou

IC₅₀ entre 11,83 – 47,77 µM. Entretanto, apesar de semelhantes, esta maior variação para o valor da IC₅₀ do composto **MB 2.2** pode estar relacionada a presença de uma metila ligada ao nitrogênio (N3).

A presença do grupo retirador de elétrons (NO_2) no composto **MB 1.2** apresentou melhor resultado para a linhagem de NCI-H292 com $\text{IC}_{50} = 7,41 \mu\text{M}$. Em contrapartida, a adição do grupo retirador de elétrons na posição *meta* (composto **MB 1.3**) parece estar diretamente associado a inibição de todas as linhagens celulares testadas no *screening* citotóxico, entretanto a presença deste grupo na posição *meta* não apresentou bons resultados quando submetidos ao teste para determinação de suas IC_{50} nas linhagens tumorais testadas, exceto na linhagem de K562

Os compostos dissustituídos 2,4-dicloro (**MB 1.4**) e 3,4-dicloro (**MB 1.8**) apresentaram excelente atividade citotóxica com IC_{50} menor que $10 \mu\text{M}$ em quatro linhagens testadas. A variação na posição *meta* e *para* parecem não interferir com a elevada atividade antiproliferativa observada.

O composto **MB 1.5** apresentou citotoxicidade significativa em apenas três linhagens tumorais. A atividade deste composto está relacionada a presença do grupo metóxi na posição *para* do anel aromático.

Para analisar a seletividade dos compostos, foi realizado um ensaio antiproliferativo pelo método do Alamar *Blue*, realizado em Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP) (Tabela 9). A menor concentração capaz de causar citotoxicidade 50% das CMSP para os derivados do tiazol foi $43,03 \mu\text{M}$ para o composto MB 1.4, concentração bem superior ao encontrado para a doxorrubicina (fármaco padrão) IC_{50} de $0,3 \mu\text{M}$. O composto MB1.4 apresentou atividade em todas as linhagens testadas com o melhor resultado para a linhagem de Leucemia Mielóide Crônica (K562).

Ao determinar a IC_{50} dos novos derivados do tiazol em CMSP foi observado que todos os compostos, exceto o composto **MB 2.2**, para a linhagem HT-29, com $\text{IC}_{50} = 47,77 \mu\text{M}$, apresentaram IC_{50} superior em CMSP quando comparadas as linhagens tumorais testadas, tornando esta classe de compostos como uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novos agentes anticâncer. O composto **MB 1.4** apresentou índice de seletividade de 7,85 vezes maior em K562 do que em CMSP.

Tabela 7 - Valores de IC₅₀ (μM) dos novos derivados da série Aril-1,3-tiazóis que apresentaram melhor atividade citotóxica em diferentes linhagens de câncer humano.

Composto	R1	R2	R3	NCI-H292	HEp-2	HT-29	HL-60	K562
----------	----	----	----	----------	-------	-------	-------	------

MB 1.2	H	Ph-4'-NO ₂	H	7,41 6,03 – 9,12	27,33 23,78 – 31,40	>63,56	11,51 10,32 – 12,83	16,86 13,60 – 20,91
MB 1.3	H	Ph-3'-NO ₂	H	22,77 19,85 – 26,11	34,24 31,09 – 37,73	23,89 20,52 – 27,81	29,29 24,91 – 34,42	10,17 8,62 – 12,01
MB 1.4	H	Ph-2',4'-diCl	H	10,41 9,80 – 11,04	7,65 6,77 – 8,65	11,15 8,50 – 14,62	17,80 14,91 – 21,24	5,48 4,60 – 6,52
MB 1.5	H	Ph-4'-MeO	H	>66,17	11,31 9,05 – 14,14	22,74 15,21 – 34,01	3,67 3,05 – 4,41	>66,17
MB 1.8	H	Ph-3',4'-diCl	H	6,57 5,19 – 8,31	10,38 8,23 – 13,10	12,21 10,43 – 14,30	4,23 3,41 – 5,24	>60,06
MB 2.2	CH ₃	Ph-4'-NO ₂	H	>61,37	26,39 22,80 – 30,54	47,77 42,74 – 53,39	11,83 9,65 – 14,53	>61,37
Doxorrubicina				0,19 0,15 – 0,24	1,21 0,52 – 2,41	0,69 0,52 – 0,86	0,19 0,16 – 0,21	1,38 1,20 – 1,55

Oito novos derivados tiazolinônicos também tiveram sua atividade antiproliferativa testada. Entretanto, apenas quatro substâncias (**MG1.3**, **MG 1.5**, **MG 2.1** e **MG 2.5**) apresentaram as condições necessárias para que pudessem ser determinadas suas IC₅₀ (Tabela 8). Entre os novos derivados tiazolinônicos testados, apenas os compostos **MG 2.1** e **MG 2.5** apresentaram atividade citotóxica em todas as linhagens celulares testadas.

A presença do hidrogênio ligado ao C2 e ao N4 conferiu baixa atividade para o composto **MG 1.3**, entretanto este composto apresenta uma seletividade aparente para células da linhagem do tipo HEP-2. Para que se possa confirmar seletividade para HEP-2 deve-se realizar um triagem citotóxica utilizando um maior painel de células deste subtipo de câncer.

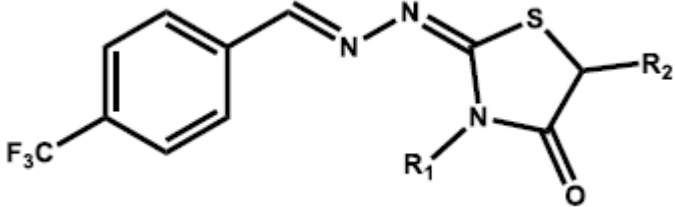
O composto **MG 2.1** apresentou maior atividade que o seu semelhante **MG 1.1**. A diferença entre eles ocorreu devido a presença do radical metila ligado ao N4 (Ver Tabela 3). Seu análogo **MG 1.1** não apresentou citotoxicidade significativa em nenhuma das linhagens testadas (Tabela 5). A atividade atribuída ao composto **MG 2.1** é provavelmente relacionada a maior lipossolubilidade conferida pela presença do radical metil.

Ao analisar a semelhança entre os compostos **MG 1.5** e **MG 2.5** é possível observar que a presença do radical metila no composto **MG 2.5** foi capaz de potencializar a atividade antitumoral deste composto, possivelmente por melhorar sua lipossolubilidade, conseqüentemente sua melhor penetração na membrana celular.

O composto **MG 2.5** apresentou o melhor resultado dentre as oito substâncias analisadas. Com valores de IC₅₀ menor que 10 µM para as linhagens de células tumorais HT-29, HL-60 e K562. Destaca-se sua atividade em linhagem de Leucemia Mielóide Crônica (K562) por apresentar o melhor resultado de IC₅₀ (7,27 µM).

Quando testados em CMSP, todos os novos derivados tiazolinônicos apresentaram IC₅₀ superior às encontradas para células tumorais. O derivado **MG 2.5** apresentou índice de seletividade 6,31 vezes maior para a linhagem K562 quando comparadas as CMSP.

Tabela 8 - Valores de IC50 (μM) das tiazolinonas contra diferentes linhagens de câncer humano.

Composto	R1	R2	NCI-H292	HEp-2	HT-29	HL-60	K562
							
MG 1.3	H	H	21,79 17,79 – 26,74	7,52 6,86 – 8,22	34,53 28,75 – 41,46	34,53 28,75 – 41,46	>87,03
MG 1.5	H	Isopropil	37,01 31,09 – 44,06	36,71 32,03 – 42,02	27,60 22,77 – 33,43	27,60 22,77 – 33,43	>75,91
MG 2.1	CH ₃	Fenil	5,04 4,08 – 6,23	12,77 11,55 – 14,07	11,90 9,57 – 14,84	11,91 9,56 – 14,83	15,16 13,08 – 17,56
MG 2.5	CH ₃	Isopropil	18,96 16,35 – 21,98	12,87 11,97 – 13,83	8,06 7,21 – 9,00	7,82 7,23 – 8,46	7,27 6,23 – 8,48
Doxorrubicina	-	-	0,19 0,15 – 0,24	1,21 0,52 – 2,41	0,69 0,52 – 0,86	0,19 0,16 – 0,21	1,38 1,20 – 1,55

5.1.3 Atividade hemolítica em eritrócitos humanos

Neste ensaio, substâncias que apresentem concentração eficaz capaz de causar hemólise em 50% dos eritrócitos humanos (CE_{50}) < 250 $\mu\text{g/mL}$ são consideradas ativas. Todas as substâncias foram testadas com concentração variando de 0,97 a 250 $\mu\text{g/mL}$. Nenhuma das substâncias testadas foi capaz de causar hemólise significativa nas concentrações testadas (Tabela 9), o que representou CE_{50} superior a 250 $\mu\text{g/mL}$. Alterações na estrutura da membrana do eritrócito podem ser observadas quando em contato com diversas drogas. Estas alterações podem causar interrupção da estrutura da membrana ou a formação de poros, através do qual ocorre a liberação de hemoglobina, ocasionando o efeito conhecido como hemólise (AKI; YAMAMOTO, 1991). A ausência de atividade hemolítica para as substâncias testadas pode inferir que o mecanismo citotóxico observado não esteja relacionado com a indução de lise imediata ou instabilidade da membrana plasmática, mas provavelmente associada a um mecanismo de morte celular mais específico.

Tabela 9 - Atividade hemolítica e citotoxicidade em CMSP de derivados tiossemicarbazônicos, tiazolinônicos e do tiazol.

Amostras	Atividade hemolítica (CE_{50})	CMSP (CI_{50})
MG.1.3	> 250 $\mu\text{g/mL}$	178,6 μM
MG 1.5	> 250 $\mu\text{g/mL}$	171,6 μM
MG 2.1	> 250 $\mu\text{g/mL}$	66,2 μM
MG 2.5	> 250 $\mu\text{g/mL}$	45,9 μM
MB 01	> 250 $\mu\text{g/mL}$	80,2 μM
MB 02	> 250 $\mu\text{g/mL}$	93,3 μM
MB 1.2	> 250 $\mu\text{g/mL}$	53,2 μM
MB 1.3	> 250 $\mu\text{g/mL}$	150,5 μM
MB 1.4	> 250 $\mu\text{g/mL}$	43,0 μM
MB 1.5	> 250 $\mu\text{g/mL}$	130,4 μM
MB 1.8	> 250 $\mu\text{g/mL}$	65,6 μM
MB 2.2	> 250 $\mu\text{g/mL}$	139,6 μM
Doxorrubicina	NT	0,4 μM

* CE_{50} : Concentração efetiva em que a substância testada possui em causar hemólise em 50% dos eritrócitos. Resultados expressos em $\mu\text{g/mL}$ (μM).

*NT – Não testado

A partir dos resultados obtidos, foi realizado um estudo do comportamento citotóxico em relação ao tempo. Foram escolhidos os melhores compostos de cada classe: MB 01, MB 1.4 e MG 2.5. Em seguida foi realizado o ensaio de

atividade antiproliferativa nos períodos de 24 e 48 h de tratamento em K562. Este procedimento foi utilizado para escolher o melhor composto, o melhor tempo e a melhor concentração e, em seguida, dar prosseguimento aos estudos de mecanismo de ação *in vitro*. Este processo é importante para que as alterações celulares provenientes da ação da substância ocorram no menor período de tempo possível e para que não haja morte de todas as células analisadas. Após determinadas as IC₅₀ destes compostos no período de 24 e 48 h os dados foram comparados com as suas IC₅₀ no período de 72 h (Tabela 10).

Tabela 10 - Potencial citotóxico dos derivados MB 01, MB 1.4 e MG 2.5 frente à linhagem de K562 após 24, 48 e 72 horas de tratamento.

SUBSTÂNCIA	CI ₅₀ (μM)		
	Intervalo de confiança 95%		
	24 h	48 h	72 h
MG 2.5	>72,81	>72,81	7,27 6,23 – 8,48
MB 01	>101,12	33,98 28,60 – 40,41	6,42 5,31 – 7,76
MB 1.4	>60,06	17,78 14,56 – 21,91	5,48 4,60 – 6,52

Todos os compostos apresentaram baixa citotoxicidade sobre a linhagem K562 até 24 horas de tratamento, não sendo viável calcular os valores de IC₅₀. O composto MG 2.5 apresentou atividade somente após 72 h de incubação. Para a linhagem celular testada, os compostos MB 01 e MB 1.4 apresentaram atividade citotóxica tempo-dependente, com seu efeito máximo após 72 h de tratamento.

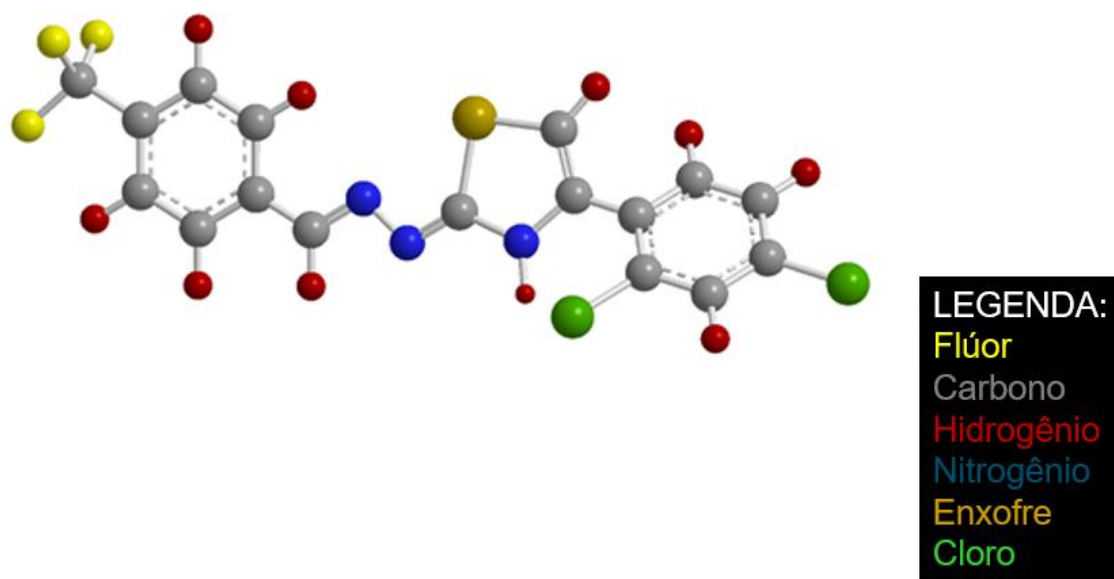
5.1.4 Mecanismo de ação *in vitro* do derivado MB 1.4 em K562

Para darmos continuidade aos estudos de mecanismo de ação *in vitro*, descartamos inicialmente o uso do derivado MG 2.5 por apresentar somente atividade no período de 72 h em células do tipo K562. Assim, escolhemos o derivado MB 1.4 por apresentar uma melhor atividade no período de 48 e 72 h quando comparado ao MB 01, além disso, o derivado MB 1.4 se trata de uma molécula inédita.

A escolha da linhagem celular do tipo K562 se deu porque o derivado MB 1.4 apresentou um bom resultado para esta célula no ensaio citotóxico em 48 e 72 h e por se tratar de uma célula de característica em suspensão o que otimiza os trabalhos em citômetro de fluxo. A Figura 13 mostra a estrutura molecular do composto MB 1.4.

As concentrações 17 e 34 μM foram determinadas a partir do valor da CI_{50} obtido através do método do MTT no período de 48 h em células da linhagem K562. Solução de NaCl + veículo (DMSO 0,1%) foi utilizado como controle negativo e a doxorubicina, controle positivo, na concentração de 0,5 μM para os demedida do potencial transmembrânico mitocondrial e ensaio de morte celular por anexina/7AAD e 0,2 μM para o ensaio de ciclo celular e fragmentação do DNA.

Figura 13 - Estrutura molecular do derivado MB 1.4 ((E)-4-(2,4-diclorofenil)-2-(2-(4(trifluorometil)benzilideno) hidrazinil)tiazol.



5.1.4.1 Ensaio do Potencial Transmembrânico Mitocondrial

Diversos fármacos antitumorais atuam sobre as mitocôndrias. Assim, avaliamos por citometria de fluxo se há envolvimento da mitocôndria no mecanismo de morte celular. O ensaio baseou-se na incorporação da rodamina 123 em células tratadas com o composto MB 1.4 após 48 horas de tratamento.

O objetivo foi avaliar a capacidade do derivado tiazólico produzir alterações no potencial transmembrânico mitocondrial.

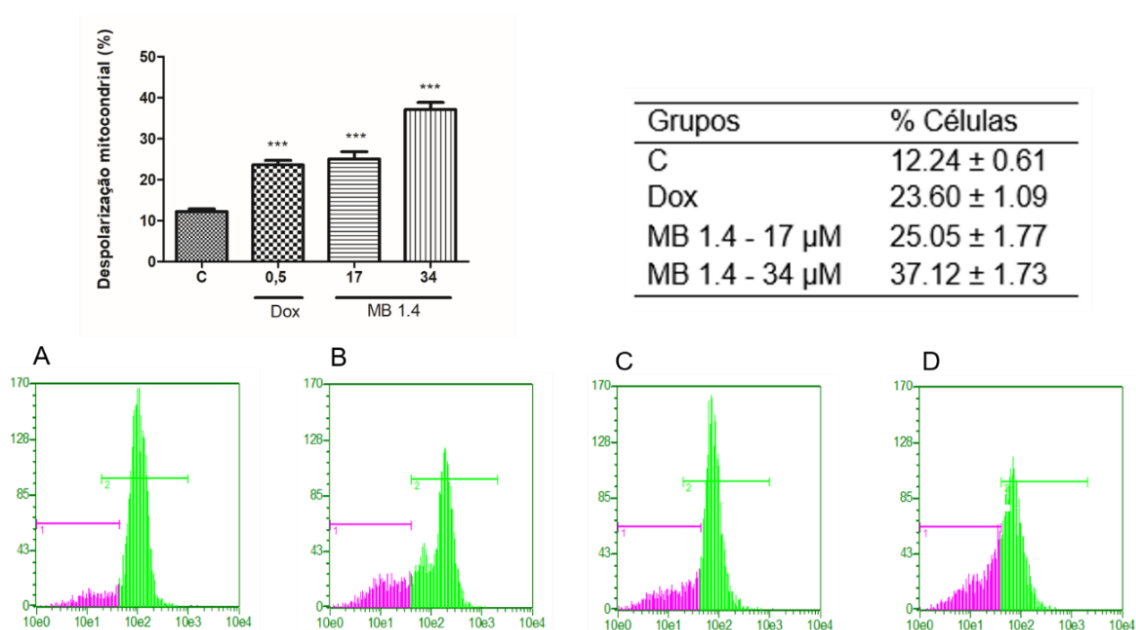
Neste estudo, nos avaliamos a capacidade do derivado MB 1.4 (17 e 34 μM) em produzir mudanças no potencial transmembrânico mitocondrial após 48 h de tratamento. O composto MB 1.4 foi capaz de induzir despolarização mitocondrial em 25,05% e 37,12% das células tratadas com o composto MB1.4 nas concentrações de 17 e 34 μM , respectivamente. O controle positivo doxorrubicina apresentou despolarização de 23,60% enquanto o controle negativo apresentou 12,24% de despolarização mitocondrial (Figura 14).

A integridade da mitocôndria e as funções bioenergéticas celulares é mantida pela estabilização do potencial de membrana mitocondrial. Durante a indução de morte celular por apoptose induzida por fármacos é possível observar alteração mitocondrial e o evento responsável por esta alteração é a perda do potencial de membrana mitocondrial. Este evento está relacionado aos eventos iniciais ocorridos durante o processo de apoptose (RAMYA et al., 2017).

A despolarização do potencial de membrana mitocondrial é uma das principais características de morte celular induzida por apoptose (SHARMA et al., 2012).

Hsiung e Kadir (2011) observaram que a despolarização mitocondrial é capaz de induzir a ativação de caspase-3 e consequente externalização de fosfatidil serina (PS) na membrana plasmática das células tratadas com substâncias isoladas de plantas e assim demonstrou o papel da despolarização no processo de morte celular por apoptose.

Figura 14 - Efeito do composto MB 1.4 e doxorrubicina sobre a linhagem celular K562 determinado sobre citometria de fluxo sobre a despolarização mitocondrial após 48 h de incubação.



O controle negativo (A) foi tratado apenas com veículo (DMSO) a 0.1%. Doxorrubicina (B) 0,5 µM e o derivado MB 1.4 (17 e 34 µM), C e D, respectivamente. Os experimentos foram realizados em triplicata em dois experimentos independentes. *** $p < 0.0001$ em comparação ao grupo controle negativo (C).

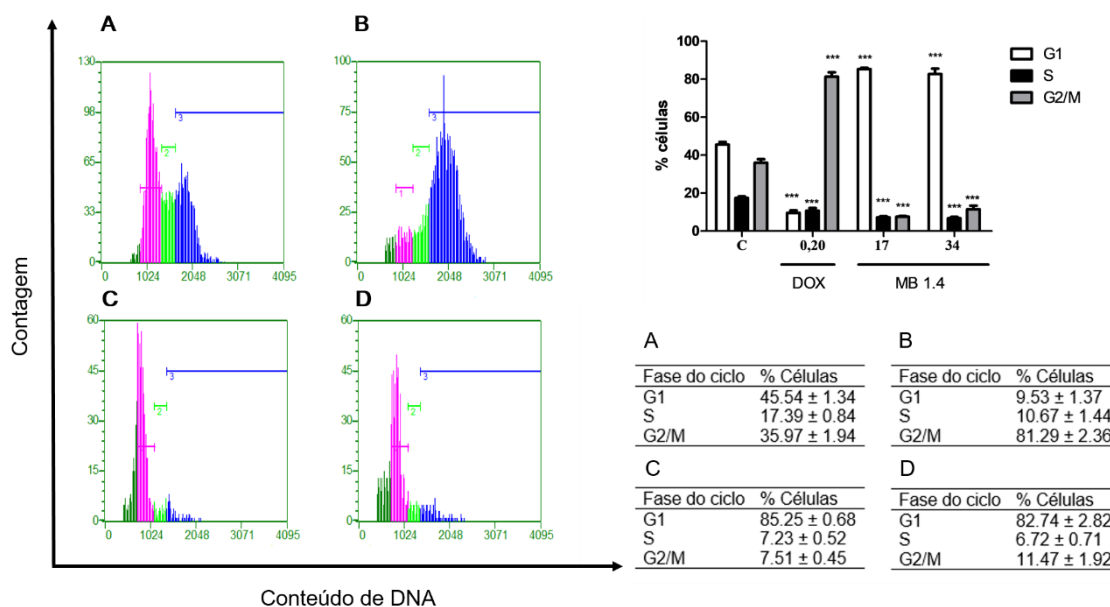
Estudos recentes têm demonstrado que compostos derivados do tiazol são capazes de induzir despolarização da membrana mitocondrial e consequente morte celular por apoptose em células de leucemia mieloide aguda humana (células U937) (HUANG et al., 2016). Semelhantemente, um benzotiazol YLT322 também foi capaz de despolarizar o potencial mitocondrial e desencadear a liberação de citocromo *c* da mitocondrial para o citosol, mostrando o envolvimento desse derivado na via intrínseca da apoptose (XUEJIAO et al., 2013).

Kamal et al. (2014) também observaram que um benzotiazol ligado a fenilpiridopirimidinonas foi capaz de induzir morte celular por apoptose por despolarizar a membrana mitocondrial de células de câncer cervical ME-180 e ativar caspase-3 em células de câncer cervical da linhagem ME-180.

5.1.4.2 Análise do ciclo celular

Neste estudo, as células da linhagem K562 foram tratadas com o composto nas concentrações de 17 e 34 μM durante 48 h. Os dados obtidos indicaram claramente que este composto induz parada de ciclo celular na fase G1 quando comparado as células não tratadas. O derivado MB 1.4 (17 e 34 μM) apresentou 85,25% e 82,74% de células na fase G1 (Figura 15). O controle positivo doxorrubicina, no entanto, apresentou parada de ciclo celular na fase G2/M (Figura 15).

Figura 15 - Efeito do composto MB 1.4 e doxorrubicina sobre a linhagem celular K562 determinado sobre citometria de fluxo usando o ciclo celular após 48 h de incubação.



O controle negativo (A) foi tratado apenas com veículo (DMSO) a 0.1%. Doxorrubicina (B) 0,2 μM e o derivado MB 1.4 (17 e 34 μM), C e D, respectivamente. Os experimentos foram realizados em triplicata em dois experimentos independentes. *** $p < 0.0001$ em comparação ao grupo controle negativo (C).

O ciclo celular corresponde a uma série de eventos responsáveis pelo divisão e duplicação celular. O ciclo celular apresenta quatro fases distintas: fase G1, fase S (síntese), fase G2 (interfase) e fase M (mitose). A preparação de energia e material para a síntese do DNA ocorre na fase G1. Em seguida a célula replica seu DNA na fase S. A fase G2 (interfase) prepara a célula para a mitose propriamente dita onde ocorre divisão do núcleo e citoplasma da célula (HE et al., 2016). Devido a importância do ciclo celular no processo de progressão

tumoral, avaliamos se a inibição do crescimento celular em K562 ocorreu devido a parada no ciclo celular por citometria de fluxo 48 h após o tratamento.

Células transformadas apresentam perda do controle de diferenciação e alterações no ciclo celular e muitos dos tratamentos apresentam melhor resultado quando as células estão em processo de divisão celular (SENKIV et al., 2016). Devido a importância deste evento no processo de progressão tumoral, avaliamos a ação do composto MB 1.4 sobre o ciclo celular por citometria de fluxo.

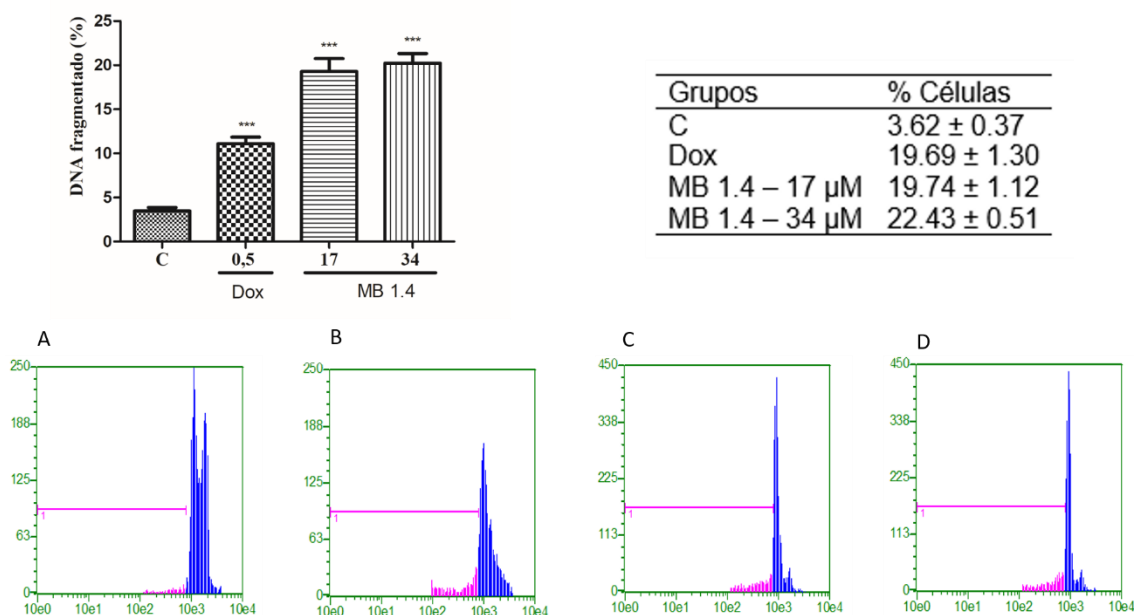
Diversas moléculas derivadas do tiazol têm sido descritas na literatura como indutoras de parada nas diferentes fases do ciclo celular G0/G1, S e G2/M e em diferentes linhagens de células tumorais (BORKOVA et al., 2017; HE et al., 2016; SENKIV et al., 2016; SHAIK et al., 2017; SPANÒ et al., 2016).

Senviki et al. 2016 observaram que o tratamento com (5-[5-(2-Hidroxifenil)-3-fenil-4,5-dihidropirazol-1-ilmetileno]-3-(3-acetoxifenil)-2-tioxitiazolidin-4-ona) em células leucêmicas HL-60 também foi capaz de induzir parada de ciclo celular na fase G0/G1 após 48 h de tratamento.

5.1.4.3 Análise da fragmentação do DNA

Para a linhagem tumoral testada, o composto MB 1.4 induziu fragmentação do DNA nas duas concentrações analisadas e obteve melhor resultado na concentração de 34 μ M que representou 22,43% das células com presença de DNA fragmentado. O composto MB 1.4 na concentração de 17 μ M apresentou 19,74% das células com DNA fragmentado (Figura 16). O grupo que recebeu doxorrubicina apresentou 19,69% das células com DNA fragmentado, enquanto o grupo controle negativo apresentou apenas 3,62% das células com DNA fragmentado.

Figura 16 - Efeito do composto MB 1.4 e doxorrubicina sobre a linhagem celular K562 determinado por citometria de fluxo sobre a fragmentação do DNA após 48 h de incubação.



O controle negativo (A) foi tratado apenas com veículo (DMSO) a 0.1%. Doxorrubicina (B) 0,5 μM e o derivado MB 1.4 (17 e 34 μM), C e D, respectivamente. Os experimentos foram realizados em triplicata em dois experimentos independentes. *** $p < 0.0001$ em comparação ao grupo controle negativo (C).

Uma característica importante no processo de morte celular por apoptose é a presença de DNA fragmentado. Contudo, é possível observar outras mudanças na morfologia nuclear como a condensação do núcleo, clivagem do DNA cromossômico, formação de blebs de membrana e a presença de corpos apoptóticos (HASSAN et al., 2014).

Para avaliarmos a fragmentação do DNA, nós utilizamos o mesmo princípio da análise do ciclo celular a partir da incorporação do iodeto de propídeo na célula.

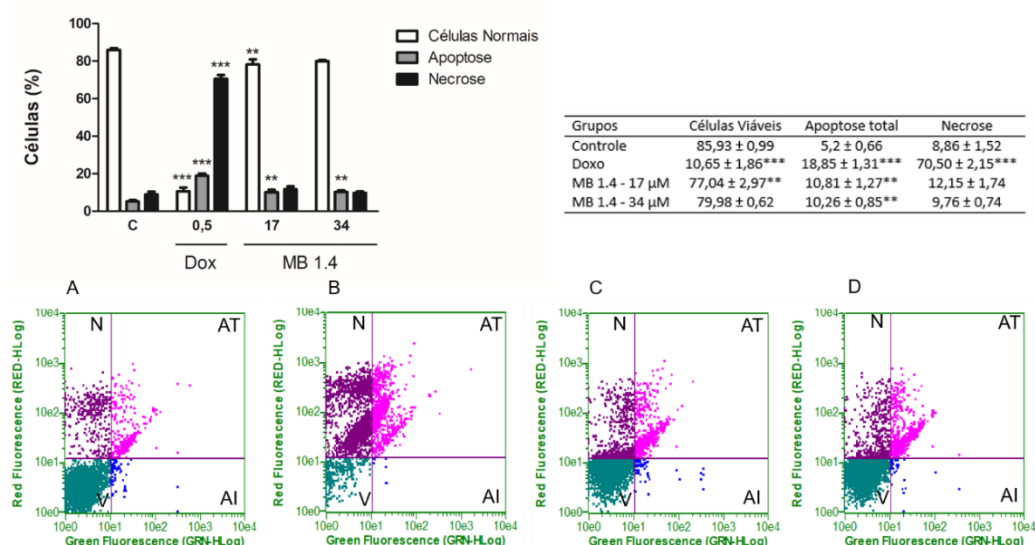
5.1.4.4 Ensaio de morte celular por apoptose

O ensaio de externalização da fosfatidilserina permite observar se o ensaio de morte celular ocorre por apoptose. Assim testamos a atuação do derivado MB 1.4 em células da linhagem k562. Os resultados demonstram que o derivado MB 1.4 induziu apoptose nas duas doses testadas 17 e 34 μM em 10,10 e 10,26% das células quando comparadas ao grupo controle negativo

5.20%. O grupo que recebeu doxorrubicina apresentou 18,85% das células em apoptose. Não foram observadas alterações significativas no tratamento com o derivado MB 1.4 em relação a morte por necrose, todavia o tratamento com a doxorrubicina apresentou 70,50% das células em necrose (Figura 17).

Diversas são as características observadas nas células que entram no processo de morte por apoptose. Entre as características são observadas condensação e fragmentação nuclear, clivagem do DNA em fragmentos internucleossômicos e formação de corpos apoptóticos sem haver rompimento da membrana celular. Em seguida, as células fagocíticas reconhecem a presença dos corpos apoptóticos e os removem sem que haja presença de inflamação em torno da célula que se encontra no processo de morte por apoptose (EDINGER; THOMPSON, 2004).

Figura 17 - Efeito do composto MB 1.4 e doxorrubicina sobre a linhagem celular K562 determinado por citometria de fluxo sobre externalização da fosfatidil serina pelo ensaio de anexina V/7AAD após 48 h de incubação.



O controle negativo (A) foi tratado apenas com veículo (DMSO) a 0.1%. Doxorrubicina (B) 0,5 μM e o derivado MB 1.4 (17 e 34 μM), C e D, respectivamente. Os experimentos foram realizados em triplicata em dois experimentos independentes. *** $p < 0.0001$ em comparação ao grupo controle negativo (C). V = células viáveis, AI = apoptose inicial, AT = apoptose tardia e N = necrose.

Diversos derivados do tiazol têm sido descritos na literatura por apresentar indução de morte celular por apoptose. Estudo recente tem demonstrado a indução de morte celular por tiazóis a partir da externalização da fosfatidil serina e fragmentação do DNA. Além disso, estes dados foram

acompanhados por parada do ciclo celular na fase G2/M e inibição da ciclina B/CDK1 (PARRINO et al., 2017).

Derivados do tiazol conjugados a chalconas também demonstraram indução de morte celular por apoptose em células de câncer de mama do tipo MDA MB 31 após ensaio da anexina V-FITC/IP. Concomitante a essa observação, os derivados também induziram parada de ciclo celular na fase G2/M, polimerização da tubulina e presença de espécies reativas de oxigênio (SULTANA et al., 2018).

Uma série de imidazo [2,1-b][1,3,4] tiadiazol ligado a indolinona foi capaz de induzir apoptose em células HeLa. Este mecanismo de morte foi confirmado pela presença de fragmentação do DNA e atuação sobre caspase-3. Além destes estudos, também foi observado que os compostos foram capazes de induzir parada de ciclo celular em G2/M e inibição da tubulina (NARASIMHA RAO et al., 2018).

Nossos resultados sugerem que o composto MB 1.4 é capaz de induzir morte celular por apoptose com envolvimento mitocondrial nas duas doses testadas. O derivado também induz morte celular por parada de ciclo celular. Contudo, estudos complementares devem ser realizados para avaliar o envolvimento das caspases e do citocromo c para melhor elucidar o envolvimento da mitocôndria sobre a indução de morte celular por apoptose nas células K562 induzida pelo composto MB 1.4.

5.2 Experimentos *in vivo*

5.2.1 Avaliação da toxicidade não-clínica aguda

O derivado MB 1.4 se apresentou como um composto promissor após a triagem citotóxica e a avaliação do seu mecanismo de ação *in vitro* em células K562. A partir destes resultados, foram iniciados os ensaios pré-clínicos *in vivo*. O teste de toxicidade não-clínica aguda transcorreu durante 14 dias. O derivado MB 1.4 (300 mg/kg) não induziu morte no grupo testado (n=3). Em seguida, o teste foi repetido nesta mesma dose com mais três animais e novamente nenhuma morte foi observada. Seguindo o fluxograma da OECD n° 423, foi

testada a dose de 2000 mg/kg. Neste grupo, o derivado MB 1.4 induziu a morte de todos os animais (n=3). Com os dados obtidos, a DL₅₀ estimada do composto MB 1.4 foi de aproximadamente 500 mg/kg e este resultado o enquadra na categoria 4 (toxicidade moderada) da *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* (GHS) (OECD, 2001).

O efeito sobre o comportamento dos animais também foi avaliado (Tabela 11). No grupo controle que recebeu apenas solução de NaCl + cremophor 5% nenhum animal foi a óbito.

Tabela 11 - Efeito intraperitoneal da dose única de MB 1.4 em camundongos (n=3).

Grupo	Dose	Efeito comportamental	Morte/Total animais
Controle	NaCl 0,9%	-	0/3
MB 1.4	2000 mg/kg	Resposta ao toque diminuída, sonolência, ptose	3/3
MB 1.4	300 mg/kg	Contorção abdominal, piloereção	0/6

*M/T = Número de animais mortos/ número de animais tratados

Os animais que receberam a dose de 300 mg/kg apresentaram contorções abdominais nos primeiros 15 minutos após a administração da dose, esta observação pode estar relacionada à via intraperitoneal de administração deste composto. Após o período de duas horas, também foi possível observar piloereção nestes animais.

Os animais que receberam 2000 mg/kg apresentaram resposta ao toque diminuída, sonolência e ptose 15 minutos após a administração do derivado MB 1.4. Entretanto, vinte e quatro horas após a administração desta dose, todos os animais foram a óbito.

Não foram observadas alterações significativas nos consumos de ração, água e avaliação de massa corpórea dos animais tratados com o derivado MB 1.4 (300 mg/kg). As massas absoluta e relativa dos órgãos são importantes indicadores fisiopatológicos relacionados ou não à injúria causada por alguma substância em animais e humanos (VAGHASIYA; SHUKLA; CHANDA, 2011). Ao avaliar o índice dos órgãos, percebeu-se aumento significativo no índice hepático (300 mg/kg), quando comparado ao grupo controle (Tabela 12).

Tabela 12 - Efeitos da administração intraperitoneal do derivado MB 1.4 (300 mg/kg) e NaCl 0,9% (controle negativo) sobre o consumo de ração e água, evolução de massa corpórea e índice dos órgãos em camundongos fêmeas, durante 14 dias.

Parâmetros	Tratamentos	
	NaCl (0,9%)	300 mg/kg
Consumo de ração (g)	33,3 ± 3,1	32,2 ± 3,6
Consumo de água (ml)	46,1 ± 5,0	47,08 ± 5,0
Avaliação ponderal (g)		
Massa inicial	33,7 ± 1,9	31,0 ± 2,7
Massa final	34,3 ± 1,6	32,2 ± 2,0
Índice dos órgãos (mg/g)		
Fígado	62,6 ± 1,1	69,0 ± 0,7*
Rins	11,7 ± 0,2	13,4 ± 1,0
Baço	6,5 ± 0,5	7,3 ± 0,6

Os resultados estão expressos em média ± erro padrão da média. Análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste de Dunnett, ***p < 0,001, comparado com o grupo controle negativo (NaCl 0,9%) (n = 6).

5.2.1.1 Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos

Neste estudo, não foram encontradas alterações significativas na contagem diferencial dos leucócitos nem alterações nos parâmetros eritrocitários (Tabela 13) dos animais submetidos ao tratamento de dose única com o derivado MB 1.4 (300 mg/kg), em relação ao grupo controle, indicando que este composto na dose testada não apresentou toxicidade para o tecido sanguíneo. Este dado é muito importante, pois a maioria dos antineoplásicos clássicos causam danos ao sistema hematopoietico.

A responsividade dos estudos de toxicidade de substâncias sobre os parâmetros hematológicos em roedores e não roedores está diretamente relacionada aos achados em humanos e corresponde a aproximadamente 91% (OLSON et al., 2000). Os neutrófilos são os leucócitos circulantes mais abundantes em humanos e desempenham um papel crucial na defesa do hospedeiro contra infecções (KRUGER et al., 2015).

Tabela 13 - Efeito da administração intraperitoneal de NaCl 0,9% (controle negativo) e MB 1.4 sobre os parâmetros hematológicos de camundongos fêmeas, durante 14 dias.

Parâmetros	NaCl 0,9%	MB 1.4 (300 mg/ kg)
Leucócitos totais x 10 ³ /mm ³	4,7 ± 0,2	3,7 ± 0,5
Segmentados (%)	7,8 ± 1,3	9,5 ± 1,3
Bastões (%)	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Eosinófilos (%)	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,2
Linfócitos (%)	90,8 ± 1,4	89,3 ± 1,4
Monócitos (%)	1,3 ± 0,2	1,0 ± 0,0
Hemácias x 10 ⁶ /mm ³	7,1 ± 0,1	6,3 ± 0,2
Hemoglobina (g/dL)	9,5 ± 0,3	8,5 ± 0,3
Hematócrito (%)	36,0 ± 0,8	32,1 ± 1,2
Plaquetas x 10 ³ /mm ³	785,0 ± 30,7	826,0 ± 64,3

Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média. Análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste de Dunnett, *p<0,05, comparado ao controle negativo (n= 6).

O derivado MB 1.4 (300 mg/kg) também não causou nenhuma alteração significativa nos parâmetros bioquímicos (AST, ALT, FA, ureia e creatinina) analisados, quando comparados ao grupo controle (Tabela 14).

Tabela 14 - Efeito da administração intraperitoneal de NaCl 0,9% (controle negativo) e MB 1.4 nos parâmetros bioquímicos de camundongos fêmeas, após 14 dias.

Parâmetros	NaCl 0,9%	MB 1.4 (300 mg/kg)
AST (U/L)	150,8 ± 8,0	134,0 ± 8,7
ALT (U/L)	39,7 ± 3,2	35,6 ± 2,1
Fosfatase alcalina (U/L)	113,8 ± 6,6	138,8 ± 6,5
Ureia (mg/dL)	55,0 ± 3,4	60,8 ± 2,3
Creatinina (mg/dL)	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1

Os resultados estão expressos em média ± s.e.m. Análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste de Dunnett (n= 6), p<0,05. AST – aspartato aminotransferase, ALT – alanina aminotransferase, FA – fosfatase alcalina.

Desordens no ciclo da ureia e doença hepática podem ser causadas pela amônia, uma neurotoxina que em elevado teor no sangue podem causar tanto efeitos excitatórios como inibitórios, o que pode causar edema cerebral e coma (ARUMUGAM; NATESAN, 2017).

A amônia pode ser excretada na urina ou convertida em ureia, porém, sua conversão em ureia representa a maior forma de disposição de nitrogênio do corpo. A ureia é produzida no fígado e destinada aos rins, onde é excretada na forma de urina. Ela ainda pode difundir-se para o intestino, onde é clivada em dióxido de carbono e amônia por bactérias produtoras de urease, e em seguida, excretada nas fezes ou reabsorvida (LABUZETTA et al., 2010). Ao contrário da

amônia, seu precursor, a ureia, apresenta baixa toxicidade mesmo em elevadas concentrações (NATESAN; MANI; ARUMUGAM, 2016).

A função renal também é frequentemente avaliada pela medição sérica dos níveis de creatinina (ZAMORA et al., 2007). Este marcador é originado como produto final do metabolismo da creatina e pode ser considerado um marcador de disfunção renal, além de distúrbios musculares e da disfunção tireoidiana quando apresentado em elevadas concentrações na urina e no soro de pacientes (MAGALHÃES; MACHADO, 2002). O aumento da concentração sérica de creatinina tem sido relacionado ao diagnóstico de lesão renal aguda. Contudo, pouco se sabe sobre a causa real desta condição (MOLEDINA et al., 2017). Na prática clínica, a determinação do nível de creatinina é utilizada para avaliar a taxa de filtração glomerular (KASTL, 2017).

O fígado é um importante órgão de biotransformação, disposição e eliminação de substâncias, sejam elas exógenas (ex: fármacos) ou endógenas (ácidos biliares e macromoléculas) (THAKKAR; SLIZGI; BROUWER, 2017).

A eliminação de drogas hepáticas normalmente é realizada por enzimas metabolizadoras e drogas, porém estudos recentes revelaram que proteínas de transporte também desempenham papel importante na depuração hepática (THAKKAR; SLIZGI; BROUWER, 2017).

A avaliação da função hepática pode ser determinada pelos parâmetros bioquímicos ALT, AST, γ -glutamil transferase, bilirrubina total e conjugada, e amônia plasmática (SCATTON et al., 2011). As lesões hepatocelulares aumentam os níveis das transaminases, sendo a ALT mais específica para o fígado, entretanto o AST se eleva antecipadamente. Os níveis de fosfatase alcalina (FA) e de gama glutamil transferase (GGT) tendem a aumentar proporcionalmente às transaminases na colestase, o que caracteriza a síndrome da colestase intra-hepática. A avaliação da síntese hepática também pode ser medida pela determinação da albumina e do tempo de protrombina que são importantes para se determinar o tipo e a extensão da doença hepática (GUILDER; PULA; PIERRE, 2017).

Os dados encontrados neste estudo indicam que o derivado MB 1.4 não foi capaz de causar alterações no tecido hematopoiético nem alteração hepática e renal no soro dos camundongos. Estes dados são importantes, pois os estudos farmacológicos devem ser precedidos de estudos toxicológicos sendo este

teste de toxicidade não clínica aguda o responsável por garantir a segurança do uso do composto MB 1.4 nos ensaios farmacológicos.

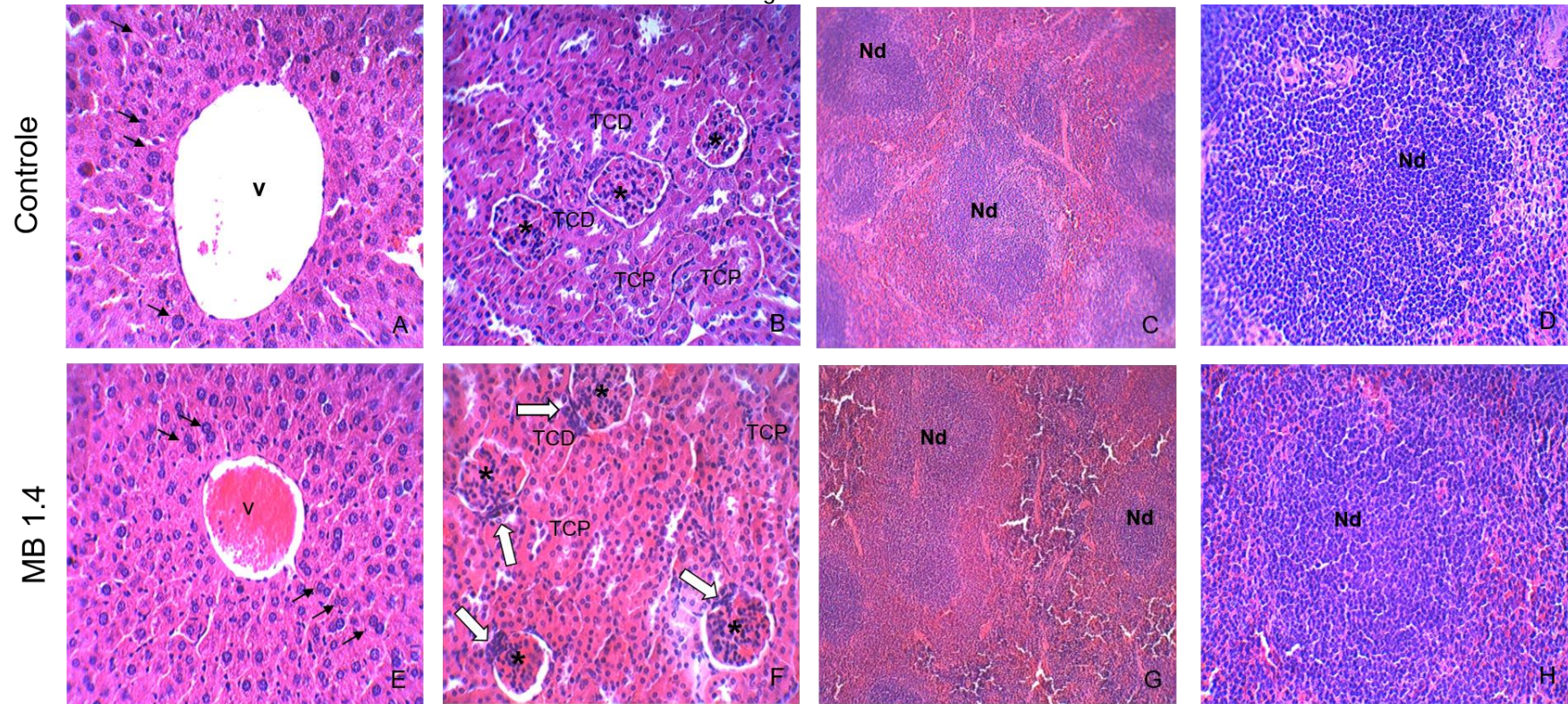
5.2.1.2 Análise histopatológica

Além dos parâmetros hematológicos e bioquímicos analisados, os órgãos (rins, fígado e baço) dos animais submetidos a toxicidade aguda foram extirpados e submetidos à avaliação histológica. Os animais do grupo controle apresentaram arquitetura preservada nos três órgãos analisados (Figura 18). Ao analisar o fígado dos animais tratados com MB 1.4 na dose de 300 mg/kg, observou-se um aumento da atividade mitótica dos hepatócitos (com visualização de células em divisão).

No córtex renal apareceram áreas destacadas da região justaglomerular (mácula densa) (Figura 18). As células mesangiais ocupam uma posição central no glomérulo renal e são indispensáveis para a estrutura e função glomerular. Elas estão envolvidas na filtração glomerular onde podem se contrair ou relaxar em resposta a uma série de agentes vasoativos e assim regular o fluxo sanguíneo capilar. Além disso, elas também podem estar envolvidas em resposta à lesão local (SCHLONDORFF, 1987; LU et al., 2017). Nossos resultados sugerem que o derivado MB 1.4 atua sobre as células mesangiais causando lesão renal e possível alteração no fluxo sanguíneo renal.

O baço é um importante órgão linfoide periférico onde ocorre a diferenciação e proliferação das células imunes (CUI et al., 2017). Na análise histológica deste órgão foi possível observar ativação dos nódulos linfáticos em algumas áreas com formações agrupadas na dose de 300 mg/kg (Figura 18). Este achado pode sugerir que o derivado MB 1.4 estimula a proliferação de linfócitos neste órgão. Apesar dos achados histológicos apresentarem alterações em nível renal e hepático, estas alterações não foram percebidas na análise dos parâmetros hematológicos e bioquímicos. Entretanto, a alteração hepática observada na análise histológica pode estar correlacionada à alteração apresentada no índice deste órgão.

Figura 18 - Fotomicrografias do fígado, rins e baço de animais do grupo controle e tratado com o derivado MB 1.4 na dose de 300 mg/kg no teste de toxicidade aguda.



A) tecido hepático mostrando veia centrolobular (v) e ordenação dos feixes de hepatócitos (setas finas curtas), B) Rins: região cortical preservada com presença de glomérulos renais (*), túbulos contorcidos proximais e distais (TCP e TCD, respectivamente). C) Baço: notam-se nódulos linfáticos (Nd) dispersos no parênquima esplênico e D) ampliação de região referente a um nódulo linfático. E) parênquima hepático mostrando vários hepatócitos em fase de divisão (setas curtas) e veia centrolobular (v) congestionada. F) Rins: região cortical preservada com presença de glomérulos renais (*) com destaque de áreas justaglomerulares (setas grossas brancas), túbulos contorcidos proximais e distais (TCP e TCD) com lúmens pouco visíveis. G) Baço: notam-se nódulos linfáticos (Nd) e alguns de forma agrupada H) ampliação de uma região referente ao nódulo linfático. (H.E.). C e G) Coloração HE: aumento de 100x. A, B, D, E, F e H) Coloração HE: aumento de 400x.

5.2.2 Teste antitumoral *in vivo*

5.2.2.1 Análise da viabilidade celular

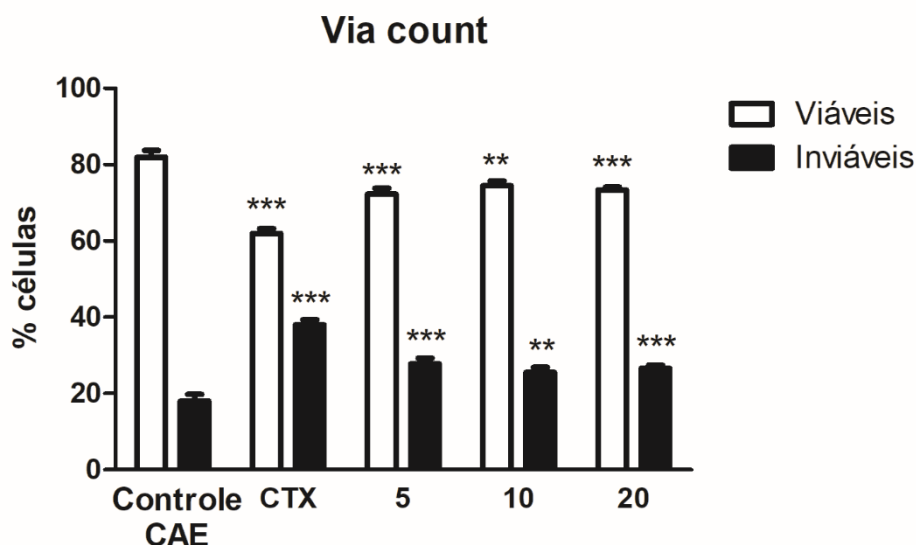
O derivado MB 1.4 não foi capaz de reduzir a quantidade total de células do tumor ascítico de Ehrlich em comparação ao grupo portador do carcinoma ascítico de Ehrlich que não recebeu tratamento (controle CAE) (dados não mostrados), o que pode estar relacionado ao curto período de tempo de tratamento com este derivado. Entretanto, o composto MB 1.4 foi capaz de reduzir a viabilidade celular nas três doses testadas 5, 10 e 20 mg/kg em 11,8%, 9,1% e 10,4% respectivamente quando comparadas ao grupo controle CAE. O percentual de células viáveis do controle CAE foi de 81,9%. O controle positivo (CTX – 20 mg/kg), também apresentou redução significativa da viabilidade celular de 24,4% quando comparada ao controle (Tabela 15). Os dados podem ser melhor visualizados na Figura 19.

Tabela 15 - Percentual de viabilidade celular e percentual de inibição de células obtidas de tumor ascítico de Ehrlich após sete dias de tratamento com derivado MB 1.4.

Grupo	% viabilidade	Inibição %
Controle CAE	81,9	-
CTX	61,9 ^{***}	24,4 ^{***}
5	72,3 ^{***}	11,8 ^{***}
10	74,5 ^{**}	9,1 ^{**}
20	73,3 ^{***}	10,5 ^{***}

Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média. Análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Dunnett, * $p < 0,05$, comparado com o grupo controle CAE (n= 6).

Figura 19 - Efeito do composto MB 1.4 e ciclofosfamida (CTX) sobre a viabilidade celular em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich após sete dias de tratamento.



Os dados foram obtidos por citometria de fluxo. Os animais do grupo controle CAE (A) foi tratado com veículo (cremophor a 5%). CTX (B) 20 mg/kg e MB 1.4 (5, 10 e 20 mg/kg) em C, D e E, respectivamente. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$ em comparação com o controle CAE por ANOVA seguido do Teste de Dunnett.

5.2.2.2 Ensaio de morte celular por anexina V

A externalização da fosfatidilserina é um processo importante no mecanismo de morte celular por apoptose. A anexina V/7AAD é um marcador preditivo para determinar se o mecanismo de morte celular ocorre por apoptose (inicial/tardia) ou por necrose. Os dados sobre apoptose foram expressos como a soma da apoptose inicial e tardia.

O percentual de células viáveis foi de 29,6%, 47,8% e 46,2%, para as doses de 5, 10 e 20 mg/kg, respectivamente, quando comparado ao grupo controle CAE (65,0%). O grupo que recebeu CTX (20mg/kg) apresentou 44,2% de células viáveis.

O processo de morte celular por apoptose é caracterizado por alterações na morfologia celular tais como, condensação e fragmentação do núcleo, clivagem do DNA cromossômico, formação de *blebs* de membrana e de corpos apoptóticos (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

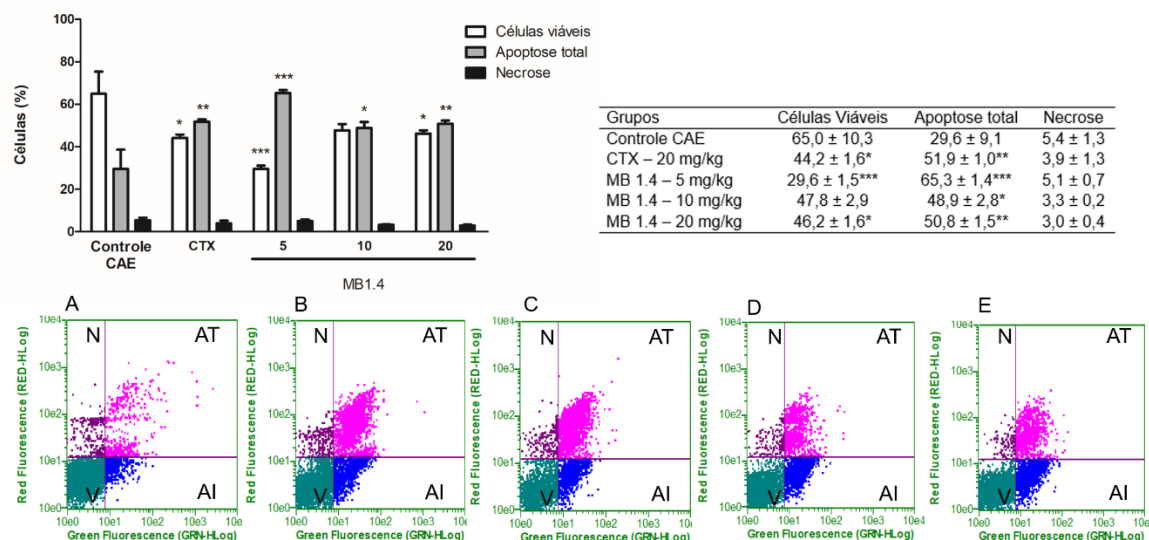
Os resultados obtidos apontam que o composto MB 1.4 induziu morte celular por apoptose nas três doses testadas quando comparadas ao controle CAE 29,6%. Contudo, os animais submetidos a menor dose (5 mg/kg)

apresentaram um maior número de células em apoptose 65,3%. Nas doses de 10 e 20 mg/kg, o percentual de apoptose foi de 48,9% e 50,8%, respectivamente. O controle positivo CTX (20 mg/kg) apresentou 51,9% de células em apoptose. Não houveram diferenças significativas entre os grupos ao analisar a morte celular por necrose (Figura 20).

Dados da literatura associam a regressão do crescimento tumoral *in vivo* ao aumento da indução da apoptose (AGRAWAL, et al., 2011; CHAKRABORTY; SK; BHATTACHARYA, 2009; BHATTACHARJEE et al., 2017). Este achado é importante, pois uma das principais características das células cancerígenas é o mecanismo de evasão da apoptose, que contribui para a progressão tumoral e para a resistência a drogas quimioterápicas (FLUSBERG; SORGER, 2015).

O tratamento com a dose de 20 mg/kg apresentou menor número de células em apoptose, quando comparada às doses menores (5 e 10mg/kg), e não houve aumento das células em necrose (Figura 20). Este fato pode estar associado à outra via de morte celular não quantificada em nossos testes. Esta conclusão se baseia no fato de as células deste grupo apresentar aumento no percentual de fragmentação do DNA (Figura 22) o que sugere morte celular por uma via não apoptótica/necrótica. Nas doses mais baixas (5 e 10 mg/kg) o processo de morte celular ocorreu principalmente pela via apoptótica.

Figura 20 - Efeito do composto MB 1.4 e ciclofosfamida (CTX) sobre a indução de morte celular por apoptose em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich após sete dias de tratamento.



Os dados foram obtidos por citometria de fluxo. Os animais do grupo controle CAE (A) foi tratado com veículo (cremophor a 5%). CTX (B) 20 mg/kg e MB 1.4 (5, 10 e 20 mg/kg) em C, D e E, respectivamente. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$ em comparação com o controle CAE por ANOVA seguido do pós-teste de Dunnett. V = células viáveis, AI = apoptose inicial, AT = apoptose tardia e N = necrose.

5.2.2.3 Ensaio do ciclo celular

Nas doses de 5 e 10 mg/kg foram observadas parada de ciclo na fase G2/M de 46,7 e 60,6% das células nessa fase, respectivamente (Figura 21). Cada grupo tratado teve suas fases comparadas ao grupo controle CAE.

Estudo recente demonstrou que um derivado do tiazol ligado a indol-3-glioxilamida induziu parada de ciclo celular na fase G2/M. A parada de ciclo celular nesta fase predispõe indução de morte celular por apoptose (GUGGILAPU et al., 2017).

Proteínas reguladoras denominadas de ciclínas juntam-se a cinases dependentes de ciclínas (CDKs) para dirigir a célula entre as diferentes fases do ciclo celular (DICKSON; SCHWARTZ, 2009; GERARD; GONZE; GOLDBETER, 2012). O complexo ciclina A/B-CDK1, em células somáticas, é o regulador do ciclo celular que promove transição entre as fases G2/M (SHE et al., 2017). Durante a mitose, a ciclina B/Cdk1 ativa a proteína cdc20 por fosforilação. Para que a célula conclua o ciclo celular, a proteína cdc20 atua por feedback negativo promovendo a inativação da ciclina A/Cdk2 (permite a saída da fase S) e da

ciclina B/Cdk1. Assim, um novo ciclo celular pode ser iniciado (GERARD; GONZE; GOLDBETER, 2012).

O grupo tratado com 20 mg/kg (Figura 21) apresentou parada de ciclo celular na fase S (31,7%), quando comparado ao controle CAE (21,1%). O controle positivo ciclofosfamida (20 mg/kg) apresentou redução das células na fase G1 (17,2%) e parada de ciclo celular na fase S (57,0%).

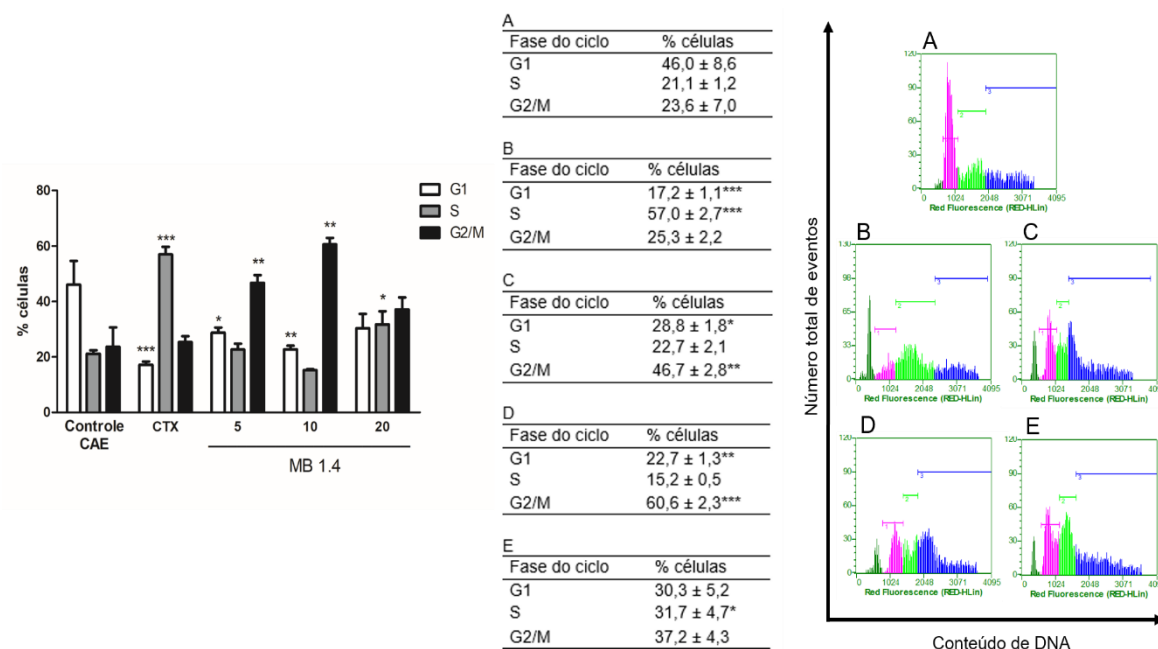
Muitos dos mais eficazes agentes terapêuticos quimioterápicos sistêmicos sejam eles adjuvantes ou neoadjuvantes atuam sobre as fases S (5-fluoracil, gencitabine, irinotecano e metotrexato) ou fase M (docetaxel, paclitaxel e vincristina) do ciclo celular (WILLIAMS; STOEGER, 2012).

Células que apresentam parada de ciclo na fase S morrem mais rapidamente devido a um colapso ou parada da forquilha de replicação. Algumas células cancerosas aparentam sobreviver mais tempo, entretanto eventualmente sofrem catástrofe mitótica como resultado de cromossomos parcialmente replicados (WILLIAMS; STOEGER, 2012).

Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* têm relacionado a atividade antitumoral significativa de moléculas naturais ou sintéticas por atuarem em alguma fase do ciclo celular, sendo este considerado um importante mecanismo de atividade anticâncer (ROLIM et al., 2017; OURIQUE et al., 2016; YI et al., 2017; YU et al., 2017).

Entretanto, a literatura é escassa sobre o mecanismo de ação tumoral de derivados do tiazol *in vivo* neste modelo de tumor. Isto dificulta os parâmetros de comparação do nosso trabalho, além de demonstrar o ineditismo dos testes realizados por nosso grupo de pesquisa.

Figura 21 - Efeito do composto MB 1.4 e ciclofosfamida (CTX) sobre o ciclo celular em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich após sete dias de tratamento.



Os dados foram obtidos por citometria de fluxo. Os animais do grupo controle CAE (A) foi tratado com veículo (cremophor a 5%). CTX (B) 20 mg/kg e MB 1.4 (5, 10 e 20 mg/kg) em C, D e E, respectivamente. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$ em comparação com o controle CAE por ANOVA seguido do Teste de Dunnett.

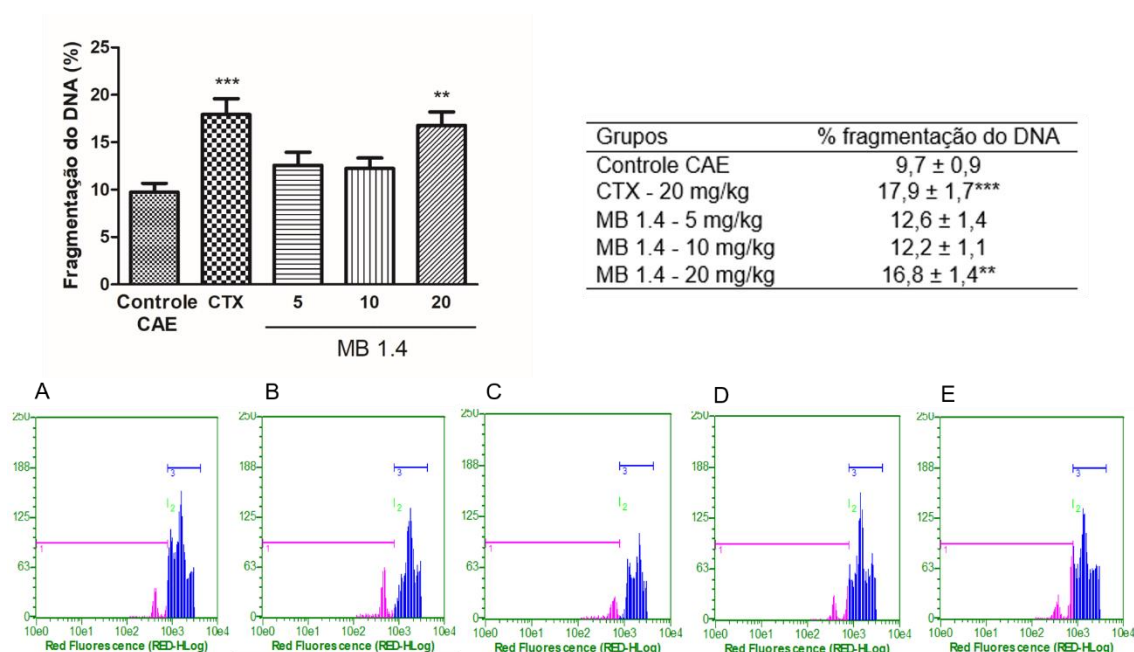
5.2.2.4 Avaliação da fragmentação do DNA

No líquido ascéticos dos animais tratados com as doses de 5 e 10 mg/kg de MB1.4 foram observadas 12,6 e 12,2% de células com DNA fragmentado, no entanto, esta fragmentação não é considerada significativa quando comparada ao controle CAE (9,7%). Contudo, na dose de 20 mg/kg ocorreu alteração significativa (16,8%) quando comparada ao controle CAE. O grupo tratado com a ciclofosfamida apresentou 17,9% das células com DNA fragmentado (Figura 22).

A presença de núcleo picnótico e DNA fragmentado são características típicas da apoptose como mecanismo de morte celular (ACILAN et al., 2017)

A partir dos resultados obtidos nos experimentos de citometria de fluxo foi possível inferir MB1.4 na dose de 20 mg/kg induziu degradação celular.

Figura 22 - Efeito do composto MB 1.4 e ciclofosfamida (CTX) sobre a fragmentação do DNA em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich após sete dias de tratamento.



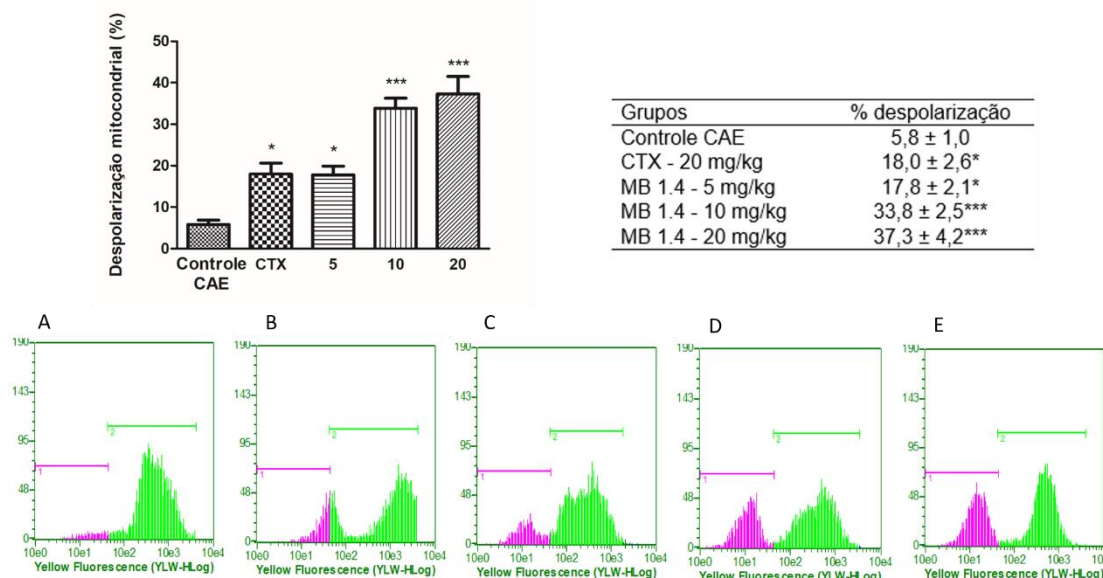
Os dados foram obtidos por citometria de fluxo. Os animais do grupo controle CAE (A) foi tratado com veículo (cremophor a 5%). CTX (B) 20 mg/kg e MB 1.4 (5, 10 e 20 mg/kg) em C, D e E, respectivamente. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$ em comparação com o controle CAE por ANOVA seguido do Teste de Dunnett.

5.2.2.5 Avaliação do ensaio do potencial transmembrânico mitocondrial

O ensaio da medida do potencial transmembrânico mitocondrial foi realizado a fim de se avaliar se há envolvimento da mitocôndria no mecanismo de morte celular. Este ensaio baseia-se na despolarização da membrana da mitocôndria celular.

Nossos resultados mostraram que ocorreu alteração do potencial transmembrânico mitocondrial em todas as doses testadas. A dose de 5 mg/kg apresentou 17,76% das células despolarizadas. As doses de 10 e 20 mg/kg causaram elevado percentual de células despolarizadas em 33,8 e 37,3%, respectivamente. O controle CAE apresentou apenas 5,8% de células despolarizadas e o grupo que recebeu ciclofosfamida 18,0% (Figura 23).

Figura 23 - Efeito do composto MB 1.4 e ciclofosfamida (CTX) sobre o potencial transmembrânico mitocondrial em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich após sete dias de tratamento.



Os dados foram obtidos por citometria de fluxo. Os animais do grupo controle CAE (A) foi tratado com veículo (cremophor a 5%). CTX (B) 20 mg/kg e MB 1.4 (5, 10 e 20 mg/kg) em C, D e E, respectivamente. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$ em comparação com o controle CAE por ANOVA seguido do Teste de Dunnett.

Xuejiao et al., (2013) relataram o uso de um benzotiazol, o YLT322, como indutor de morte celular por apoptose em carcinoma hepatocelular humano ao atuar pela via mitocondrial.

A alteração do potencial transmembrânico mitocondrial é um dos eventos iniciais do processo de morte celular por apoptose. Sua alteração permite a formação de poros na membrana mitocondrial externa com a liberação de proteínas mitocondriais para o citosol (KOVAL et al., 2012; VERMES; HAANEN; REUTELINGSPERGER, 2000).

A via intrínseca da apoptose é caracterizada pelo envolvimento mitocondrial, neste processo de morte celular ocorrem diversos eventos como liberação do citocromo c, perda do potencial transmembrânico e alteração no transporte de elétrons, alteração no sistema de oxidação-redução celular e a participação de proteínas da família Bcl-2 pro e antiapoptóticas (GREEN; REED, 1998). A presença da despolarização nas três doses analisadas apresentada na Figura 23, justifica a parada ciclo celular observada na Figura 21.

5.2.2.6 Parâmetros hematológicos e bioquímicos de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich

Ao analisar a série branca foram realizadas a contagem total e diferencial dos leucócitos. Um aumento significativo na contagem total dos leucócitos foi observado no tratamento com a dose 20 mg/kg do MB1.4 quando comparados ao controle CAE. No entanto, não foram observadas diferenças significativas na contagem diferencial dos leucócitos em nenhuma das doses analisadas (Tabela 16).

Também não foram encontradas alterações significativas ao se avaliar a série vermelha quando comparamos os grupos tratados ao grupo controle CAE. Entretanto, o grupo tratado com 20 mg/kg do derivado MB 1.4 apresentou redução na contagem de plaquetas quando comparada ao controle CAE (Tabela 16).

Tabela 16 - Efeito do derivado MB 1.4 e NaCl 0,9% (controle CAE) sobre os parâmetros hematológicos de camundongos machos portadores do tumor ascítico de Ehrlich durante sete dias de tratamento.

Parâmetros	Controle CAE	CTX	5	10	20
Leucócitos totais x 10 ³ /mm ³	11,4 ± 1,7	12,6 ± 1,4	12,8 ± 2,2	13,7 ± 1,7	23,7 ± 2,0*
Segmentados (%)	55,6 ± 10,2	74,6 ± 3,2	60,0 ± 4,6	65,8 ± 0,7	66,0 ± 3,4
Bastões (%)	0,2 ± 0,16	0,2 ± 0,2	0 ± 0	0,3 ± 0,2	0 ± 0
Eosinófilos (%)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Linfócitos (%)	42,4 ± 7,9	22,4 ± 3,0	37,8 ± 4,4	32,5 ± 0,6	31,4 ± 3,6
Monócitos (%)	1,8 ± 0,3	2,8 ± 0,5	2,2 ± 0,4	1,7 ± 0,3	2,6 ± 0,5
Hemácias x 10 ⁶ /mm ³	5,3 ± 0,3	5,2 ± 0,1	4,8 ± 0,2	5,0 ± 0,2	4,9 ± 0,2
Hemoglobina (g/dL)	9,9 ± 0,5	10,0 ± 0,1	8,9 ± 0,4	9,4 ± 0,3	9,3 ± 0,4
Hematócrito (%)	27,3 ± 1,6	26,9 ± 0,4	24,1 ± 1,3	25,6 ± 0,9	24,9 ± 1,2
Plaquetas x 10 ³ /mm ³	1063,0 ± 28,9	827,6 ± 11,6	985,8 ± 74,7	1108,0 ± 76,0	759,2 ± 113,7*

Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média. Análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Dunnett, *p < 0,05, comparado com o grupo controle CAE (n = 6).

Em nível sérico, os parâmetros bioquímicos também foram avaliados (Tabela 17). Não foram observadas alterações significativas nos níveis de AST e ALT, contudo, as doses de 5 e 10 mg/kg apresentaram redução significativa para a determinação da fosfatase alcalina (FA) com valores de 30 e 21,5 U/L, respectivamente, quando comparados ao grupo controle CAE 77,4 U/L. A CTX (20 mg/kg) também apresentou redução significativa para este parâmetro de 27,4 U/L.

Tabela 17 - Efeito do derivado MB 1.4 e NaCl 0,9% (controle CAE) sobre os parâmetros bioquímicos no soro de camundongos machos portadores do tumor ascítico de Ehrlich durante sete dias de tratamento.

Parâmetros	Controle CAE	CTX	5	10	20
AST (U/L)	360,3 ± 22,6	445,2 ± 37,5	490,9 ± 38,1	466,2 ± 36,6	410,3 ± 35,2
ALT (U/L)	78,9 ± 4,3	89,0 ± 6,8	99,5 ± 16,5	76,7 ± 6,7	85,4 ± 10,6
FA (U/L)	77,4 ± 19,4	27,4 ± 2,8*	30,0 ± 1,6*	21,5 ± 2,4**	48,0 ± 17,4
Ureia (mg/dL)	36,2 ± 4,2	24,0 ± 4,5	27,0 ± 1,7	26,2 ± 2,0	28,0 ± 3,3
Creatinina (mg/dL)	0,30 ± 0,03	0,35 ± 0,02	0,31 ± 0,03	0,35 ± 0,02	0,40 ± 0,08

Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média. Análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Dunnett, *p< 0,05, comparado com o grupo controle negativo (NaCl 0,9%) (n= 6). AST – aspartato aminotransferase, ALT – alanina aminotransferase, FA – fosfatase alcalina.

Santos-Silva et al., 2017 ao estudarem a atividade anticâncer do 2-piridil,2,3-tiazol em camundongos portadores de tumor hepático, não observaram diferença significativa no peso dos órgãos e no peso dos animais tratados em relação ao controle. Em seu estudo, também foi observado redução dos níveis de fosfatase alcalina, o que corrobora com o nosso trabalho onde a presença do núcleo tiazólico também reduziu os níveis de fosfatase alcalina.

Uma redução da massa corporal pode está relacionada a toxicidade produzida por quimioterápicos. No grupo tratado com CTX (20 mg/kg), nosso estudo revelou redução significativa no consumo de ração e na avaliação da massa corpórea ao final do experimento comprovando a toxicidade já conhecida dos quimioterápicos. O grupo tratado com 5 mg/kg do derivado MB 1.4 apresentou aumento da massa corpórea ao final do experimento, entretanto, este aumento na massa corpórea final representou uma redução significativa quando comparada ao controle CAE o que representa sinais de toxicidade relacionadas ao derivado MB 1.4 nesta dose. Ao avaliar o índice dos órgãos, os grupos tratados com 5 e 20 mg/kg do derivado MB 1.4 apresentaram redução significativa do rim quando comparadas ao grupo controle CAE (Tabela 18). Esta redução caracteriza presença de toxicidade o que corrobora com os resultados observados na análise histológica do tecido renal.

Não foram observadas alterações significativas no consumo de água em nenhum dos grupos tratados com o derivado MB 1.4 quando comparado ao grupo controle CAE (Tabela 18).

Tabela 18 - Efeito do tratamento do composto MB 1.4 sobre o consumo de água, ração, avaliação de massa corpórea e índice dos órgãos de animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich (n=6).

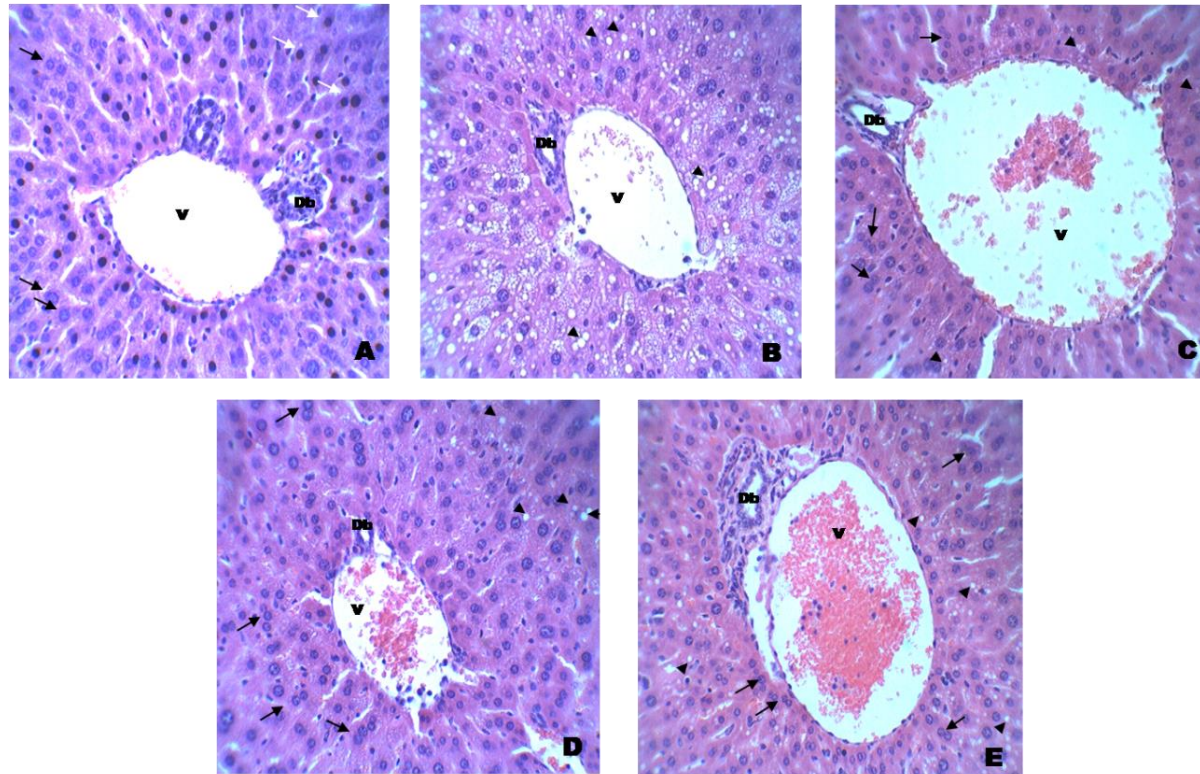
Parâmetros	Tratamento				
	Controle CAE	CTX	5 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg
Consumo de ração (g)	68,0 ± 5,5	37,9 ± 7,0*	41,7 ± 7,0	50,6 ± 8,6	42,3 ± 7,7
Consumo de água (ml)	90,7 ± 10,0	62,3 ± 10,2	61,7 ± 7,5	62,9 ± 10,2	58,6 ± 8,9
Avaliação ponderal (g)					
Massa inicial	26,2 ± 0,2	25,2 ± 0,7	25,7 ± 0,5	27,3 ± 1,4	27,5 ± 0,2
Massa final	33,8 ± 0,8	24,7 ± 1,0***	29,3 ± 0,8**	33,3 ± 0,5	31,2 ± 0,8
Índice dos órgãos (mg/g)					
Fígado	60,7 ± 2,3	67,0 ± 1,6	62,6 ± 1,6	60,0 ± 1,4	61,4 ± 2,8
Rins	11,2 ± 0,3	11,6 ± 0,5	9,7 ± 0,3**	10,5 ± 0,3	10,0 ± 0,2*
Baço	4,9 ± 0,4	4,7 ± 0,5	4,9 ± 0,3	4,2 ± 0,3	4,3 ± 0,6

Os resultados estão expressos em média ± erro padrão da média. Análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Dunnett, ***p < 0,001, comparado com o grupo controle negativo (NaCl 0,9%) (n = 6).

5.2.2.7 Análise histopatológica de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich

A análise histológica do fígado dos animais do grupo Controle CAE (Figura 24) apresentou hepatócitos normais e alguns com núcleos hipercromáticos o que evidencia possíveis atividades mitóticas (controle CAE). O tratamento com CTX foi caracterizado pela presença de foco inflamatório que pode ser observado pela presença de infiltrado linfocitário e intensa vacuolização dispersa entre os hepatócitos. Todos os animais submetidos ao tratamento com o derivado MB 1.4 apresentaram hepatócitos em divisão, veia centro vascular congesta e discreta vacuolização. Os animais submetidos ao tratamento na dose de 20 mg/kg também apresentaram presença de foco inflamatório caracterizado pela presença do infiltrado linfocitário. Os resultados sugerem que os animais tratados com o derivado MB 1.4 passaram por um desafio tóxico de grau leve.

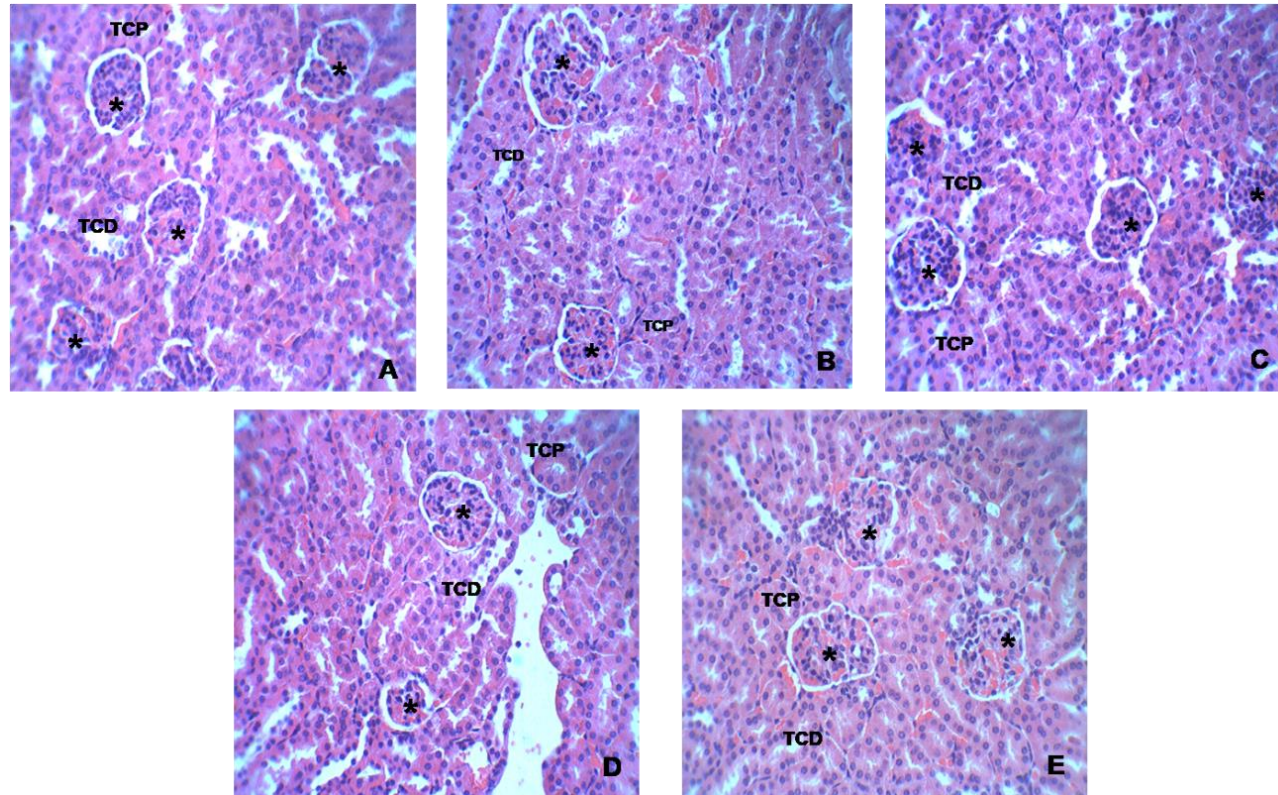
Figura 24 - Fotomicrografias do fígado de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich.



A) Controle CAE tecido hepático mostrando veia centrolobular (v), ducto biliar (Db), feixes hepatócitos (setas curtas) e alguns hepatócitos com núcleos hipercromáticos (setas brancas), **B) CTX (20 mg/kg)** Observa-se infiltrado linfocitário perivascular, ao redor da veia centrolobular (V) e também na proximidade do ducto biliar (Db), intensa vacuolização dispersa pelos hepatócitos (cabeças de seta) **C) MB 1.4 (5 mg/kg)** parênquima hepático mostrando alguns hepatócitos em divisão (setas curtas), veia centrolobular congesta (v) e discretas vacuolizações (cabeça de seta). **D) MB 1.4 (10 mg/kg)** parênquima hepático mostrando considerável quantidade de hepatócitos em divisão (setas curtas), veia centrolobular congesta (v) e discretas vacuolizações (cabeça de seta). **E) MB 1.4 (20 mg/kg)** parênquima hepático com hepatócitos em divisão (setas curtas), veia centrolobular bastante congesta (v), infiltração linfocitária nas proximidades do ducto biliar (Db) e presença de discretas vacuolizações (cabeça de seta). Coloração HE: aumento de 400x.

A histologia renal (Figura 25) demonstrou áreas de congestão vascular nos animais do controle CAE e no grupo tratado com CTX (20 mg/kg). Os resultados sugerem que os animais tratados com o derivado MB 1.4 nas três doses apresentaram alteração na hemodinâmica renal o que levou a congestão vascular e consequente hipóxia. Esta pode ser sugerida pela alteração tubular observada pela redução do lúmen tubular. Novos estudos deverão ser realizados, pois não foram observadas alterações nas dosagens de ureia e creatinina. Estudos aumentando o tempo de tratamento com o derivado MB 1.4 deverão ser realizados para que se possa ser comprovado essas alterações. Estudos de histomorfometria também poderão ser realizados para se comprovar estas alterações.

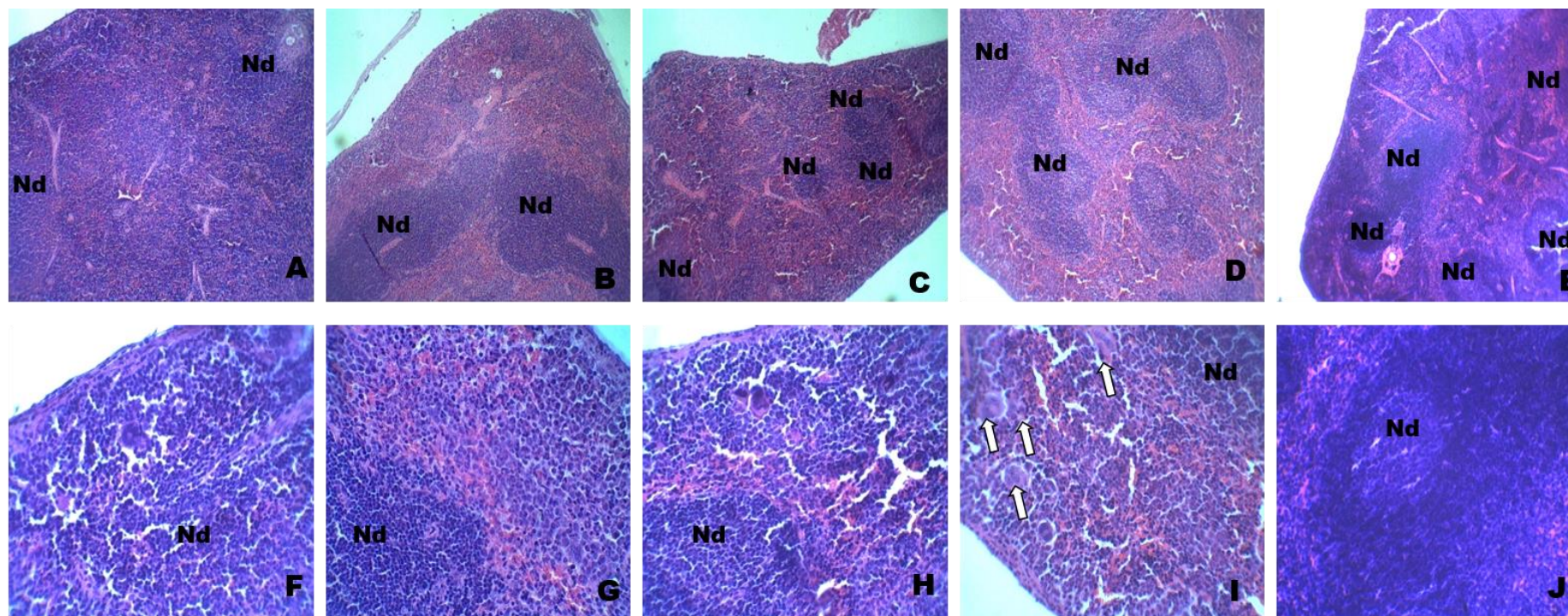
Figura 25 - Fotomicrografias dos rins de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich.



A) Controle CAE: região cortical com presença de glomérulos renais (*), túbulos contorcidos proximais e distais (TCP e TCD) e algumas áreas com congestão vascular. **B) CTX (20 mg/kg):** região cortical com intensa congestão vascular entre os túbulos contorcidos proximais e distais (TCP e TCD), assim como nas regiões glomerulares (*). **C) MB 1.4 (5 mg/kg):** região cortical com presença de glomérulos renais (*), presença de túbulos contorcidos proximais e distais (TCP e TCD) com lúmens pouco visíveis. **D) MB 1.4 (10 mg/kg):** região cortical com presença de glomérulos renais (*), presença de túbulos contorcidos proximais e distais (TCP e TCD) com lúmens pouco visíveis. **E) MB 1.4 (20 mg/kg)** região cortical com visível congestão vascular, presença de glomérulos renais (*) e túbulos contorcidos proximais e distais (TCP e TCD) com lúmens pouco visíveis. Coloração HE: aumento de 400x.

A histologia do baço mostrou a presença de nódulos linfáticos dispersos e agrupados nos animais tratados com as três doses do derivado MB 1.4. Já os animais do grupo controle portadores do tumor ascítico de Ehrlich (Controle CAE) demonstraram apenas a presença de nódulos linfáticos dispersos enquanto o grupo tratado com CTX 20 mg/kg apresentou nódulos linfáticos agrupados. Também foi observada a presença de células gigantes multinucleadas nos animais que receberam o tratamento com o derivado MB 1.4 na dose de 10 mg/kg (Figura 26).

Figura 26 - Fotomicrografias do baço de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich.



A) Controle CAE: Presença de nódulos linfáticos (Nd), **B) CTX (20 mg/kg)**, notam-se nódulos linfáticos agrupados (Nd). **C) MB 1.4 (5 mg/kg)** notam-se nódulos linfáticos (Nd) dispersos no tecido. **D) MB 1.4 (10 mg/kg)** notam-se nódulos linfáticos (Nd) em arranjo agrupado. **I)** ampliação de uma região periférica do baço com presença de células gigantes multinucleadas (setas grossas brancas). **E) MB 1.4 (20 mg/kg)** notam-se nódulos linfáticos (Nd) em arranjo disperso no tecido esplênico. **A, B, C, D e E:** HE: aumento de 100x. **F, G, H, I e J)** ampliação de uma região referente ao nódulo linfático. Coloração HE: aumento de 400x.

Os resultados da análise histológica mostraram lesões em nível renal e hepático, contudo estas alterações não foram observadas nos parâmetros bioquímicos, podendo ser estas alterações de grau leve ou transitórias.

O desenvolvimento de novas drogas antitumorais com efeitos tóxicos reduzidos é um dos principais desafios enfrentados pelos químicos medicinais. Este trabalho apresenta um panorama inicial da ação do derivado MB 1.4 *in vitro* e *in vivo* sobre células tumorais. Nossos estudos dos demonstram resultados promissores, entretanto outros testes devem se conduzidos para que possamos compreender melhor o mecanismo de ação deste composto tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

6 CONCLUSÃO

No nosso trabalho obtivemos a assertiva da hipótese inicial, comprovando que 12 dos 30 compostos testados apresentaram atividade citotóxica em diversas linhagens tumorais, onde os mesmos foram mais ativos em células cancerígenas quando comparados às células normais. O derivado MB 1.4 se apresentou um composto bastante promissor, onde nos estudos *in vitro*, a substância induziu morte por apoptose, parada de ciclo celular, alterou o potencial da membrana mitocondrial e causou fragmentação do DNA em células de leucemia mieloide crônica (K562). O que demonstra que a substância apresentou potencial para seguir com os testes de efeito antitumoral *in vivo*.

Nos testes *in vivo* o derivado MB 1.4 apresentou toxicidade moderada, além de atuar no tumor ascítico de Ehrlich através da redução das células viáveis. Os estudos de mecanismo de ação *in vivo* seguiram o padrão *in vitro*, sem alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos, contudo, provocou alterações em nível hepático e renal o que corrobora com a sua toxicidade moderada. Assim, concluímos que o MB 1.4 é um derivado do tiazol promissor na continuidade dos estudos antitumorais pré-clínicos.

REFERÊNCIAS

- ABDELLATIF, K. R. A.; EL WARETH, G. A. A.; EL-BADRY, O. M.; RAGAB, H. M.; EL-ENANY, M. M. Synthesis and antimicrobial evaluation of certain purine, benzothiazole and thiazole systems substituted with dialkylaminoalkyl-o-cresols. **Beni-suef university journal of basic and applied sciences**, v. 4 p. 52-59, 2015.
- ABRAHAM, J.; STAFFURTH, J. Hormonal therapy for câncer. **Medicine**, v. 44 (1), p. 30-33, 2016.
- ACILAN, C.; CEVATEMRE, B.; ADIGUZEL, Z.; KARAKAS D.; ULUKAYA E.; RIBEIRO N.; CORREIA I.; PESSOA, J. C. Synthesis, biological characterization and evaluation of molecular mechanisms of novel copper complexes as anticancer agentes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1861 (2), p. 218-234, 2017.
- AGRAWAL, S. S.; SARASWATI S.; MATHUR, R.; PANDEY, M. Antitumor properties of Boswellic acid against Ehrlich ascites cells bearing mouse. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p.1924–1934, 2011.
- AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. J. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 170, p. 211-224, 1994.
- AKI, H.; YAMAMOTO, M. Drug binding to human erythrocytes in the process of ionic drug-induced hemolysis. Flow microcalorimetric approaches. **Biochemical Pharmacology**, v. 41(1), p. 133-138, 1991.
- ALIABADI, A.; SHAMSA, F.; OSTAD, S. N.; EMAMI, S.; SHAFIEE, A.; DAVOODI, J.; FOROUMAD, A. Synthesis and biological evaluation of 2-phenylthiazole-4-carboxamide derivatives as anticancer agents, **European Journal of Mecinical Chemistry**, v.45, p. 5384-5389, 2010.
- ALLEY, M. C.; SCUDIERO, D. A.; MONKS, A.; HURSEY, M. L.; CZERWINSKI, M. J.; FINE, D. L.; ABBOTT, B. J.; MAYO, J. G.; SHOEMAKER, R. H.; BOYD, M. R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Research**, v.48, p.589-601, 1988.

ALTINTOP, M. D.; ATLI, Ö.; ILGIN, S.; DEMIREL, R.; ÖZDEMİR, A.; KAPLANCIKLI, Z. A. Synthesis and biological evaluation of new naphthalene substituted thiosemicarbazone derivatives as potent antifungal and anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 108, p. 406-414, 2016.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Basics**. Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>>. Acesso em: 04 dez. 2015.

ANDERSON, F.E.; DUCA, C. J.; SCUDI, J. V. Some heterocyclic thiosemicarbazones. **Journal of the American Chemical Society**, v.73, p. 4967-4968, 1951.

ANDRES, C. J.; BRONSON, J. J.; D'ANDREA, S. V.; DESHPANDE, M. S.; FALK, P. J.; GRANT-YOUNG, K. A.; HARTE, W. E.; HO, H. T.; MISCO, P. F.; ROBERTSON, J. G.; STOCK, D.; SUN, Y. X.; WALSH, A. W. 4-Thiazolidinones: Novel Inhibitors of the Bacterial Enzyme MurB, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, p. 10, v. 715 – 717, 2000.

ARUMUGAM, R.; NATESAN, V. Urea cycle pathway targeted therapeutic action of naringin against ammonium chloride induced hyperammonemic rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 94, p. 1028–1037, 2017.

BARBOSA, M. O. Planejamento estrutural, síntese e avaliação biológica da atividade tripanocida de 1,3-tiazóis e seus análogos estruturais 4-tiazolinonas. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, 2014.

BARZEN, S.; RÖDL, C. B.; LILL, A.; STEINHILBER, D.; STARK, H.; HOFMANN, B. Synthesis and biological evaluation of a class of 5-benzylidene-2-phenyl-thiazolinones as potent 5-lipoxygenase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 3575–3583, 2012.

BASKAR, R.; LEE, K. A.; YEO, R.; YEOH, K. W. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. **International Journal of Medical Sciences**, v. 9, n. 3, p. 193, 2012.

BAUMANN, K. Cell death: multitasking p53 promotes necrosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.13, p. 480-481, 2012.

BHATTACHARJEE, A.; BASU, A.; BISWAS, J.; SEN, T.; BHATTACHARYA, S. Chemoprotective and chemosensitizing properties of selenium nanoparticle (Nano-Se) during adjuvant therapy with cyclophosphamide in tumor-bearing mice. **Mol Cell Biochem**, v. 424 (1-2), p. 13-33, 2017.

BORKOVA, L.; ADAMEK, R.; KALINA, P.; DRAŠAR, P.; DZUBAK, P.; GURSKA, S.; REHULKA, J.; HAJDUCH, M.; URBAN, M.; SAREK, J. Synthesis and Cytotoxic Activity of Triterpenoid Thiazoles Derived from Allobetulin, Methyl Betulonate, Methyl Oleanonate, and Oleanonic Acid. **ChemMedChem**, v. 12(5), p. 390-398, 2017.

CARDOSO, M. V.; DE SIQUEIRA, L. R.; DA SILVA, E. B.; COSTA, L. B.; HERNANDES, M. Z.; RABELLO, M. M.; FERREIRA, R. S.; DA CRUZ, L. F.; MOREIRA, D. R.; PEREIRA, V. R.; DE CASTRO, M. C.; BERNHARDT, P. V.; LEITE, A. C. 2-Pyridyl thiazoles as novel anti-*Trypanosoma cruzi* agents: structural design, synthesis and pharmacological evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 86, p. 48-59, 2014.

CHABNER, B. A.; ROBERTS Jr, T. G. Chemotherapy and the war on cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 1, p. 65-72, 2005.

CHAKRABORTY, P.; SK, U. H.; BHATTACHARYA, S. Chemoprotection and enhancement of cancer chemotherapeutic efficacy of cyclophosphamide in mice bearing Ehrlich ascites carcinoma by diphenylmethyl selenocyanate. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 4, p. 971-980, 2009.

CHEN, S.; CHEN, L.; LE, N. T.; ZHAO, C.; SIDDURI, A.; LOU, J. P.; MICHOU, C.; PORTLAND, L.; JACKSON, N.; LIU, J. J.; KONZELMANN, F.; CHI, F.; TOVAR, C.; XIANG, Q.; CHEN, Y.; WEN, Y.; VASSILEV, L. T. Synthesis and activity of quinolinyl-methylene-thiazolinones as potent and selective cyclin-dependent kinase 1 inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, p. 2134-2138, 2007.

COSTA-LOTUFO, L. V.; CUNHA, G. M. A.; FARIAS, P. A. M.; VIANA, G. S. B.; CUNHA, K. M. A.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; GRAMOSA, N. V.; RAO, V. S. N. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon**, v. 40, p. 1231-1234, 2002.

CUI, H-X.; TANG, L.; CHENG, F-R.; YUAN, K. Antitumor Effects of Ethanol Extracts from *Hyptis rhomboidea* in H₂₂Tumor-bearing Mice. **Pharmacognosy Magazine**, v. 13 (52), p. 571-575, 2017.

DA SILVA, J. B.; NAVARRO, D. M.; DA SILVA, A. G.; SANTOS, G. K.; DUTRA, K. A.; MOREIRA, D. R.; RAMOS, M. N.; ESPÍNDOLA, J. W.; DE OLIVEIRA, A. D.; BRONDANI, D. J.; LEITE, A. C.; HERNANDES, M. Z.; PEREIRA, V. R.; DA ROCHA, L. F.; DE CASTRO, M. C.; DE OLIVEIRA, B. C.; LAN, Q.; MERZ, K. M. Jr. Thiosemicarbazones as *Aedes aegypti* larvicidal. **European journal of medicinal chemistry**, v. 100, p. 162-175, 2015.

DE ALMAGRO, M. C.; VUCIC, D. Necroptosis: Pathway diversity and characteristics. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 39, p. 56-62, 2015.

DE MELOS, J. L. R.; TORRES-SANTOS, E. C.; FAIÕES, V. S.; CISTIA, C. N. D.; SANT'ANNA, C. M. R.; RODRIGUES-SANTOS, C. E.; ECHEVARRIA, A. Novel 3, 4-methylenedioxyde-6-X-benzaldehyde-thiosemicarbazones: Synthesis and antileishmanial effects against *Leishmania amazonensis*. **European journal of medicinal chemistry**, v. 103, p. 409-417, 2015.

DE SOUZA, M. V. N.; FERREIRA, S. B.; MENDONÇA, J. S.; COSTA, M.; REBELLO, F. R. Métodos de obtenção e aplicações sintéticas de tiazóis, uma importante classe de compostos heterocíclicos. **Química. nova**, v. 28, n. 1, p. 77-84, 2005.

DICKSON, M. A.; SCHWARTZ, G. K. Development of cell-cycle inhibitors for cancer therapy. **Current Oncology**, v. 16(2), p. 36–43, 2009.

DUAN, L. P.; ZHANG, H. B. Novel thiosemicarbazones derivatives bearing aromatic iodine moiety: Design, synthesis and anti-malarial activity. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 4, p. 231–234, 2011.

EDINGER, A. L.; THOMPSON, C. B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 16, p. 663–669, 2004.

EL-ACHKAR, G. A.; JOUNI, M.; MRAD, M F.; HIRZ, T.; EL-HACHEM, N.; KHALAF, A.; HAMMOUD, S.; FAYYAD-KAZAN, H.; EID, A. A.; BADRAN, B.; MERHI, R. A.; HACHEM, A.; HAMADE, E.; HABIB, A. Thiazole derivatives as inhibitors of cyclooxygenases *in vitro* and *in vivo*. **European Journal of Pharmacology**, v. 750, p. 66–73, 2015.

ESPÍNDOLA, J. W. P.; CARDOSO, M. V. O.; FILHO, G. B. O.; OLIVEIRA E SILVA, D. A.; MOREIRA, D. R. M.; BASTOS, T. M.; SIMONE, C. A.; SOARES, M. B. P.; VILLELA, F. S.; FERREIRA, R. S.; CASTRO, M. C. A. B.; PEREIRA, V. R. A.; MURTA, S. M. F.; SALES JUNIOR, P. A.; ROMANHA, A. J.; LEITE, A. C. L. Synthesis and structure–activity relationship study of a new series of antiparasitic

aryloxyl thiosemicarbazones inhibiting *Trypanosoma cruzi* cruzain. **European journal of medicinal chemistry**, v. 101, p. 818-835, 2015.

FALLAH-TAFTI, A.; FOROUMADI, A.; TIWARI, R.; SHIRAZI, A. N.; HANGAUER, D. G.; BU, Y.; AKBARZADEH, T.; PARANG, K.; SHAFIEE, A. Thiazolyl *N*-benzyl-substituted acetamide derivatives: Synthesis, Src kinase inhibitory and anticancer activities, **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 4853-4858, 2011.

FARGHALY, T. A.; ABDALLAH, M. A.; MASARET, G. S.; MUHAMMAD, G. S. New and efficient approach for synthesis of novel bioactive [1,3,4] thiadiazoles incorporated with 1,3-thiazole moiety. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 320-333, 2015.

FLUSBERG, D. A.; SORGER, P. K. Surviving apoptosis: life–death signaling in single cells. **Trends in cell biology**, v. 25 (8), p. 446-458, 2015.

FUCHS, Y.; STELLER, H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.16, p. 329-344, 2015.

GERARD, C.; GONZE, D.; GOLDBETER, A. Effect of positive feedback loops on the robustness of oscillations in the network of cyclin-dependent kinases driving the mammalian cell cycle. **FEBS Journal**, v. 279, p. 3411–3431, 2012.

GINGRAS, B. A.; SOMORJAI, R.L.; BAYLEY, C.H. The preparation of some thiosemicarbazones and their copper complexes. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 39, p. 973-985, 1961

GOMHA, S. M.; AHMED, S. A.; ABDELHAMID, A. O. Synthesis and Cytotoxicity Evaluation of Some Novel Thiazoles, Thiadiazoles, and Pyrido[2,3-*d*][1,2,4]triazolo[4,3-*a*]pyrimidin-5(1*H*)-ones Incorporating Triazole Moiety. **Molecules**, v. 20, p. 1357-1376, 2015.

GOZUACIK, D.; KIMCHI, A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. **Oncogene**, v. 23, p. 2891–2906, 2004.

GREEN, D. R.; REED, J. C. Mitochondria and Apoptosis. **Science**, v. 281, p 1309-1312, 1998.

GROZAV, A.; GĂINĂ, L. I.; PILECZKI, V.; CRISAN, O.; SILAGHI-DUMITRESCU, L.; THERRIEN, B.; ZAHARIA, V.; BERINDAN-NEAGOE, I. The Synthesis and antiproliferative activities of new arylidene-hydrazinyl-thiazole derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, v.15, p. 22059-22072, 2014.

GUGGILAPU, S. D.; GUNTUKU, L.; REDDY, T. S.; NAGARSENKAR, A.; SIGALAPALLI, D. K.; NAIDU, V. G. M.; BHARGAVA, S. K.; BABU, B. N. Synthesis of thiazole linked indolyl-3-glyoxylamide derivatives as tubulin polymerization inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.138, p. 83-95, 2017.

GUILDER, L.; PULA, S.; PIERRE, G. Metabolic disorders presenting as liver disease. **Paediatrics and Child Health**, v. 27 (12), p. 533-539, 2017.

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

HASSAN, M.; WATARI, H.; ABUALMAATY, A.; OHBA, Y.; SAKURAGI, N. Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer. **BioMed Research International**, v. 2014, p.1-23, 2014.

HE, H.; WANG, X.; SHI, L.; YIN, W.; YANG, Z.; HE, H.; LIANG, Y. Synthesis, antitumor activity and mechanism of action of novel 1,3-thiazole derivatives containing hydrazide-hydrazone and carboxamide moiety. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26(14), p. 3263-70, 2016

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-776, 2000.

HSIUNG, W. Y.; KADIR, H. A. *Leea indica* Ethyl Acetate Fraction Induces Growth-Inhibitory Effect in Various Cancer Cell Lines and Apoptosis in Ca Ski Human Cervical Epidermoid Carcinoma Cells. **Evid Based Complement Alternat Med.**, v. 2011, p. 1-13, 2011.

HUANG, C. H.; CHEN, Y. J.; CHAO, T. Y.; LIU, W. H.; CHANGCHIEN, J. J.; HU, W. P.; CHANG, L. S. The Association Between p38 MAPK-Mediated TNF- α /TNFR2 up-Regulation and 2-(4-Aminophenyl)-7-Methoxybenzothiazole-Induced Apoptosis in Human Leukemia U937 Cells. **J Cell Physiol.**, v. 231(1), p. 130-141, 2016.

HUANG, C.; FRETER, C. Lipid Metabolism, Apoptosis and Cancer Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 924-949, 2015.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil): **Estimativas 2016: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <
<http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016.asp>>. Acesso em: 04 dez. 2015.

JIN, Y.; DING, K.; WANG, D.; SHEN, M.; PAN, J. Novel thiazole amine class tyrosine kinase inhibitors induce apoptosis in human mast cells expressing D816V KIT mutation. **Cancer Letters**, v. 353, p. 115–123, 2014.

KALINOWSKI, D. S.; RICHARDSON, D. R. The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 57, p. 547-583, 2005.

KAMAL, A.; ASHRAF, M.; VISHNU VARDHAN, M. V.; FAAZIL, S.; NAYAK, V. L. Synthesis and anticancer potential of benzothiazole linked phenylpyridopyrimidinones and their diones as mitochondrial apoptotic inducers. **Bioorg Med Chem Lett.**, v. 24(1):147-51, 2014.

KASHYAP, S. J.; GARG, V. K.; SHARMA, P. K.; KUMAR, N.; DUDHE, R.; GUPTA, J. K. Thiazoles: having diverse biological activities. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, p. 2123–2132, 2012.

KASTL, J. T. Renal function in the fetus and neonate - The creatinine enigma. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, v. 22 (2), p. 83-89, 2017.

KENNY, P. A.; LEE, G. Y.; BISSELL, M. J. Targeting the tumor microenvironment. **Frontiers in bioscience**, v. 12, p. 3468–3474, 2007.

KEPP, O.; GALLUZZI, L.; LIPINSKI, M.; YUAN, J.; KROEMER, G. Cell death assay for drugs Discovery. **Nat Rev Drug Discov**, v. 10(3), p.221-37, 2011.

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**, v. 26, p. 239-257, 1972.

KLUG, W. S.; CUMMINGS, M. R. **Essentials of Genetics**. 4. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2002. p. 431-449.

KOFF, J. L.; RAMACHANDIRAN, S.; BERNAL-MIZRACHI, L. A Time to Kill: Targeting Apoptosis in Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 2942-2955; 2015.

KOVAL, O. A.; FOMIN, A. S.; KALEDIN, V. I.; SEMENOV, D. V.; POTAPENKO, M. O.; KULIGINA, E. V.; NIKOLIN, V. P.; NIKITENKO, E. V.; RICHTER, V. A. A novel pro-apoptotic effector lactaptin inhibits tumor growth in mice models. **Biochimie**, v. 94, p. 2467-2474, 2012.

KRUGER, P.; SAFFARZADEH, M.; WEBER, A. N.; RIEBER, N.; RADSAK, M.; VON BERNUTH H.; BENARAF, C.; ROOS, D.; SKOKOWA, J.; HARTL, D. Neutrophils: Between host defence, immunomodulation, and tissue injury. **PLoS Pathogens**, v. 11 (3), p. e1004651, 2015.

LABUZETTA, J. N.; YAO, J. Z.; BOURQUE, D. L.; ZIVIN, J. Adult non hepatic hyperammonemia: a case report and differential diagnosis. **The American Journal of Medicine**, v. 123(10), p. 885-891, 2010.

LEFRANC, F.; XU, Z.; BURTH, P.; MATHIEU, V.; REVELANT, G.; FARIA, M. V. C.; NOYON, C.; GARCIA, D. G.; DUFOUR, D.; BRUYÈRE, C.; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, C. F.; ANTWERPEN, P. V.; ROGISTER, B.; HESSE, S.; KIRSCH, G.; KISS, R. 4-Bromo-2-(piperidin-1-yl)thiazol-5-yl-phenyl methanone (**12b**) inhibits Na⁺/K⁺-ATPase and Ras oncogene activity in cancer cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, p. 213-223, 2013.

LEITE, A. C. L.; SANTOS, L. M. F.; BARBOSA, F. F.; CARDOSO, M. V. O.; MOREIRA, D. R. M.; SOUZA, I. A. Synthesis of aminoacyl thiaolidones as potential antitumour agents. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 60, p. 121– 126, 2006.

LI, M. X.; CHEN, C. L.; LING, C. S.; ZHOU, J.; JI, B. S.; WU, Y. J.; NIU, J. Y. Cytotoxicity and structure–activity relationships of four α -N-heterocyclic thiosemicarbazone derivatives crystal structure of 2-acetylpyrazine thiosemicarbazone. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 2704–2706, 2009.

LOCKSHIN, R. A.; ZAKERI, Z. Cell death in health and disease. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 11, n. 6, p. 1214-1224, 2007.

LOPEZ J.; TAIT, S. W. G. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. **British Journal of Cancer**, v.112, p. 957–962, 2015.

LU, Y.; YE, Y.; YANG, Q.; SHI, S. Single-cell RNA-sequence analysis of mouse glomerular mesangial cells uncovers mesangial cell essential genes. **Kidney International**, v. 92, p. 504–513, 2017.

MAGALHÃES, J. M. C. S.; MACHADO, A. A. S. C. Array of potentiometric sensors for the analysis of creatinine in urine samples. **Analyst**, v. 127, p. 1069–1075, 2002.

MAHONEY, K. M.; RENNERT, P. D.; FREEMAN, G. J. Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.14, p. 561-584, 2015.

MISHRA, C. B.; KUMARI, S.; TIWARI, M. Thiazole: A promising heterocycle for the development of potent CNS active agentes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.92, p. 1-34, 2015.

MOHAMMAD, R. M.; MUQBIL, I.; LOWE, L.; YEDJOU, C.; HSU, H. Y.; LIN, L. T.; SIEGELIN, M. D.; FIMOIGNARI, C.; KUMAR, N. B.; DOU, Q. P.; YANG, H.; SAMADI, A. K.; RUSSO, G. L.; SPAGNUOLO, C.; RAY, S. K.; CHAKRABARTI, M.; MORRE, J. D.; COLEY, H. M.; HONOKI, K.; FUJII, H.; GEORGAKILAS, A. G.; AMEDEI, A.; NICCOLAI, E.; AMIN, A.; ASHRAF, S. S.; HELFERICH, W. G.; YANG, X.; BOOSANI, C. S.; GUHA, G.; BHAKTA, D.; CIRIOLO, M. R.; AQUILANO, K.; CHEN, S.; MOHAMMED, S. I.; KEITH, W. N.; BILSLAND, A.; HALICKA, D.; NOWSHEEN, S.; AZMI, A. S.
Broad targeting of resistance to apoptosis in câncer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, p. S78–S103, 2015.

MOLEDINA, D. G.; HALL, I. E.; THIESSEN-PHILBROOK, H.; REESE, P. P.; WENG, F. L.; SCHRÖPPEL, B.; DOSHI, M. D.; WILSON, F. P.; COCA, S. G.; PARIKH, C. R. Performance of serum creatinine and kidney injury biomarkers for diagnosing histologic acute tubular injury. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 70(6), p. 807-816, 2017.

MOREIRA, D. R. M. M.; COSTA, S. P. M.; HERNANDES, M. Z.; RABELLO, M. M.; OLIVEIRA FILHO, G. B.; MELO, C. M. L.; ROCHA, L. F.; SIMONE, C. A.; FERREIRA, R.; FRADICO, J. R. B.; MEIRA, C. S.; GUIMARÃES, E. T.; SRIVASTAVA, R. M.; PEREIRA, V.; SOARES, M. B. P. S.; LEITE, A. C. L. L. Structural investigation of anti-trypanosoma cruzi 2-iminothiazolidin-4-ones allows the identification of agents with efficacy in infected mice. **Journal of Medical Chemistry**, v. 55, p. 10918-10936, 2012.

MOREIRA, D. R. M.; DE OLIVEIRA, A. D.; GOMES, P. A. T. M.; DE SIMONE, C. A.; VILLELA, F.S.; FERREIRA, R. S.; DA SILVA, A. C.; DOS SANTOS, T. A. R.; BRELAZ DE CASTRO M. C. A.; PEREIRA, V. R. A.; LEITE, A. C.

L. Conformational restriction of aryl thiosemicarbazones produces potent and selective anti-Trypanosoma cruzi compounds which induce apoptotic parasite death. **European journal of medicinal chemistry**, v. 75, p. 467-478, 2014.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55 – 63, 1983.

NAGELKERKE, A.; SWEEP, F. C. G. J.; GEURTS-MOESPOT, A.; BUSSINK, J.; SPAN, P. N. Therapeutic targeting of autophagy in cancer. Part I: Molecular pathways controlling autophagy. **Seminars in Cancer Biology**, v. 31, p. 89-98, 2015.

NAIKI, T.; KAWAI, N.; OKAMURA, T.; NAGATA, D.; KOJIMA, Y.; AKITA, H.; YASUI, T.; TOZAWA, K.; KOHRI, K. Neoadjuvant hormonal therapy is a feasible option in laparoscopic radical prostatectomy. **BMC Urology**, v. 12, p. 36., 2012.

NARASIMHA RAO, M. P.; NAGARAJU, B.; KOVVURI, J.; POLEPALLI, S.; ALAVALA, S.; VISHNUVARDHAN, M. V. P. S.; SWAPNA, P.; NIMBARTE, V. D.; LAKSHMI, J. K.; JAIN, N.; KAMAL, A. Synthesis of imidazo-thiadiazole linked indolinone conjugates and evaluated their microtubule network disrupting and apoptosis inducing ability. **Bioorganic Chemistry**, v. 76, p. 420–436, 2018.

NATESAN, V.; MANI, R.; ARUMUGAM, R. Clinical aspects of urea cycle dysfunction and altered brain energy metabolism on modulation of glutamate receptors and transporters in acute and chronic hyperammonemia. **Biomed Pharmacother**, v. 81, p.192-202, 2016.

NETALKAR, P. P.; NETALKAR, S. P.; REVANKAR, V. K. Transition metal complexes of thiosemicarbazone: Synthesis, structures and in vitro antimicrobial studies. **Polyhedron**, v. 100, p. 215–222, 2015.

OLSON, H.; BETTON, G.; ROBINSON, D.; THOMAS, K.; MONRO, A.; KOLAJA, G.; LILLY, P.; SANDERS, J.; SIPES, G.; BRACKEN, W.; DORATO, M.; DEUN, K. V.; SMITH, P.; BERGER, B.; HELLER, A. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 32(1), p. 56-67, 2000.

Organization for Economic Cooperation and Development, **OECD/OCDE**. Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method. **Guideline for the Testing of Chemicals**, p. 1-14, dezembro, 2001.

OURIQUE, F.; KVIECINSKI, M. R.; ZIRBEL, G.; CASTRO, L. S. E. P. W.; CASTRO, A. J. G.; SILVA, F. R. M. B.; VALDERRAMA, J. A.; RIOS, D.; BENITES, J.; CALDERON, P. B.; PEDROSA, R. C. In vivo inhibition of tumor progression by 5 hydroxy-1,4-naphthoquinone (juglone) and 2-(4-hydroxyanilino)-1,4-naphthoquinone (Q7) in combination with ascorbate. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 477, p. 640-646, 2016.

OUYANG, L.; SHI, Z.; ZHAO, S.; WANG, F.T.; ZHOU, T.T.; LIU, B.; BAO, J.K. Programmed cell death pathwas in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Proliferation**. v. 45, p. 487-498, 2012.

PAPATRIANTAFYLLOU, M. Cell death: Programmed necrosis: putting the pieces together. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, p. 135, 2012.

PARRINO, B.; ATTANZIO, A.; SPANO, V.; CASCIOFERRO, S.; MONTALBANO, A.; BARRAJA, P.; TESORIERE, L.; DIANA, P.; CIRRINCIONE, G.; CARBONE, A. Synthesis, antitumor activity and CDK1 inhibiton of new thiazolenortopsentin analogues. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 138, p. 371-383, 2017.

QIAN, H.; LIU, B.; JIANG, X. Application of nanomaterials in câncer immunotherapy. **Materials Today Chemistry**, v. 7, p. 53-64, 2018.

RAMYA P. V. S.; ANGAPELLY, S.; GUNTUKU, L.; DIGWAL C. S.; BABU, B. N.; NAIDU, V. G. M.; KAMAL, A. Synthesis and biological evaluation of curcumin inspired indole analogues as tubulin polymerization inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 127, p. 100-114, 2017.

RICHARDSON, D. R. Iron chelators as therapeutic agents for the treatment of cancer. **Crit Rev Oncol Hematol.**, v. 42, p.267-81, 2002.

ROLIM, T. L.; MEIRELES, D. R. P.; BATISTA, T. M.; DE SOUSA, T. K. G.; MANGUEIRA, V. M.; DE ABRANTES, R. A.; PITA, J. C. L. R.; XAVIER, A. L.; COSTA, V. C. O.; BATISTA, L. M.; DA SILVA, M. S.; SOBRAL M. V. Toxicity and antitumor potential of *Mesosphaerum sidifolium* (Lamiaceae) oil and fenchone, its major component. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.17(347), p. 11-12, 2017.

SANTOS SILVA, T. D.; BOMFIM, L. M.; RODRIGUES, A. C. B. C.; DIAS, R. B.; SALES, C. B. S.; ROCHA, C. A. G.; SOARES, M. B. P.; BEZERRA, D. P.; CARDOSO, M. V. O.; LEITE, A. C. L.; MILITÃO, G. C. G. Anti-liver cancer

activity in vitro and in vivo induced by 2-pyridyl 2,3-thiazole derivatives. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 329, p. 212–223, 2017.

SCATTON, O.; ZALINSKI, S.; JEGOU, D.; COMPAGNON, P.; LESURTEL, M.; BELGHITI, J.; BOUDJEMA, K.; LENTSCHENER, C.; SOUBRANE, O. Randomized clinical trial of ischaemic preconditioning in major liver resection with intermittent Pringle manoeuvre. **British Journal of Surgery**, v. 98, p. 1236–1243, 2011.

SCHLONDORFF, D. The glomerular mesangial cell: an expanding role for a specialized pericyte. **FASEB J**, v. 1, p. 272–281, 1987.

SENKIV, J.; FINIUK, N.; KAMINSKY, D.; HAVRYLYUK, D.; WOJTYRA, M.; KRIL, I.; GZELLA, A.; STOIKA, R.; LESYK, R. 5-Ene-4-thiazolidinones induce apoptosis in mammalian leukemia cells. **European journal of medicinal chemistry**, v. 117, p. 33-46, 2016.

SHAIK S. P.; NAYAK, V. L.; SULTANA, F.; RAO, A. V.; SHAIK. A. B.; BABU, K. S.; KAMAL, A. Design and synthesis of imidazo[2,1-b]thiazole linked triazole conjugates: Microtubule-destabilizing agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 126, p. 36-51, 2017.

SHARMA, N.; MOHANAKRISHNAN, D.; SHARD, A.; SHARMA, A.; SAIMA, SINHA, A. K, SAHAL, D. Stilbene-chalcone hybrids: design, synthesis, and evaluation as a new class of antimalarial scaffolds that trigger cell death through stage specific apoptosis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55(1), p. 297-311, 2012.

SHE, S.; WEI, Q.; KANG, B.; WANG, YJ. Cell cycle and pluripotency: Convergence on octamer-binding transcription factor 4 (Review). **Molecular medicine reports**, v. 16, p. 6459-6466, 2017.

SHI, H. B.; ZHANG, S. J.; GE, Q. F.; GUO, D. W.; CAI, C. M.; HU, W. X. Synthesis and anticancer evaluation of thiazolyl–chalcones, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 6555-6559, 2010.

SIDDIQUI, N.; ARSHAD, M. F.; AHSAN, W.; ALAM, M. S. Thiazoles: a valuable insight into the recent advances and biological activities. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v.1, p. 136-143, 2009.

SIDDIQUI, N.; ARYA, S. K.; AHSAN, W.; AZAD, B. Diverse biological activities of Thiazoles: A Retrospect. **International Journal of Drug Development & Research**, v. 3, 55-67, 2011.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2015. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, p. 5–29, 2015.

SPANÒ V.; ATTANZIO, A.; CASCIOFERRO, S.; CARBONE, A.; MONTALBANO, A.; BARRAJA, P.; TESORIERE, L.; CIRRINCIONE, G.; DIANA, P.; PARRINO, B. Synthesis and Antitumor Activity of New Thiazole Nortopsentin Analogs. **Marine Drugs**, v. 14(12), p. 1-18, 2016.

SULTANA, F.; BONAM, S. R.; REDDY, V. G.; NAYAK, V. L.; AKUNURI, R.; ROUTHU, S. R.; ALARIFI, A.; HALMUTHUR, M. S. K.; KAMAL, K. Synthesis of benzo[d]imidazo[2,1-b]thiazole-chalcone conjugates as microtubule targeting and apoptosis inducing agentes. **Bioorganic Chemistry**, v. 76, p. 1–12, 2018.

TAIT, W. G.; GREEN, D. R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond Stephen. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, 621-632, 2010.

THAKKAR, N.; SLIZGI, J. R.; BROUWER, K. L. R. Effect of Liver Disease on Hepatic Transporter Expression and Function. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 106 (9), p. 2282-2294, 2017.

Thomas G. **Química medicinal: uma introdução**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 413 p.

TURAN-ZITOUNI, G.; ALTINTOP, M. D.; ÖZDEMİR, A.; KAPLANCIKLI, Z. A.; ÇİFTÇİ, G. A.; TEMEL, H. E. Synthesis and evaluation of bis-thiazole derivatives as new anticâncer agentes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v 107, p. 288-294, 2016.

UTKU, N. New Approaches to Treat Cancer–What They Can and Cannot Do. **Biotechnology Healthcare**, v. 8, n. 4, p. 25, 2011.

VAGHASIYA, Y.K.; SHUKLA, V. J.; CHANDA, S. V. Acute oral toxicity study of *Pluchea arguta* Boiss extract in mice. **Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 6(2), p. 113-123, 2011.

VANDEN BERGHE, T.; LINKERMANN, A.; JOUAN- LANHOUE, S.; WALCZAK, H.; VANDENABEELE, P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic

cell death pathways. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v.15, 135–147, 2014.

VANNEMAN, M.; DRANOFF, G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, p. 237-251, 2012.

VERBRUGGE, I.; JOHNSTONE, R. W.; SMYTH, M. J. SnapShot: Extrinsic Apoptosis Pathways. **Cell**, v. 143, p. 1192, 1192.e1-2, 2010.

VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. **J. Immunol. Methods**, v. 243, p. 167-190, 2000.

VIKNESWARAN, R.; ELTAYEB, N. E.; RAMESH, S.; YAHYA, R. New alicyclic thiosemicarbazone chelated zinc(II) antitumor complexes: Interactions with DNA/protein, nuclease activity and inhibition of topoisomerase-I. **Polyhedron**. v. 105, p. 89-95, 2016.

WAYTECK, L.; BRECKPOT, K.; DEMEESTER, J.; DE SMEDT, S. C.; RAEMDONCK, K. A personalized view on cancer immunotherapy. **Cancer Letters**, v. 352, p. 113–125, 2014.

WILLIAMS, G. H.; STOEBER, K. The cell cycle and cancer. **Journal of Pathology**, v. 226, p. 352–364, 2012.

WYLD, L.; AUDISIO, R. A.; POSTON, G. J. The evolution of cancer surgery and future perspectives. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 12, p. 115–124, 2015.

XUEJIAO, S.; YONG, X.; NINGYU, W.; LIDAN, Z.; XUANHONG, S.; YOUZHI, X.; TINGHONG, Y.; YAOJIE, S.; YONGXIA, Z.; LUOTING, Y.
A novel benzothiazole derivative YLT322 induces apoptosis via the mitochondrial apoptosis pathway in vitro with anti-tumor activity in solid malignancies. **PLoS One**, v. 8(5), p. e63900 (1-10), 2013.

XUEJIAO, S.; YONG, X.; NINGYU, W.; LIDAN, Z.; XUANHONG, S.; YOUZHI, X.; TINGHONG, Y.; YAOJIE, S.; YONGXIA, Z.; LUOTING, Y.
A novel benzothiazole derivative YLT322 induces apoptosis via the mitochondrial apoptosis pathway in vitro with anti-tumor activity in solid malignancies. **PLoS One**, v. 8(5), e63900, 2013.

YI, J.; QU, H.; WU, Y.; WANG, Z.; WANG, L. Study on antitumor, antioxidant and immunoregulatory activities of the purified polyphenols from Pinecone of *Pinus koraiensis* on Tumor-bearing S180 mice *in vivo*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.94, p. 735-744. 2017.

YU, Y.; FU, X.; RAN, Q.; YANG, K.; WEN, Y.; LI, H.; WANG, F. Globularifolin exerts anticancer effects on glioma U87 cells through inhibition of Akt/mTOR and MEK/ERK signaling pathways *in vitro* and inhibits tumor growth *in vivo*. **Biochimie**, v. 142, p. 144-151, 2017.

ZAMORA, E.; LUPÓN, J.; URRUTIA, A.; GONZÁLEZ, B.; MAS, D.; DÍEZ, C.; ALTIMIR, S.; VALLE, V. Prognostic Significance of Creatinine Clearance in Patients With Heart Failure and Normal Serum Creatinine. **Ver Esp Cardiol**, v. 60(12), p. 1315-1318, 2007.

ZHANG, X. M.; GUO, H.; LI, Z. S.; SONG, F. H.; WANG, W. M.; DAI, H. Q.; ZHANG, L. X.; WANG, J. G. Synthesis and evaluation of isatin- β -thiosemicarbazones as novel agents against antibiotic-resistant Gram-positive bacterial species. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 101, p. 419-430, 2015.

ANEXO A – Artigo publicado

Share your article [EJME] x Synthesis, anticancer acti x

www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523417310668

Purchase PDF Export

Search ScienceDirect Advanced

Outline

Highlights

Abstract

Graphical abstract

Keywords

1. Introduction

2. Results and discussion

3. Conclusion

4. Experimental section

Acknowledgments

Appendix A. Supplementary data

References

Show full outline

Figures (7)

European Journal of Medicinal Chemistry

Volume 144, 20 January 2018, Pages 874–886

Research paper

Synthesis, anticancer activity and mechanism of action of new thiazole derivatives

Temístocles Italo de Santana ^{a, 1}, Miria de Oliveira Barbosa ^{b, 1}, Paulo André Teixeira de Moraes Gomes ^b, Anne Cecilia Nascimento da Cruz ^a, Teresinha Gonçalves da Silva ^a, Ana Cristina Lima Leite ^{b, 1}

Show more

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.12.040>

Get rights and content

Highlights

- The cytotoxic activity of 3 thiosemicarbazones and 19 new thiazoles was evaluated.
- Eight compounds were shown to be promising in at least three tumor cell lines.
- Compound **1d** induced mitochondrial depolarization.

Recommended articles

Synthesis and anticancer activity of novel wate...
European Journal of Medicinal Chemistry, Volume ...
Download PDF View details

Novel click modifiable thioquinazolinones as a ...
European Journal of Medicinal Chemistry, Volume ...
Download PDF View details

Rational approach to highly potent and selectiv...
European Journal of Medicinal Chemistry, 2017
Download PDF View details

View more articles

Citing articles (0)

Feedback

21:36 20/01/2018