



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

ANNE CECÍLIA NASCIMENTO DA CRUZ

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, MUTAGENICIDADE E
DO POTENCIAL ANTICÂNCER DE NOVOS DERIVADOS
ARIL-SEMICARBAZÔNICOS E ARIL-TIOSSEMICARBAZÔNICOS**

**Recife
2018**

ANNE CECÍLIA NASCIMENTO DA CRUZ

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, MUTAGENICIDADE E DO POTENCIAL
ANTICÂNCER DE NOVOS DERIVADOS ARIL-SEMICARBAZÔNICOS E
ARIL-TIOSSEMICARBAZÔNICOS**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Obtenção e
Avaliação de Produtos Naturais e
Bioativos.

Orientadora: Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva.

Coorientadores: Prof. Dr. Dalci José Brondani.

Prof. Dr. Pascal Marchand.

**Recife
2018**

Catalogação na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

C957a Cruz, Anne Cecília Nascimento da.
Avaliação da citotoxicidade, mutagenicidade e do potencial anticâncer de novos derivados aril-semicarbazônicos e aril-tiosemicarbazônicos / Anne Cecília Nascimento da Cruz. – 2018.
120 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. Anticâncer. 2 Semicarbazonas. 3. Apoptose. 4. Ciclo celular. 5. Proteínas quinases.. I. Silva, Teresinha Gonçalves da (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2018-251)

ANNE CECÍLIA NASCIMENTO DA CRUZ

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, MUTAGENICIDADE E DO POTENCIAL
ANTICÂNCER DE NOVOS DERIVADOS ARIL-SEMICARBAZÔNICOS E
ARIL-TIOSSEMICARBAZÔNICOS**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 27 de julho de 2018.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva (Presidente e Orientadora)
Departamento de Antibióticos/UFPE

Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes (Examinador interno)
Departamento de Antibióticos/UFPE

Profa. Dra. Silene Carneiro do Nascimento (Examinadora externa)
Departamento de Antibióticos/UFPE

Profa. Dra. Maria do Desterro Rodrigues (Examinadora externa)
Departamento de Antibióticos/UFPE

Profa. Dra. Paloma Lys de Medeiros (Examinadora externa)
Departamento de Histologia e Embriologia/UFPE

Profa. Dra. Ivone Antônia de Souza (Suplente interno)
Departamento de Antibióticos/UFPE

Profa. Dra. Jaciana dos Santos Aguiar (Suplente externo)
Departamento de Antibióticos/UFPE

*Aos meus pais, Geraldo e Maria José.
Aos meus queridos, Sebastião e Eliza.
Vocês foram imprescindíveis nessa conquista.
Obrigada por tudo!*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que se faz presente em todos os momentos de minha vida me iluminando e me dando forças para seguir.

A **Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva**, que contribui para minha formação desse a época da graduação. Agradeço pelas oportunidades oferecidas, pela paciência, compreensão, incentivos e ensinamentos. Muito do que sou, devo a senhora, muito obrigada por tudo.

Ao **Prof. Dr. Dalci José Brondani**, pela coorientação e por fornecer as moléculas estudadas nesse trabalho. Muito obrigada pelas contribuições e pela disponibilidade todas as vezes que precisei.

Ao **Prof. Dr. Pascal Marchand**, obrigada pela coorientação e pelas contribuições no andamento do projeto.

A **comissão examinadora**, obrigada por aceitarem o convite, as contribuições dos senhores serão valiosas para esse trabalho.

A **Profa. Dra. Maria do Desterro Rodrigues**, pela amizade, ajuda e auxílio no Laboratório de Cultura de Células.

A **Profa. Dra. Jaciana dos Santos Aguiar**, pela amizade, ajuda e incentivo em todos esses anos que nos conhecemos.

A **minha família** pelo apoio e coragem que sempre me transmitiram, pelos conselhos, desabafo e consolo nas horas que precisei.

Aos meus irmãos **Adriano** e **Davi**, minha cunhada **Juliane** e sobrinho **Julinho**, obrigada pelo carinho e por torcerem por mim.

A minha **vozinha Olga**, **tia Odália** e **Irmã Stella** (*in memoriam*), que me ajudaram de tantas formas para que eu conseguisse chegar até aqui.

A **George**, meu namorado, que me ajudou tanto nesses anos, obrigada pelo companheirismo, força, paciência e carinho. Sem você, teria sido muito mais difícil.

A **Shirllane**, **Sherlly** e **Nathália**, **Shelton** e **Benedita**, obrigada pelo companheirismo e amizade, por saber que posso contar com vocês e pelos momentos bons que já passamos juntos.

Aos **integrantes do BIOFARMATOX**, pela amizade, ajuda e pelos momentos de descontração que foram essenciais para aliviar o estresse do dia a dia.

A **Temístocles Santana** e **Larissa Cardoso**, companheiros de muitos experimentos, obrigada pela amizade, ensinamentos e pela ajuda em tantas vezes que precisei.

A Fundação de Amparo a Pesquisa (FACEPE), pelo apoio financeiro.

A todos, muito Obrigada!

*“Lute com determinação, abrace a vida com paixão,
perca com classe e vença com ousadia,
porque o mundo pertence a quem se atreve
e a vida é muito para ser insignificante.”*

Charles Chaplin

RESUMO

As semicarbazonas e tiosemicarbazonas apresentam um amplo perfil de atividades biológicas, dentre as quais as atividades citotóxica e antitumoral se destacam. Nesse contexto, o presente estudo avaliou o potencial anticâncer de quatorze novos derivados aril-semicarbazônicos e onze novos derivados aril-tiosemicarbazônicos. O *screening* citotóxico foi realizado pelo teste do MTT frente a linhagens de câncer humano e células normais. Os compostos mais promissores foram selecionados para o estudo do mecanismo de morte celular por citometria de fluxo. Os testes realizados analisaram a viabilidade das células, despolarização mitocondrial, ciclo celular, fragmentação do DNA e indução de morte. O teste de Toxicidade Oral Aguda foi realizado segundo o protocolo da OECD 423. A avaliação da atividade antitumoral foi realizada em modelo de tumor sólido de Carcinoma de Ehrlich e a atividade mutagênica foi realizada em sangue periférico de camundongos. Nos resultados apresentados pelos derivados aril-semicarbazônicos, os compostos **3c** e **4a** se destacaram e foram escolhidos para a continuidade dos testes frente à linhagem HL-60. Esses compostos foram capazes de reduzir a viabilidade das células e induzir a despolarização mitocondrial. Além disso, o derivado **3c** inibiu o complexo CDK2/Ciclina A impedindo a progressão da fase S para fase G2/M do ciclo celular. O derivado **4a** provocou parada de ciclo na fase G1 e induziu fragmentação do DNA. Os resultados obtidos demonstraram processo apoptótico nas células HL-60 e foi confirmado pelo teste da anexina. Diante dos resultados apresentados pelos derivados aril-tiosemicarbazônicos, o composto **TS04** foi escolhido para o estudo do mecanismo de morte celular frente às linhagens K562 e NCI-H292. Na análise morfológica o composto **TS04** provocou alterações típicas de apoptose nas duas linhagens. Na linhagem K562, provocou parada de ciclo celular na fase G1 e promoveu a fragmentação do DNA. Na linhagem NCI-H292 na menor concentração, provocou bloqueio do ciclo celular na fase G2/M e na maior concentração, provocou parada em G1 e G2/M. A indução de morte por apoptose foi confirmada pelo teste da anexina nas duas linhagens. Os resultados encontrados *in vitro* para o composto **TS04** foram promissores, o que motivou a continuidade dos estudos em modelo *in vivo*. No ensaio de Toxicidade Oral Aguda ficou classificado na categoria 3 (50 mg/kg < DL₅₀ < 300 mg/kg). Na avaliação da atividade antitumoral foi capaz de inibir o crescimento tumoral em 82% na maior dose testada (30 mg/kg) e não provocou efeito mutagênico nos animais tratados. Os resultados apresentados demonstram que os derivados aril-semicarbazônicos e aril-tiosemicarbazônicos estudados são agentes com atividade

anticâncer promissora e que podem ser eleitos para a continuidade dos testes pré-clínicos necessários visando novos medicamentos para tratamento do câncer.

Palavras-chaves: Câncer. Semicarbazonas. Apoptose. Quinases. Antitumoral.

ABSTRACT

The semicarbazones and thiosemicarbazones present a broad profile of biological activities, among which cytotoxic and antitumoral activities stand out. The present study evaluated the anticancer potential of fourteen new aryl-semicarbazones derivatives and eleven new aryl-thiosemicarbazones derivatives. Cytotoxic screening was performed by the MTT test against human cancer lines and normal cell. The most promising compounds were chosen for study of the mechanism of death by flow cytometry. The tests performed analyzed cell viability, mitochondrial depolarization, cell cycle, DNA fragmentation and induction of cell death. The Acute Oral Toxicity test was performed following the OECD Test Guideline 423. The evaluation of the antitumor activity was performed in a solid tumor model of Ehrlich's Carcinoma and the mutagenic activity was performed in peripheral blood of mice. In the results presented by the aryl-semicarbazones derivatives, the compounds **3c** and **4a** stand out and were chosen for the continuity of the tests against the HL-60 line. The compounds were able to reduce cell viability and induce mitochondrial depolarization. In addition, derivative **3c** inhibited CDK2/Cyclin A complex by preventing the progression of S phase to G2/M phase of the cell cycle. Derivative **4a** caused arrest in the G1 phase and induced DNA fragmentation. The results obtained demonstrated an apoptotic process in HL-60 cells and was confirmed by the annexin test. In view of the results presented by the aryl-thiosemicarbazones derivatives, the compound **TS04** was chosen for the study of the mechanism of cell death against the lines K562 and NCI-H292. In the morphological analysis the compound **TS04** caused typical alterations of apoptotic processes in the two lines. In the K562 line, it caused cell cycle arrest in the G1 phase and promoted DNA fragmentation. In NCI-H292 line in lower concentration, caused cell cycle blockade in G2/M phase and the highest concentration, caused arrest in G1 and G2/M. The induction of death by apoptosis was confirmed by the annexin test in the two lines. The *in vitro* results for the compound **TS04** were promising, which motivated the continuity of the studies *in vivo* model. In the acute oral toxicity test, it was classified in category 3 (50 mg/kg <LD₅₀ <300 mg/kg). In the evaluation of antitumor activity it was able to inhibit tumor growth in 82% in the highest dose tested (30 mg/kg) and did not cause a mutagenic effect in treated animals. The results show that the aryl-semicarbazones and aryl-thiosemicarbazones derivatives studied are agents with promising anticancer activity and that can be chosen for the continuity of the necessary pre-clinical tests for new drugs for the treatment of cancer.

Key-words: Cancer. Semicarbazones. Apoptosis. Kinases. Antitumoral.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma	21
Figura 2 -	Diferentes estágios da carcinogênese	22
Figura 3 -	Características adquiridas pelo câncer	24
Figura 4 -	Marcos emergentes e novas características ativadas pelo câncer	26
Figura 5 -	Vias intrínseca e extrínseca da apoptose	28
Figura 6 -	Etapas da divisão celular por mitose	33
Figura 7 -	Formação de micronúcleos na divisão celular	34
Figura 8 -	Tipos de eritrócitos encontrados na circulação sanguínea	35
Figura 9 -	Estrutura geral das semicarbazonas e tiossemicarbazonas	37
Figura 10 -	Estrutura da 2-formilpiridina tiossemicarbazona	39
Figura 11 -	Estrutura química da hidroxipuréia	40
Figura 12 -	Estrutura química da 3-aminopiridina-2-carboxaldeído tiossemicarbazona (3-AP) e do pró-fármaco Triapina 3-AP	41
Figura 13 -	Etapas para ensaio de Toxicidade Oral Aguda iniciando pela dose de 300 mg/kg	56
Figura 14 -	Efeito dos compostos 3c e 4a na viabilidade celular de células HL-60 utilizando o <i>kit ViaCount</i> após 72 h de incubação	65
Figura 15 -	Efeito dos compostos 3c e 4a no potencial transmembrânico mitocôndrial ($\Delta\Psi_m$) de células HL-60 após 72 horas de incubação	66
Figura 16 -	Efeito dos compostos 3c e 4a sobre o ciclo celular das células HL-60 após 72 horas de incubação	67
Figura 17 -	Efeito dos compostos 3c e 4a na fragmentação do DNA de células HL-60 após 72 horas de incubação	70
Figura 18 -	Efeito dos compostos 3c e 4a sobre a indução de morte das células HL-60 após 72 horas de incubação	71
Figura 19 -	Análise morfológica das células K562 e NCI-H292 após 48 horas de incubação com o composto TS04	78
Figura 20 -	Análise da variação do potencial transmembrânico mitocôndrial ($\Delta\Psi_m$) de células K562 e NCI-H292 determinado por citometria de fluxo após 48 horas de incubação com o composto TS04	80

Figura 21 -	Efeito do composto TS04 sobre as fases do ciclo celular de células K562 e NCI-H292 determinado por citometria de fluxo após 48 horas de incubação	82
Figura 22 -	Efeito do composto TS04 sobre a fragmentação do DNA das células K562 e NCI-H292 determinado por citometria de fluxo após 48 horas de incubação	84
Figura 23 -	Efeito do composto TS04 sobre a indução de morte em células K562 e NCI-H292 após 48 horas de incubação	86
Figura 24 -	Determinação da massa tumoral dos animais transplantados com o carcinoma de Ehrlich, após 7 dias de tratamento com salina, doxorrubicina e composto TS04	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Estrutura dos derivados aril-semicarbazônicos	43
Tabela 2 -	Estrutura dos derivados aril-tiosemicarbazônicos	45
Tabela 3 -	Percentual de inibição do crescimento celular dos derivados aril-semicarbazônicos na concentração única de 25 µg/mL frente a linhagens tumorais após 72 h de incubação	60
Tabela 4 -	Concentração que inibe 50% do crescimento celular (CI ₅₀) dos derivados aril-semicarbazônicos, após 72 horas de incubação	61
Tabela 5 -	Atividade inibitória dos derivados aril-semicarbazônicos frente a proteínas quinases	63
Tabela 6 -	Percentual de inibição do crescimento celular dos derivados aril-tiosemicarbazônicos na concentração única de 25 µg/mL frente a linhagens tumorais após 72 h de incubação	73
Tabela 7 -	Concentração que inibe 50% do crescimento celular (CI ₅₀) dos derivados aril-tiosemicarbazônicos, após 72 horas de incubação	74
Tabela 8 -	Concentração que inibe 50% do crescimento celular (CI ₅₀) do composto TS04 nas linhagens de células tumorais K562 e NCI-H292, após 48 horas de incubação	75
Tabela 9 -	Índice de seletividade do composto TSC04 para células de câncer	76
Tabela 10 -	Consumo de ração, consumo de água e ganho de massa corpórea dos animais tratados com o composto TS04 (50 mg/kg) em relação ao grupo controle (salina), após 14 dias de administração	88
Tabela 11 -	Índice dos órgãos dos animais tratados com o composto TS04 (50 mg/kg) em relação ao controle (salina), após 14 dias de administração	89
Tabela 12 -	Parâmetros hematológicos obtidos dos animais tratados com o composto TS04 (50 mg/kg) em relação ao controle (salina), após 14 dias de administração	89
Tabela 13 -	Aumento da massa corpórea e índice dos órgãos dos animais tratados com doxorrubicina (1,5 mg/kg, i.p.) e composto TS04 (5, 10, 20 e 30 mg/kg, vo) em relação ao controle (salina), após 7 dias de administração .	92
Tabela 14 -	Parâmetros hematológicos dos animais tratados com doxorrubicina (1,5 mg/kg, i.p.) e composto TS04 (5, 10, 20 e 30 mg/kg, vo) em relação ao	

	controle (salina), após 7 dias de administração	93
Tabela 15 -	Parâmetros bioquímicos dos animais tratados com doxorubicina (1,5 mg/kg, i.p.) e composto TS04 (5, 10, 20 e 30 mg/kg, vo) em relação ao controle (salina), após 7 dias de administração	94
Tabela 16 -	Frequência de Eritrócitos Policromáticos Micronucleados (EPCMN) para um total de 2.000 células analisadas por animal, após 24 horas de tratamento agudo (dose única) do composto TS04 (50 mg/kg, vo), ciclofosfamida (50 mg/kg, i.p.) e salina (controle negativo)	95

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1	Considerações sobre câncer	20
2.1.1	Câncer	20
2.1.2	Epidemiologia do câncer	20
2.1.3	Características do câncer	21
2.1.4	Apoptose e câncer	26
2.1.5	Estratégias de tratamento do câncer	29
2.2	Considerações sobre mutagenicidade	32
2.2.1	Material genético e mutagenicidade	33
2.2.2	Micronúcleos	33
2.2.3	Eritrócitos Policromáticos Micronucleados	34
2.3	Considerações sobre os derivados aril-semicarbazônicos e aril-tiossemicarbazônicos	36
2.3.1	Semicarbazonas e tiossemicarbazonas	36
2.3.2	Perfil farmacológico das semicarbazonas	37
2.3.3	Perfil farmacológico das tiossemicarbazonas	39
3	OBJETIVOS	42
3.1	Objetivo geral	42
3.2	Objetivos específicos	42
4	MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1	Compostos	43
4.2	Experimentos <i>in vitro</i>	46
4.2.1	Células	46
4.2.2	Determinação da atividade citotóxica	47
4.2.2.1	<i>Ensaio de citotoxicidade em células tumorais humanas pelo teste do MTT</i>	<i>47</i>
4.2.2.2	<i>Avaliação da atividade citotóxica em células mononucleadas do sangue periférico humano</i>	<i>48</i>
4.2.3	Determinação do potencial hemolítico em eritrócitos humanos	49
4.2.4	Estudo do padrão de morte celular	50
4.2.4.1	<i>Análise morfológica – Coloração diferencial por Panótico rápido</i>	<i>50</i>

4.2.4.2	<i>Determinação da viabilidade celular utilizando o kit Guava ViaCount</i>	51
4.2.4.3	<i>Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial</i>	52
4.2.4.4	<i>Avaliação do ciclo celular e fragmentação de DNA por citometria de fluxo ..</i>	53
4.2.4.5	<i>Detecção da externalização da fosfatidilserina – Teste da Anexina-V</i>	54
4.3	Experimentos <i>in vivo</i>	55
4.3.1	Ensaio de Toxicidade Oral Aguda	55
4.3.2	Avaliação da atividade antitumoral	57
4.3.3	Teste do micronúcleo em sangue periférico de camundongos	58
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1	Resultados referentes aos derivados aril-semicarbazônicos	60
5.1.1	Avaliação da atividade citotóxica dos derivados aril-semicarbazônicos em células tumorais humanas	60
5.1.2	Inibição de proteínas quinases	63
5.1.3	Detecção da viabilidade celular utilizando o <i>kit Guava ViaCount</i>	64
5.1.4	Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial	65
5.1.5	Ensaio do ciclo celular	67
5.1.6	Ensaio de fragmentação do DNA	69
5.1.7	Estudo da indução de morte celular pelo teste da anexina V	70
5.2	Resultados referentes aos derivados aril-tiossemicarbazônicos	73
5.2.1	Resultados <i>in vitro</i>	73
5.2.1.1	<i>Avaliação da atividade citotóxica dos derivados aril-tiossemicarbazônicos em células tumorais humanas</i>	73
5.2.1.2	<i>Avaliação da citotoxicidade em células mononucleadas do sangue periférico humano</i>	76
5.2.1.3	<i>Determinação da atividade hemolítica em eritrócitos humanos</i>	77
5.2.1.4	<i>Avaliação morfológica</i>	77
5.2.1.5	<i>Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial</i>	79
5.2.1.6	<i>Avaliação do ciclo celular por citometria</i>	81
5.2.1.7	<i>Estudo da fragmentação do DNA por citometria de fluxo</i>	83
5.2.1.8	<i>Avaliação do padrão de morte celular por externalização da fosfatidilserina – Teste da Anexina-.....</i>	85
5.2.2	Resultados <i>in vivo</i>	87
5.2.2.1	<i>Teste de Toxicidade Oral Aguda</i>	87

5.2.2.2	<i>Avaliação da atividade antitumoral</i>	90
5.2.2.3	Teste do Micronúcleo	95
6	CONCLUSÃO	97
	REFERÊNCIAS	98
	ANEXO A - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)	118
	ANEXO B - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DE USO DE ANIMAL (CEUA)	120

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo e apesar dos importantes progressos no diagnóstico e tratamento dessa doença, o número de novos casos e mortes relacionadas ao câncer continuam aumentando. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 15 milhões de pessoas vão morrer no mundo por causa do câncer até 2030 (STEWART; WILD, 2014).

Nenhuma faixa etária está imune ao câncer, porém existem fatores que contribuem para o aparecimento da doença. Esses fatores podem ser inerentes ao organismo, como idade, gênero e herança genética e/ou externos ao organismo como tabagismo, hábitos alimentares inadequados, sedentarismo, obesidade, exposição a agentes mutagênicos, entre outros (JONES et al., 2016).

No processo de formação do câncer, as células sofrem várias alterações genéticas e moleculares que resultam na capacidade de se replicar desordenadamente e infiltrar no tecido adjacente. Com a progressão da doença outras características que asseguram o crescimento maligno são acrescentadas, tais como: autossuficiência na regulação dos sinais de crescimento celular, insensibilidade aos sinais que inibem este crescimento, evasão apoptose, potencial replicativo ilimitado, indução da angiogênese, invasão tecidual e metástase, evasão do sistema imune, estresse metabólico, proteotóxico, mitótico e oxidativo, e dano no DNA (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Atualmente as abordagens terapêuticas mais usadas para tratar o câncer são: a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia. A quimioterapia consiste na utilização de substâncias químicas antineoplásicas, isoladas ou em combinação e a forma empregada vai depender do tipo e localização do tumor, estágio da doença e condições referentes ao paciente a ser tratado (ARJMANDI et al., 2016).

A maioria dos agentes quimioterápicos agem inibindo a replicação celular sem especificidade para as células tumorais atingindo também as células saudáveis, principalmente os tecidos de rápida renovação. Diante disso, é comum os quimioterápicos tradicionais provocar anorexia, náuseas, vômitos, estomatite, diarreia e necrose da mucosa do cólon (TARRICONE et al., 2016).

Neste contexto, verifica-se a necessidade da pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos antineoplásicos que garantam eficácia com menos efeitos colaterais. À vista disso, as semicarbazonas e tiosemicarbazonas são importantes classes de compostos que

possuem farmacóforos importantes para a pesquisa de novos fármacos. Na literatura são descritas como moléculas que apresentam diversas atividades biológicas, entre as quais a atividade anticâncer se destaca, dessa forma, essas moléculas são candidatos a modificações moleculares através da introdução de novos substituintes com o intuito de produzir derivados bioativos.

Diante do contexto abordado surgiu a hipótese desse trabalho, no qual foi avaliada a atividade anticâncer de novos derivados aril-semicarbazônicos e aril-tiossemicarbazônicos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Considerações sobre câncer

2.1.1 Câncer

O câncer é uma patologia que há muito tempo acompanha a humanidade. Os documentos escritos mais antigos que fazem referência ao câncer são o papiro de Edwin Smith e o papiro de Ebers. Ambos os papiros são datados entre 1600 e 1550 a.C., mas acredita-se que contêm descrições provenientes 2.500 e 3.000 a.C. (KRUKIEWICZ; ZAK, 2016; VIDYASAGAR, 2011).

O médico grego Hipócrates (370-460 a.C.) criou a palavra câncer, e usou os termos carcinos e carcinoma, palavra grega que significa caranguejo, para descrever certos tipos de tumores, pois as projeções e vasos sanguíneos ao redor do tumor fazem lembrar as patas do crustáceo (FEINBERG et al., 2006).

O câncer forma um grande grupo de mais de 100 enfermidades distintas com vários fatores de risco e o seu desenvolvimento é um processo que ocorre em várias etapas, incluindo a disfunção de genes que regulam a proliferação, a divisão e a morte de células, como também o microambiente tecidual (POONIA et al., 2016; WONG et al., 2014; ZHU et al., 2016).

O câncer resulta de mutações no DNA cromossômico de uma célula normal, o que pode ser desencadeado tanto por fatores externos, quanto por fatores internos. Entre os fatores externos está o uso do tabaco, álcool, produtos químicos, agentes infecciosos, radiação, hábitos alimentares inadequados, inatividade física e obesidade. Enquanto que no grupo dos fatores internos está a idade, gênero, hormônios, condição imune e mutações hereditárias (ZONG et al., 2012).

2.1.2 Epidemiologia do câncer

A cada ano, dezenas de milhões de pessoas são diagnosticadas com câncer em todo o mundo, e mais da metade dos doentes morrem por causa desta doença (CANTREAT, 2010).

Em muitos países, o câncer ocupa a segunda causa mais comum de morte, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares. Com a melhoria significativa no tratamento e prevenção das doenças cardiovasculares, o câncer em breve se tornará o responsável pelo maior número de mortes em muitas partes do mundo. As pessoas idosas são mais suscetíveis ao câncer e em muitos países a população continua envelhecendo, dessa forma, o câncer

continuará sendo um grande problema de saúde da humanidade (FITZMAURICE et al., 2015; POPAT et al., 2013).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 15 milhões de pessoas vão morrer no mundo por causa do câncer até 2030 (STEWART; WILD, 2014). No Brasil, a estimativa para o biênio 2018-2019, aponta a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer. Com exceção do câncer de pele não melanoma (aproximadamente 170 mil casos novos). O perfil epidemiológico mostra que entre os homens o mais frequente é o câncer de próstata, seguido pelo de pulmão, intestino, estômago e cavidade oral. Já nas mulheres, o câncer de mama ocupa a primeira posição e na sequência vem o de intestino, colo do útero, pulmão e tireoide (INCA, 2018) (Figura 1).

Figura 1: Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma*.

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%			Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA, 2018.

2.1.3 Características do câncer

Carcinogênese é o nome dado ao processo de formação e progressão do câncer. É iniciada quando uma única célula ou um grupo pequeno de células normais sofrem alterações a nível celular, genético e epigenético e dessa forma, a célula é reprogramada a se dividir descontroladamente formando uma massa maligna (KLAUNIG, 2010).

É um processo complexo de múltiplos passos e pode ser conceitualmente dividida em quatro etapas: iniciação, promoção, transformação e progressão tumoral (KAUR et al., 2014).

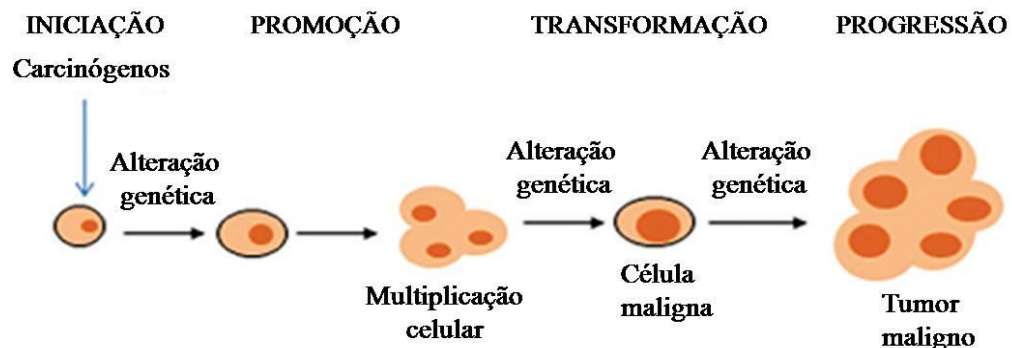
A iniciação é o primeiro estágio, possui início rápido e ocorre a partir de danos irreversíveis no DNA. Nessa fase os carcinógenos modificam a estrutura do DNA, resultando na alteração de genes fundamentais para regulação e controle do crescimento celular. A célula ainda não é neoplásica, mas transmite a mutação para as células filhas (BARCELLOS-HOFF et al., 2013; SHARMA et al., 2010).

A promoção é um processo reversível e de desenvolvimento lento (período de latência 5 - 30 anos), a célula iniciada é gradativamente transformada em célula maligna e para isso é necessário um longo e continuado contato com o agente cancerígeno. A suspensão do contato com agente cancerígeno muitas vezes interrompe o processo nesse estágio, porém a continuidade do processo resulta na proliferação e acumulação de células pré-neoplásicas (RIVERA, 2012).

Na transformação maligna ocorrem outras mutações, nesse estágio ocorre à conversão de uma célula pré-neoplásica em uma célula com fenótipo maligno, na qual possui crescimento descontrolado e instabilidade genética (KAUR et al., 2014).

A progressão é o último estágio da carcinogênese. É um processo irreversível caracterizado pela multiplicação descontrolada das células cancerígenas, resultando no aumento da massa tumoral primária com elevado potencial metastático e invasivo (SHARMA et al., 2010) (Figura 2).

Figura 2: Diferentes estágios da carcinogênese.



Fonte: Adaptado de Kaur et al., 2014.

A principal característica das células cancerígenas é o crescimento descontrolado, resultado da ativação de oncogenes (a partir de proto-oncogenes alterados) e inativação de genes supressores tumorais (JU et al., 2016).

Os proto-oncogenes são um grupo de genes que transformam células normais em cancerígenas quando sofrem mutação. Eles podem ser alterados por diferentes mecanismos genéticos tais como: translocações cromossômicas, amplificações, mutações pontuais, anomalias cromossômicas, entre outros e, portanto, serem convertidos em oncogenes. Os

proto-oncogenes codificam proteínas que estimulam a divisão celular e inibem a diferenciação celular e a apoptose. (CROCE, 2008; SUDHAKAR, 2009).

Os oncogenes são genes anormais que aumentam a predisposição ao câncer. Ao contrário dos genes normais, que podem ser desligados após terem sido ligados, os oncogenes são alterados de forma que os mantêm presos em um estado de constante atividade. Essa ação ininterrupta ajuda a impulsionar o crescimento descontrolado que está subjacente nos tumores. Os oncogenes podem ser ativados por mudanças hereditárias ou por agentes promotores de câncer que danificam o DNA ao longo da vida de um indivíduo, como a luz UV, produtos químicos perigosos e até mesmo vírus (SUDHAKAR, 2009).

Com base em seus efeitos, os produtos de oncogenes são classificados da seguinte forma:

- Fatores de crescimento - PDGF (Fator de crescimento derivado de plaquetas), CSF-1 (Fator estimulador de colônias-1), EGF (Fator de crescimento epidérmico), TGF- α e β (Fatores de crescimento transformadores), etc.;
- Receptores do fator de crescimento - EGFR (Receptor do fator de crescimento epidérmico), PDGFR (Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas), VEGFR (Receptor do fator de crescimento endotelial vascular), etc.;
- Proteínas de ligação ao GTP (transmissão de sinal intracelular) - Família RAS;
- Fatores de transcrição nuclear - Família MYC, FOS, MYB e outros (CROCE, 2008; QIU; SIMON, 2015).

Os supressores tumorais são genes que desempenham papéis importantes no controle da proliferação celular, e estão envolvidos na regulação do ciclo celular através de pontos de verificação presentes no ciclo e indução da apoptose em células anormais. Quando os genes supressores de tumor estão funcionando corretamente eles impedem que as células com defeito genético ultrapassem os pontos de controle do ciclo, ou seja, provocam a parada do ciclo até que o defeito seja reparado, se não houver a reparação ocorre à indução da apoptose (KOHRMAN et al., 2017; TUTONE et al., 2017).

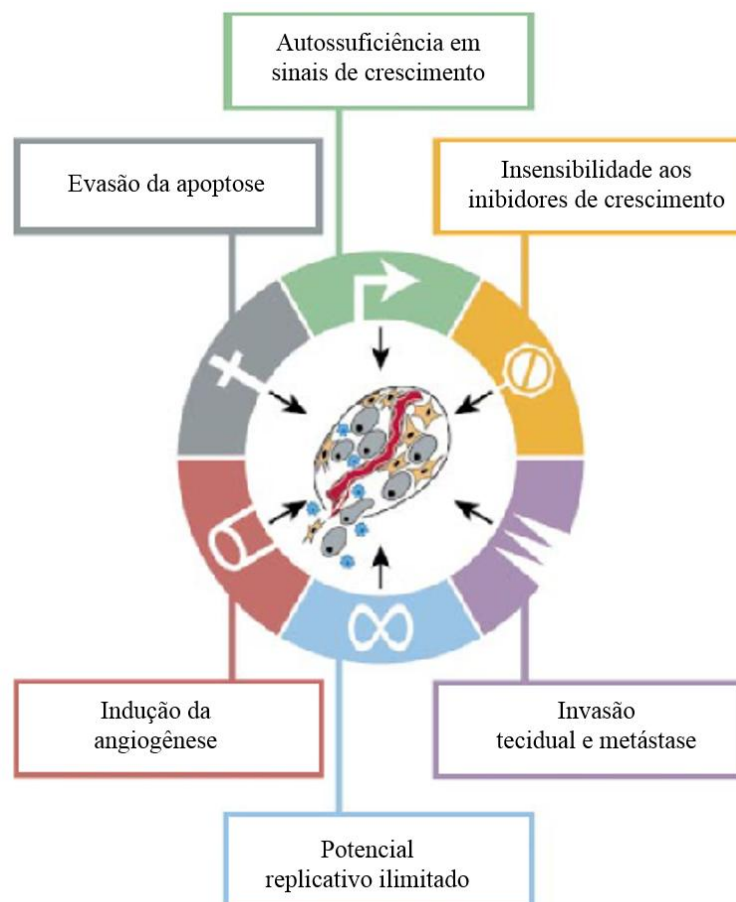
Defeitos nos genes supressores de tumor são alguns dos mais importantes fatores que contribuem para a formação do câncer, porque permite a divisão celular desregulada, respostas inadequadas a danos no DNA, perda da resposta apoptótica, perda da inibição de contato e promoção da metástase (ZHAO et al., 2013).

O gene p53, principal gene supressor tumoral, é encontrado inativo ou mutado em cerca da metade de todos os cânceres. Este gene codifica a proteína p53 que tem como função regular negativamente a proliferação celular, por isso, ele é denominado “guardião do

genoma”, pois quando está ativo interrompe o ciclo celular no ponto de checagem 1 para que a célula seja reparada. Se o reparo não for eficaz, o p53 promove a indução da apoptose na célula alterada (KABEL, 2015; RIVLIN et al., 2011).

Várias linhas de estudo evidenciaram que o início de formação do câncer é um processo que ocorre em várias etapas, e que estes passos refletem alterações genéticas que conduzem a transformação progressiva de células normais em derivados altamente malignos. A vasta lista dos genótipos das células de câncer resulta na manifestação de seis alterações essenciais na fisiologia celular que, coletivamente, ditam o crescimento maligno, são elas: autossuficiência na sinalização de fatores de crescimento, insensibilidade aos inibidores de crescimento, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese, invasão tecidual e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2000) (Figura 3).

Figura 3: Características adquiridas pelo câncer.

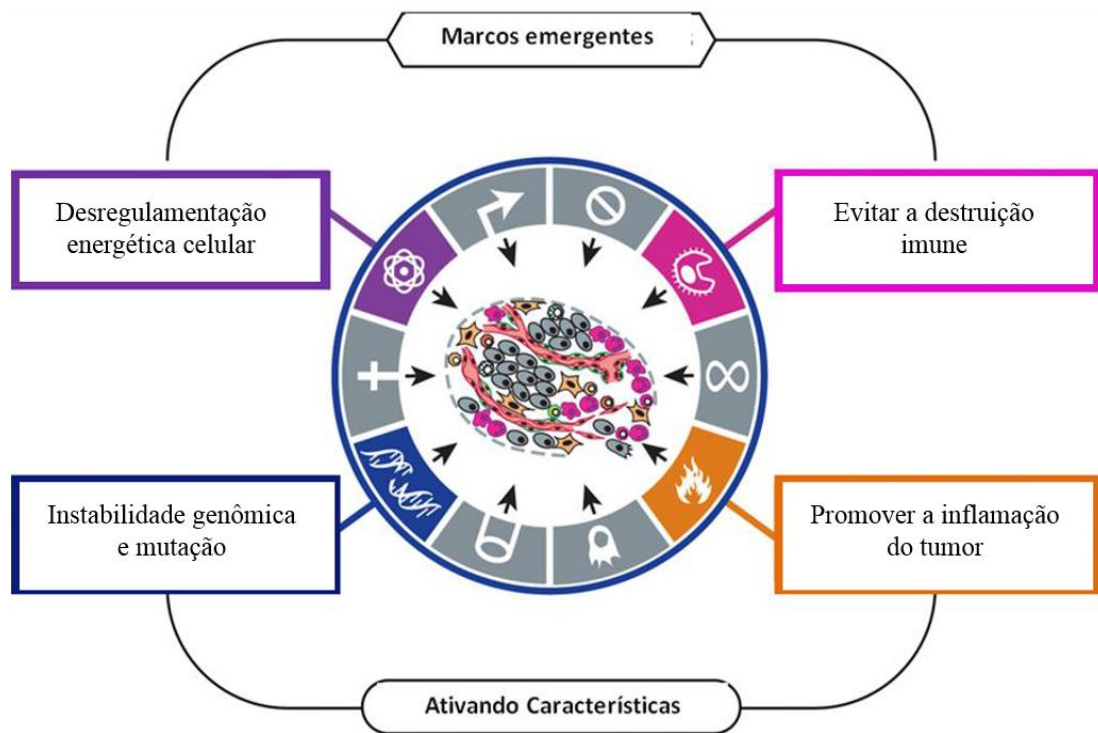


Fonte: Adaptado de Hanahan; Weinberg, 2000.

Estes atributos são definidos como capacidades adquiridas que permitem a sobrevivência, proliferação e disseminação das células cancerosas. São capacidades contraídas em diferentes tipos de tumor, através de mecanismos distintos e em múltiplos passos durante o curso da carcinogênese (SCHUG et al., 2016).

Essas aquisições são possíveis graças à ativação de duas características, onde a mais proeminente é o desenvolvimento da instabilidade genômica em células cancerosas, o que gera mutações aleatórias, incluindo rearranjos cromossômicos que podem provocar mudanças genéticas responsáveis pelas capacidades adquiridas (HEIDEN; DEBERARDINIS, 2017). A segunda característica está relacionada com o estado inflamatório das lesões pré-malignas e malignas que fracamente aciona as células do sistema imunitário (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011). No entanto, outros atributos diferentes têm sido propostos para as células cancerosas, pois são importantes para o desenvolvimento do câncer e, portanto, foram adicionados à lista de características centrais. O primeiro atributo está relacionado com a modificação ou reprogramação do metabolismo da célula, a fim de dar suporte ao crescimento e proliferação celular de forma contínua e acelerada (PAVLOVA; THOMPSON, 2016). O segundo envolve a evasão das células de câncer ao ataque e eliminação por células do sistema imunológico, em especial por linfócitos T e B, macrófagos e células exterminadoras naturais (NK) (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011). Ambas as capacidades facilitam o desenvolvimento e a progressão de muitas formas de câncer, no entanto, ainda não foram totalmente validadas e são consideradas marcos emergentes do câncer (GANAPATHY-KANNIAPPAN, 2017) (Figura 4).

Figura 4: Marcos emergentes e novas características ativadas pelo câncer.



Fonte: Adaptado de Hanahan; Weinberg, 2011.

2.1.4 Apoptose e câncer

As células de um organismo multicelular são membros de uma comunidade altamente organizada e para manter a homeostase tecidual deve haver o equilíbrio entre a proliferação e a morte celular. A quebra desse equilíbrio conduz a condições patológicas tais como o câncer ou doenças degenerativas em que a proliferação e a morte das células estão aumentadas, respectivamente (OYINLOYE et al., 2015).

Nessa lógica, a apoptose faz parte dos mecanismos homeostáticos para manter o equilíbrio das populações de células nos tecidos e ocorre como mecanismo de defesa em reações imunes ou quando as células são danificadas por agentes nocivos ou causadores de doenças. Embora haja uma grande variedade de estímulos e condições tanto fisiológicas como patológicas que podem desencadear apoptose, nem todas as células necessariamente morrem em resposta ao mesmo estímulo (PORTT et al., 2011).

Diferentemente da necrose que após uma lesão a célula incha e rompe a membrana afetando um grande número de células devido a formação do processo inflamatório local, a

apoptose pode ser reconhecida por características morfológicas marcantes e coordenadas. A célula morre ordenadamente, sem danificar os seus vizinhos após ser ativada por moléculas sinalizadoras de morte celular (SIDDIQUI et al., 2015).

Primeiramente, ocorre a condensação da cromatina que se concentra junto à membrana nuclear que se mantém intacta. As organelas celulares mantêm a sua morfologia, com exceção em alguns casos, das mitocôndrias, que podem apresentar ruptura da membrana externa. A membrana celular forma prolongamentos, o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear e a seguir os prolongamentos da membrana se rompem originando estruturas contendo conteúdo celular, denominados corpos apoptóticos (FUCHS; STELLER, 2015). Neste processo, a membrana plasmática celular permanece íntegra, mas sofre alterações estruturais, como a distribuição de fosfatidilserina na camada externa da membrana, que é um sinalizador para o reconhecimento pelos fagócitos (KOFF et al., 2015). Deste modo, a célula morta é rapidamente fagocitada por macrófagos e removida sem que haja extravasamento do conteúdo citoplasmático. Isto não só evita as consequências prejudiciais da necrose celular por causa da resposta inflamatória intensa, mas também permite que os componentes orgânicos da célula morta possam ser reciclados pela célula que a ingere (TOWER, 2015).

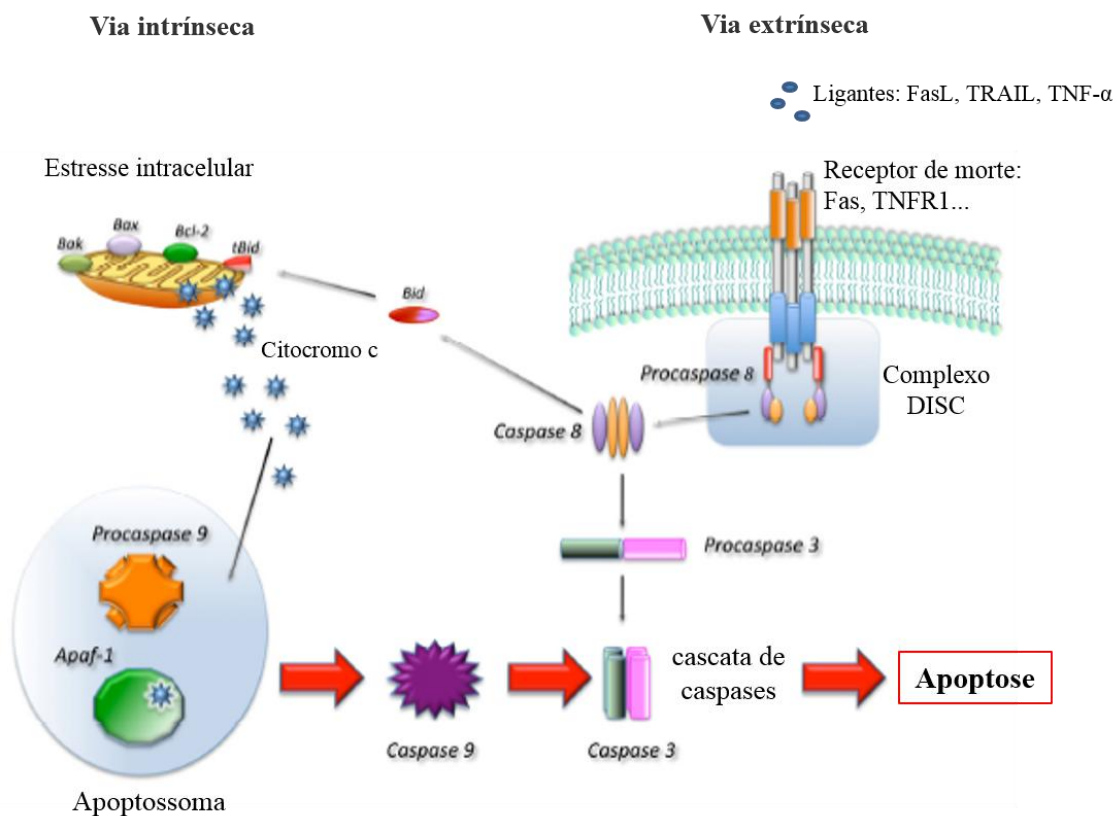
O processo apoptótico pode ser disparado por duas vias: via intrínseca ou via mitocondrial e via extrínseca ou via receptor de morte (MA et al., 2016).

A via intrínseca é ativada por estresse intracelular, como por exemplo: privação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia, ativação de oncogenes, dentre outros. Esses estímulos produzem sinais que induzem a translocação de membros pró-apoptóticos da família Bcl-2, tais como Bax, para as mitocôndrias. Essas proteínas provocam alterações principalmente na membrana mitocondrial interna, resultando na perda da integridade das mitocôndrias e consequentemente liberação do citocromo c para o citoplasma. No citoplasma, o citocromo c forma complexo com o fator de ativação associado à apoptose-1 (APAF-1) e pró-caspase 9, o chamado apoptossoma, que promove a clivagem da pró-caspase 9, liberando a caspase 9 ativa, que é capaz de ativar a caspase 3 que por sua vez, induz a morte celular por apoptose (METZ et al., 2016; WANG et al., 2016) (Figura 5).

Na via extrínseca, os sinais de morte são recebidos de fora da célula através de moléculas sinalizadoras de morte, entre as quais se destacam FasL (ligante de Fas), TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF) e TNF- α (fator de necrose tumoral alfa). Essas moléculas se ligam e ativam receptores da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF) presentes na membrana plasmática, resultando no recrutamento de

várias proteínas para formar o complexo de sinalização indutor de morte (DISC). Esse complexo promove a ativação da caspase 8, que por sua vez ativa a caspase 3. A caspase 3, em seguida, induz as alterações celulares que caracterizam a apoptose (FULDA, 2015; PARK et al., 2015) (Figura 5).

Figura 5: Vias intrínseca e extrínseca da apoptose.



Fonte: Adaptado de Favaloro et al., 2012.

A apoptose é um processo amplamente estudado, devido a sua importância tanto em condições fisiológicas, quanto patológicas. Ocorre por meio de eventos dirigidos por genes e tem profundas implicações no desenvolvimento e homeostase dos tecidos, pois o número de células é regulado por fatores que influenciam na sobrevivência celular e também por aqueles que controlam a proliferação e diferenciação das células. Em condições normais, a apoptose é o destino para células que sofreram alteração genética, porém esse processo pode ser interrompido por mutações nos genes envolvidos no processo, dessa maneira, defeitos nas vias apoptóticas contribuem para a carcinogênese (FANA et al., 2015; LI et al., 2015).

Ao contrário das células normais, as células cancerígenas estão sob estresse constante, incluindo o estresse oncogênico, instabilidade genômica e hipóxia celular. Em resposta a esses estímulos apoptóticos, a via intrínseca da apoptose seria normalmente ativada. No entanto, as células cancerígenas podem muitas vezes evitar a resposta celular, desativando as vias apoptóticas (LEE et al., 2016).

Em alguns casos, as células cancerígenas podem escapar da apoptose através do aumento da expressão de genes anti-apoptóticos ou diminuição da expressão dos genes pró-apoptóticos. Alternativamente, elas podem inibir a apoptose através da estabilização ou desestabilização de proteínas anti-apoptóticas ou pró-apoptóticas, respectivamente. Além disso, as células cancerígenas também podem evadir-se da apoptose, alterando as funções das proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas ou através de modificações pós-traducionais, tais como a fosforilação. Estes mecanismos não são mutuamente exclusivos e as células podem empregar um ou vários desses mecanismos para escapar da apoptose (FLUSBERG; PETER, 2015).

A evasão da apoptose é uma característica chave no processo de desenvolvimento e progressão do câncer, como também na resistência ao tratamento, uma vez que a maioria das terapias anticâncer, incluindo a quimioterapia, a radioterapia ou a imunoterapia, atuam principalmente através da via intrínseca desse programa de morte celular. À vista disso, moléculas que induzem a apoptose em células de câncer serão sempre preferências na descoberta de fármacos para tratar essa enfermidade (FULDA, 2015; KHAN et al., 2016).

2.1.5 Estratégias de tratamento do câncer

O tratamento do câncer tem como principais objetivos a cura, o prolongamento da vida e melhoria da qualidade de vida dos pacientes. A escolha da modalidade de tratamento que pode ser única ou combinada depende do tipo e estágio do câncer, possíveis efeitos colaterais e da preferência e saúde geral do paciente (DESANTIS et al., 2014; ZABERNIGG et al., 2012).

As principais estratégias de tratamento clinicamente estabelecidas são: a cirurgia, a radioterapia, a terapia hormonal, a terapia alvo e a quimioterapia (ARJMANDI et al., 2016; SUDHAKAR, 2009).

A cirurgia é a modalidade terapêutica mais antiga e continua sendo um tratamento eficaz para muitos tipos de tumor, principalmente para tumores localizados e em condições

anatômicas mais favoráveis. Os objetivos da cirurgia podem variar, podendo ser utilizada para remover o tumor inteiro quando esse está localizado em local favorável ou para remover parte do tumor quando a remoção total pode danificar um órgão, nesse caso, a remoção de parte do tumor melhora a eficácia de outros tratamentos (XU et al., 2016; WALLER et al., 2015).

A radioterapia é um tratamento que utiliza radiação de alta energia para reduzir o tamanho do tumor e destruir as células cancerígenas. A radiação mata as células porque danifica a estrutura genética de várias maneiras diferentes, atinge tanto as células neoplásicas com também as células normais que se encontram na região adjacente ao tumor. Pode ser utilizada sozinha ou em combinação com a quimioterapia e faz parte de quase metade de todos os tratamentos. A radioterapia pode ser empregada antes da cirurgia para diminuir o tamanho do tumor, de modo que facilite a remoção ou após a cirurgia para destruir vestígios de tumor que pode ter sido deixado (ARJMANDI et al., 2016; ZIJIAN; CHENXUE, 2016).

A terapia hormonal é um modo de tratamento que tem como função inibir a atividade de hormônios que tenham influência no crescimento de um tumor. Atua somente sobre as células que expressam receptores hormonais e, desta forma, seus efeitos colaterais são menos intensos e associados a ação do hormônio. A ação hormonal depende de ligações entre o hormônio e o seu receptor citoplasmático específico (ABRAHAM; STAFFURTH, 2016). Esta ligação provoca a síntese de RNA mensageiro que, por sua vez, direciona a síntese de novas proteínas importantes para o crescimento e a multiplicação celular. Os tumores derivados de tecidos sensíveis a hormônio podem ser hormônio dependente. Assim, seu crescimento pode ser inibido por hormônios com ações opostas, por antagonistas de hormônios ou por agentes que inibem a síntese dos hormônios relevantes. O tecido mamário, o endométrio e a próstata são exemplos de órgãos que dependem dos hormônios sexuais para crescer e funcionar (LHEUREUX; OZA, 2016).

A terapia alvo é uma forma de tratamento onde são empregados anticorpos e outras moléculas capazes de inibir a transmissão de sinais enviados para o núcleo com a finalidade de ativar os genes que controlam a multiplicação celular. Os medicamentos que fazem parte desse grupo possuem especificidade, pois interferem nos mecanismos celulares responsáveis pela divisão e disseminação das células neoplásicas. A terapia alvo está frequentemente dirigida aos ligantes (fatores de crescimento), aos seus receptores ou ainda às moléculas envolvidas nas suas vias de sinalização intracelular (CRAFTON; SALANI, 2016).

Os fatores de crescimento (FC) desempenham um papel importante no controle da maioria dos processos celulares fundamentais, incluindo proliferação, diferenciação, metabolismo e sobrevivência celular, bem como migração celular e controle do ciclo celular.

Os receptores dos FC podem sofrer desregulação em uma variedade de processos patológicos, incluindo câncer, diabetes, inflamação, doenças ósseas graves, arteriosclerose e angiogênese. No câncer, alterações nesses FC e/ou em seus receptores ou ainda nas vias de transdução de sinais, por eles desencadeadas, podem estar presentes em várias características associadas ao fenótipo maligno, entre as quais se podem citar: autossuficiência na produção de FC, insensibilidade aos supressores de crescimento, resistência à morte celular, escape à destruição imune, indução da angiogênese, ativação da invasão e metastatização, potencial replicativo ilimitado, instabilidade genômica e mutação, inflamação promovida pelo tumor e desregulação energética celular (JOSHI et al., 2015). Essas vias encontram-se deturpadas nas células cancerosas o que torna esse tipo de célula “imortalizada” e independente dos estímulos normais regulatórios. Desse modo, muitos dos medicamentos da terapia-alvo atuam sobre as proteínas envolvidas nas complexas vias de sinalização intracelular (CHARLTON; SPICER, 2016; ZHU et al., 2016).

A quimioterapia consiste no emprego de substâncias químicas com o objetivo de tratar o câncer. Surgiu na década de 40 durante a Segunda Guerra Mundial quando após a explosão de um depósito de gás de mostarda em Bari, na Itália, um grupo de soldados expostos ao gás morreu de mielodepressão intensa e hipoplasia da medula óssea. O fato chamou a atenção de pesquisadores a serviço do pentágono que em busca de resultados terapêuticos, administrou a droga em pacientes portadores de leucemia crônica e linfoma de Hodgkin, o que levou a uma surpreendente regressão das células tumorais, porém de curta duração. Desde então, inúmeras pesquisas foram desenvolvidas na busca de novos compostos com diferentes alvos e menor toxicidade (HESS; KHASAWNEH, 2015).

A quimioterapia do câncer é formada por algumas classes de medicamentos que possuem diversos mecanismos de ação e interferem em diferentes fases do crescimento celular. A maioria dos agentes não possui especificidade para as células tumorais, pois atuam de forma direta a nível celular interferindo no processo de crescimento e divisão das células, por essa razão, muitos deles causam anorexia, náuseas, vômitos, estomatite, diarreia e necrose da mucosa do cólon (NUSSBAUMERA et al., 2011; WU et al., 2016). É comum o uso concomitante de dois ou mais quimioterápicos em esquemas padronizados na intenção de minimizar a resistência, mas somente são combinados medicamentos que possuem mecanismos de ação diferentes e que levam ao bloqueio de vias cruciais para a sobrevivência das células cancerígenas (EMAMI; DADASHPOUR, 2015). Por terem ação em alvos moleculares diferentes, a terapia combinada também aumenta a eficácia do tratamento, melhora os resultados e prolonga a sobrevida dos pacientes. Outra vantagem é a redução da

toxidez, em razão da combinação exibir diversos perfis de toxicidade, porém mais brandos devido à diminuição das doses, o que melhora a qualidade de vida dos pacientes (PROHL et al., 2016). Muitos agentes anticâncer estão em fase de teste, ainda assim existe uma busca constante por novos compostos ativos, pois, diante da problemática do câncer é extremamente necessário encontrar tratamentos com diferentes alvos, boa eficácia, baixa toxicidade e facilidade na via de administração (BALDO; PAGANI, 2014).

2.2 Considerações sobre mutagenicidade

2.2.1 Material genético e mutagenicidade

Mutagenicidade se refere à capacidade que um agente, substância ou fenômeno tem de alterar o material genético de um organismo e, assim, induzir ou aumentar a frequência de mutações (LIU et al., 2016).

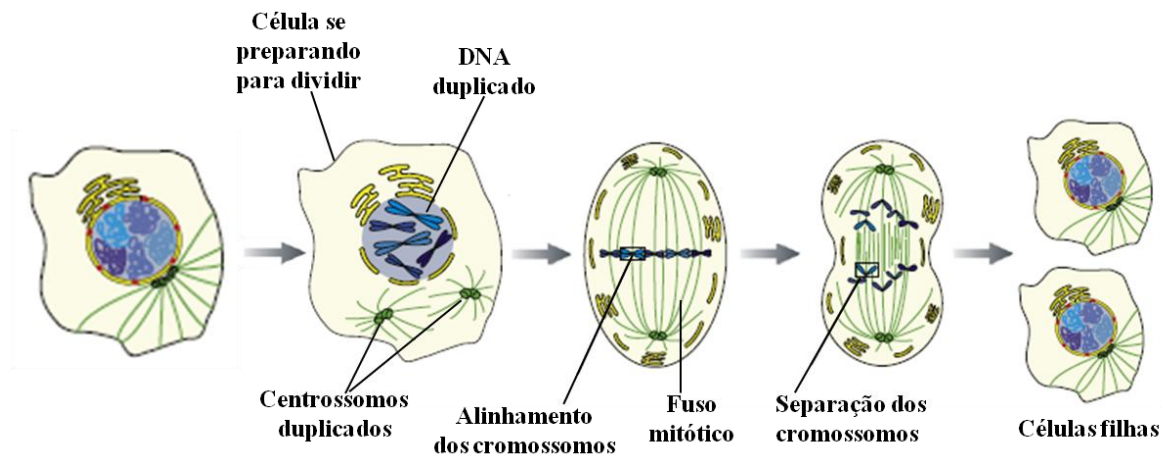
O material genético é formado pela molécula de DNA (Ácido desoxirribonucleico) e nele contém o conjunto completo de todas as informações para manter e construir os organismos. Nos seres eucarióticos o DNA está contido em um compartimento delimitado por um envelope nuclear formado por duas membranas que possuem poros e permitem a comunicação entre o núcleo e citoplasma da célula. A molécula de DNA consiste em duas cadeias de polinucleótdeos longas, compostas por quatro tipos de subunidades nucleotídicas. A sequência dos nucleotídeos ao longo da cadeia codifica as mensagens biológicas, assim, os organismos diferem um do outro porque suas respectivas moléculas de DNA possuem diferentes sequências de nucleotídeos e consequentemente diferentes mensagens biológicas. Nas células, a longa fita de DNA está completamente enovelada e compactada por proteínas histonas em estruturas chamadas de cromossomos. Os cromossomos são constituídos por dois filamentos denominados cromátides, unidas pelo centrômero (JEVTIC et al., 2018).

Na divisão celular, a célula deve copiar fielmente o seu DNA e passa-lo para células filhas. Além de replicar o DNA, as células também duplicam o centrôssomo, organela fundamental na divisão, pois são responsáveis pela formação do fuso mitótico. O fuso mitótico é constituído por feixes de microtúbulos que se alinham longitudinalmente e conduzem a separação e distribuição dos cromossomos igualmente entre as duas células filhas durante a divisão celular (NORRIS; OH et al., 2017).

A segregação precisa dos cromossomos para os polos da célula em divisão é conseguida através da fixação correta dos microtúbulos aos cinetócoros que são estruturas

proteínas presentes na região do centrômero dos cromossomos (NORRIS; OHI, 2017) (Figura 6).

Figura 6: Etapas da divisão celular por mitose.



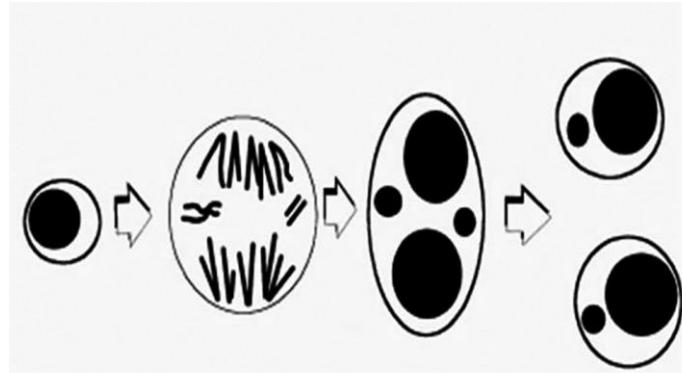
Fonte: Adaptado de Schellhaus et al., 2016.

A divisão celular é um processo rigorosamente controlado, mais, ainda assim, erros podem ocorrer levando ao mau acoplamento dos cromossomos ao fuso, causando os chamados cromossomos retardados durante a anáfase. Esses erros podem levar a morte celular, a instabilidade genética e ainda resultar em micronúcleos (NORRIS; OHI, 2017).

2.2.2 Micronúcleos

Os micronúcleos são pequenos corpos semelhantes a núcleos que se formam quando fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros se separam do grupo principal de cromossomos e não são incorporados ao núcleo da célula filha na conclusão da mitose (BALMUS et al., 2014) (Figura 7).

Figura 7: Formação de micronúcleos na divisão celular.



Fonte: Adaptado de Sabharwal et al., 2015.

Os micronúcleos resultam de mutações gênicas ou cromossômicas induzidas por agentes genotóxicos. Os agentes genotóxicos podem ser clastogênicos ou aneugênicos. Os agentes clastogênicos (ex.: radiação) induzem a quebra da cadeia dupla de DNA, convertem quebras da cadeia simples em quebras na cadeia dupla após a replicação celular e ainda podem inibir a síntese de DNA. Agindo assim, esses agentes induzem a formação de micronúcleos a partir de fragmentos cromossômicos. Os agentes aneugênicos (ex.: vincristina) induzem defeitos na maquinaria de segregação dos cromossomos, dessa forma, interferem nos genes que controlam o ciclo celular, provocam falha no fuso mitótico, cinetócoro ou outras estruturas da aparelhagem mitótica, e assim, induzem a formação de micronúcleos a partir de cromossomos inteiros (HINTZSCHE et al., 2017; SABHARWAL et al., 2015).

Os agentes genotóxicos podem entrar no organismo através da via oral, do trato gastrointestinal, do sistema respiratório e da pele. Ao serem absorvidos, esses agentes ou seus metabólitos chegam aos fluidos corporais e a órgãos como medula óssea, baço e timo podendo causar os efeitos tóxicos.

2.2.3 Eritrócitos Policromáticos Micronucleados

A medula óssea é o local onde as células estaminais hematopoiéticas estão localizadas e ocorre a eritropoiese que é o processo de produção dos eritrócitos, também chamados de hemácias ou células vermelhas do sangue. A eritropoiese ocorre pela diferenciação da célula tronco em célula da linhagem eritrocitária, o proeritroblasto, que pela ação de fatores bioquímicos específicos se diferencia nas seguintes células: eritroblasto basófilo, eritroblasto

policromático, eritroblasto ortocromático e reticulócito, que é liberado para a circulação sanguínea periférica (DZIERZAK et al., 2013).

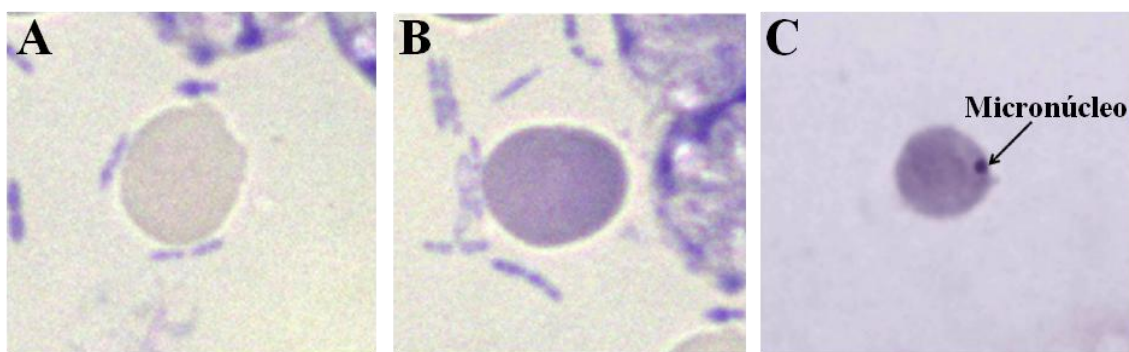
Os reticulócitos são células anucleadas, com tamanho cerca de 20% maior que os eritrócitos maduros e possuem algumas organelas como retículo endoplasmático, ribossomos e mitocôndrias. São precursores dos eritrócitos e adquirem tais características após passarem por um período de maturação que leva cerca de quatro dias. Os primeiros três dias ocorrem na medula óssea e no quarto dia de maturação são liberados para a circulação sanguínea. No processo de maturação, os reticulócitos perdem todas as organelas, têm o volume ligeiramente reduzido e adquirem o formato bicôncavo característicos dos eritrócitos.

Quando os reticulócitos chegam à circulação sanguínea, são considerados eritrócitos jovens imaturos chamados de eritrócitos policromáticos por causa da coloração azul e ficam nessa condição por um período médio de 24 horas.

Após esse período, amadurecem e se tornam eritrócitos normocromáticos com coloração vermelha devido a maior quantidade de hemoglobina (LIPPI et al., 2013).

A presença de agentes genotóxicos nos locais de hematopoese podem causar danos ao genoma das células-tronco e das células precursoras dos eritrócitos formando micronúcleos (FENECH et al., 2016). Como nas primeiras 24 horas os eritrócitos jovens são policromáticos, se forem encontrados micronúcleos nesse tipo de célula, significa que foram formados na mitose anterior devido à presença de uma substância mutagênica (Figura 8).

Figura 8: Tipos de eritrócitos encontrados na circulação sanguínea.



A – Eritrócito normocromático, B – Eritrócito policromático e C – Eritrócito policromático com micronúcleo.
Fonte: Adaptado de Araldi et al., 2015.

O período entre a última divisão e a formação do eritrócito policromático é de 8 a 12 horas, dessa forma, micronúcleos induzidos pelo agente, serão encontrados cerca de 10 horas após o contato. Além disso, o intervalo mínimo no qual os micronúcleos podem ser

detectados corresponde à duração de 10 a 24 horas, período em que se têm a condição de policromático. Sendo assim, a pesquisa de micronúcleos em eritrócitos policromáticos é amplamente utilizada na biomonitorização humana como indicador de exposição a agentes genotóxicos (SUN et al., 2011).

Para avaliar o grau de mutagenicidade de um determinado composto são necessários vários testes e o ensaio de mutagenicidade *in vivo* é aceito como o primeiro de uma bateria de testes pelas agências FDA (Food and Drug Administration) e EMA (European Medicines Agency) (HINTZSCHE et al., 2017).

A necessidade de avaliar a mutagenicidade de uma substância se dar pelo fato de que alterações na fita de DNA ou nos cromossomos podem resultar em danos irreversíveis nos genes e até mesmo provocar câncer. Assim, o ensaio de micronúcleos tem sido usado como um marcador confiável para identificar carcinógenos genotóxicos (ROMERO; CASTRO, 2017).

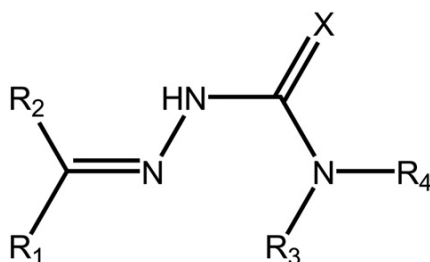
2.3 Considerações sobre os derivados aril-semicarbazônicos e aril-tiossemicarbazônicos

2.3.1 Semicarbazonas e tiossemicarbazonas

As semicarbazonas e tiossemicarbazonas constituem importantes classes de compostos que têm sido extensivamente estudadas na Química Medicinal e, particularmente na Química Medicinal Inorgânica devido a sua capacidade quelante e do papel da coordenação no seu mecanismo bioquímico de ação. Apresentam ampla variabilidade farmacológica, entretanto, especificidades estruturais podem levar à manifestação de atividades específicas. Para os complexos metálicos, as propriedades biológicas estão muitas vezes relacionadas com a coordenação do íon metálico (BERALDO; GAMBINO, 2004; OLIVEIRA et al., 2008). São compostos conhecidos por terem diversas funções biológicas, que incluem propriedades antimalária, antibacteriana, antituberculose, antiviral, antitumoral, antifúngica, antichagásica, entre outras (CHANDRA; GUPTA, 2005; PAVAN et al., 2010; SOARES et al., 2011).

As semicarbazonas possuem na sua estrutura um grupamento carbonila que pode ser convertido a um grupamento tiocarbonilado, obtendo-se desta forma, uma tiossemicarbazona. Nesse sentido, o que diferencia uma semicarbazona de uma tiossemicarbazona é a presença de uma função carbonílica ($C=O$) nas semicarbazonas que é substituída por uma função tinila ($C=S$) nas tiossemicarbazonas (Figura 9) (DU et al., 2002; PAVAN et al., 2010).

Figura 9: Estrutura geral das semicarbazonas (X = O) e tiossemicarbazonas (X = S); R₁, R₂, R₃ e R₄ = H, grupos alquila ou arila.



Fonte: Adaptado de Ho, 2013.

2.3.2 Perfil farmacológico das semicarbazonas

As semicarbazonas são farmacóforos importantes na busca de novos fármacos. Apresentam um extenso perfil farmacológico e podem ser obtidas por meio da condensação de semicarbazidas com aldeídos ou cetonas (ENYEDY et al., 2014; VIEIRA et al., 2013). Devido à possibilidade de escolha dos substituintes da cadeia, sempre buscando uma melhor interação com alvos biológicos, e também da possível modulação do caráter lipofílico dos derivados semicarbazônicos, faz das semicarbazonas intermediários importantes para a concepção de medicamentos (BRONDANI et al., 2007).

A comunidade científica vem atribuindo variadas aplicações terapêuticas as semicarbazonas, dentre as quais merece destaque: atividade anticonvulsivante (AHSAN, 2013; RAJAK et al., 2010; RAJAK et al., 2013; SHALINI et al., 2009; YOGEE SWARI et al., 2005), antiproliferativa (GAN et al., 2014), antifúngica (CHANDRA; GUPTA, 2005; HEMALATHA et al., 2012), antimalárica (OLIVEIRA et al., 2008), antiangiogênica (ROCHA et al., 2006), antinociceptiva e antiinflamatória (VIEIRA et al., 2012), anti-alzheimer (SUSHANT; SHRIVASTAVA, 2013), antibacteriana (CHANDRA; GUPTA, 2005), antichagásica (SOARES et al., 2011), antituberculose (PAVAN et al., 2010), inibidores de proteínas quinases (QI, 2013; TU, 2017; ZHAI, 2016; LIU, 2014), anticâncer (LIU et al., 2014; NOBLÍA et al., 2005; QI et al., 2013; SHUKLA et al., 2012) citotóxica e morte por apoptose (HO et al., 2013), dentre outras.

Assim como as tiossemicarbazonas, as semicarbazonas apresentam em sua estrutura química o grupo funcional chamado base de schiff, no qual contém uma dupla ligação carbono-nitrogênio com o átomo de carbono conectado a um grupo arila ou alquila, mas não hidrogênio. As bases de Schiff apresentam um papel importante na química de coordenação,

pois elas formam complexos estáveis com vários metais, por essa razão, são bem conhecidas pela vasta gama de aplicações, principalmente no campo biológico. Várias bases de schiff são relatadas na literatura por possuírem propriedades anticâncer, dentre elas, estão as bases formadas por derivados semicarbazônicos (PRAKASH et al., 2011; REN et al., 2012; SUNIL et al., 2013; SZTANKE et al., 2013).

Outros trabalhos relatam a atividade anticâncer de complexos de semicarbazonas associados a metais: cobre (VENKATACHALAM et al., 2016), vanádio (NOBLÍA et al., 2005), rutênio (IVANOVIĆ et al., 2013), rênio (HO et al., 2013), Gálio (GAMBINO et al., 2011), níquel (AFRASIABI et al., 2005), entre outros.

O potencial anticâncer das semicarbazonas já foi comprovado por diversos estudos e alguns deles buscam conhecer o mecanismo de ação desses compostos, desse modo, no trabalho de Shukla et al. (2012), foram sintetizados derivados semicarbazônicos e avaliados frente a três linhagens de células humanas (HepG2, MG-63 e MCF-7), posteriormente foi realizado o docking molecular dos compostos tendo como alvo a enzima topoisomerase II. Os compostos apresentaram alta afinidade pelo domínio de ATPase da topoisomerase II corroborando com os valores da CI_{50} que ficaram entre 5,5-7,2 μ M.

Em outro trabalho realizado por Qi e colaboradores (2013), também teve como um dos objetivos compreender o mecanismo de ação de derivados semicarbazônicos que na ocasião foram primeiramente testados frente quatro a linhagens de câncer humano (A549, HT-29, MKN-45 e MDA-MB-231), todos os compostos apresentaram excelente potencial anticâncer e os quatro melhores foram posteriormente avaliados frente a outras linhagens (U87MG, NCI-H460 e SMMC7721). O composto mais promissor foi submetido aos ensaios de western blot e docking molecular para verificar se ele tinha a propriedade de inibir o fator de transição epitelial mesenquimal (c-Met). O c-Met é membro da família dos receptores de tirosina quinase, quando está alterado estimula vias de sinalização responsáveis pela proliferação, invasão, migração, angiogênese, sobrevivência, metástase e resistência aos medicamentos. O resultado do western blot demonstrou que o composto inibe a autofosforilação da c-Met quinase na célula de câncer A549 e o docking molecular confirmou esse resultado, pois apresentou excelente inibição dessa tirosina quinase ao ser avaliado frente as linhagens A549, HT-29, U87MG e NCI-H460.

Com base no que foi citado, as semicarbazonas são excelentes moléculas para pesquisa de fármacos devido ao seu amplo perfil farmacológico. Destacam-se na pesquisa de novos agentes anticâncer por inibirem vias cruciais para sobrevivência e divisão celular das

células cancerígenas, assim, diante da problemática do câncer é necessário o estudo aprofundado dessa classe, a fim de encontrar compostos promissores.

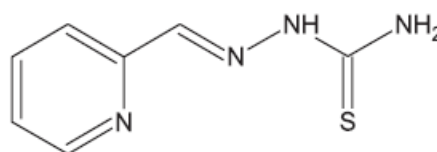
2.3.3 Perfil farmacológico das tiossemicarbazonas

As tiossemicarbazonas constituem uma importante classe de compostos bastante conhecidos na pesquisa de novos fármacos, devido ao seu amplo espectro de ação (MELOS et al., 2015). São obtidas por meio da condensação de tiossemicarbazidas com aldeídos ou cetonas (BLAU et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2008). Apresentam diversas atividades, dentre as quais merece destaque: atividade antiproliferativa (GAN et al., 2014), antibacteriana e antifúngica (CHANDRA; GUPTA, 2005; CHANDRA et al., 2009), antiamebiana (BHARTI et al., 2003), antichagásica (BLAU et al., 2013; ESPÍNDOLA et al., 2015; SOARES et al., 2011), antileishmania (MELOS et al., 2015), antimalárica (OLIVEIRA et al., 2008), antiviral (GENOVA et al., 2004), antituberculose (VELEZHEVA et al., 2016), anti-*Toxoplasma gondii* (GOMES et al., 2013), antioxidante (LIU et al., 2009; NGUYEN et al., 2013), anticâncer (JAGADEESH et al., 2014; JANSSEN et al., 2015; PAPE et al., 2016; QUIROGA et al., 2004; SAMPATH et al., 2013; SOARES et al., 2012, VENKATACHALAM et al., 2016; YU et al., 2009), dentre outras.

As propriedades biológicas das tiossemicarbazonas são frequentemente associadas à coordenação com íons metálicos. Dentre as atividades biológicas, a mais estudada tem sido a atividade antitumoral. Esta propriedade é atribuída principalmente à capacidade que esses compostos têm de inibir a Ribonucleosídeo Difosfato Redutase (RDR), enzima de grande importância na biossíntese do DNA (YU et al., 2009).

A atividade dos derivados tiossemicarbazônicos como inibidores da enzima RDR foi conhecida através dos estudos de (Brockman et al., 1956) quando demonstrou a atividade antileucêmica da 2-formilpiridina tiossemicarbazona (Figura 10). Desde então, vários outros estudos vêm sendo desenvolvidos.

Figura 10: Estrutura da 2-formilpiridina tiossemicarbazona.



Fonte: Adaptado de Brockman et al., 1956.

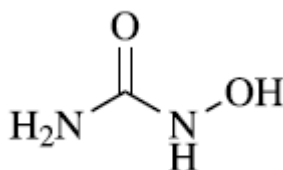
A RDR é uma enzima alostérica formada por duas subunidades: R1 e R2. Na subunidade R1 encontra-se o sítio catalítico, o sítio de especificidade e o sítio ativo, enquanto que a subunidade R2 contém íons Fe^{3+} ligados entre si através de uma ponte μ -oxo e um radical tirosila (GILES, 2007; SMITH; KARP, 2007).

As tiossemicarbazonas são excelentes agentes quelantes de metais de transição, tais como ferro (Fe), cobre (Cu) e zinco (Zn), dessa forma, imaginou-se que esses compostos poderiam exercer sua ação inibitória na RDR através da coordenação com o íon Fe^{3+} presente na estrutura da enzima (FRENCH; BLANZ, 1966; CHANDRA et al., 2009).

Porém, em 1971, Sartorelli e colaboradores verificaram que derivados tiossemicarbazônicos inibiram a incorporação de H-timidina no DNA de uma variedade de linhagens celulares e que o sítio da lesão metabólica na biossíntese do DNA foi na conversão de ribonucleotídeos para as formas desoxi correspondentes, catalisadas pela enzima RDR. Nesse trabalho também foi demonstrado que há uma relação competitiva entre as tiossemicarbazonas e o substrato da enzima, dessa forma foi compreendido que as tiossemicarbazonas se ligam no sítio ou próximo ao sítio da enzima RDR normalmente ocupado pelo substrato.

Na clínica existe em uso um inibidor da enzima RDR chamado de hidroxiuréia (Figura 11). É um fraco bloqueador da atividade da enzima, por isso é considerado um agente antineoplásico de eficácia limitada, além de apresentar sérios efeitos adversos dermatológicos (QUATTRONE et al., 2013).

Figura 11: Estrutura química da hidroxiuréia.



Fonte: Adaptado de Bhawe et al., 2013.

Vários trabalhos sobre inibidores da RDR são descritos na literatura e muitos desses foram realizados com derivados tiossemicarbazônicos, pois esses compostos chegam a ser até mil vezes mais potentes que a hidroxiuréia ao inibir essa enzima, logo são futuros candidatos a substituí-la na clínica (SMITH; KARP, 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial anticâncer e mutagênico, em modelos *in vitro* e *in vivo*, de novos derivados aril-semicarbazônicos e aril-tiossemicarbazônicos.

3.2 Objetivos específicos

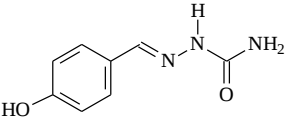
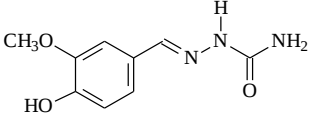
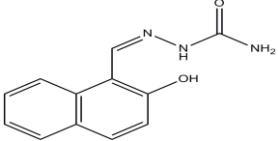
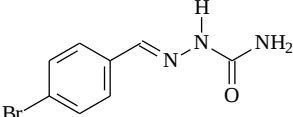
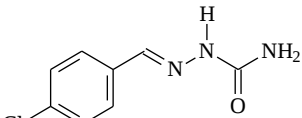
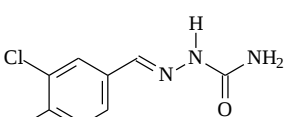
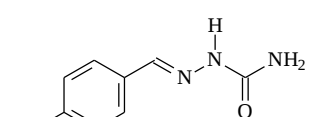
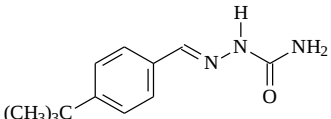
- Realizar a triagem dos novos derivados utilizando um painel de linhagens celulares de câncer humano e selecionar o composto mais ativo para elucidar de mecanismo de morte celular;
- Avaliar a seletividade dos derivados semicarbazônicos e tiossemicarbazônicos em linhagens tumorais e em células normais humanas;
- Determinar a atividade hemolítica do composto mais promissor em eritrócitos humanos;
- Analisar a morfologia das células para verificar o aspecto de morte após o período de incubação com o composto mais citotóxico;
- Estudar o mecanismo de morte provocado pelos melhores compostos;
- Avaliar a toxicidade oral aguda do composto mais citotóxico nos testes *in vitro*;
- Avaliar a ação mutagênica do composto selecionado através do teste do micronúcleo em sangue periférico de camundongos;
- Determinar o efeito do composto selecionado no crescimento do carcinoma de Ehrlich *in vivo*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Compostos

Os novos derivados aril-semicarbazônicos e aril-tiossemicarbazônicos foram sintetizados, caracterizados e fornecidos pelo Laboratório de Planejamento, Síntese e Avaliação de Fármacos (LABSINFA) do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE, sob a coordenação do Prof. Dr. Dalci José Brondani (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1: Estrutura dos derivados aril-semicarbazônicos sintetizados pelo LABSINFA – UFPE.

Estrutura	Nomenclatura	Código
	4-hidroxi benzaldeído semicarbazona	3a
	4-hidroxi-3-metoxi benzaldeído semicarbazona	3b
	2-hidroxi-naftaldeído semicarbazona	3c
	4-bromobenzaldeído semicarbazona	3d
	4-clorobenzaldeído semicarbazona	3e
	3,4-diclorobenzaldeído semicarbazona	3f
	4-metilbenzalaldeído semicarbazona	3g
	4-terc-butilbenzalaldeído semicarbazona	3h

Continua.

Tabela 1: Estrutura dos derivados aril-semicarbazônicos sintetizados pelo LABSINFIA – UFPE. Conclusão.

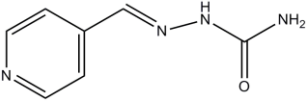
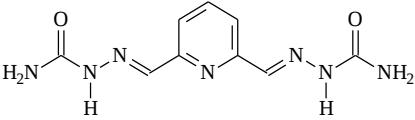
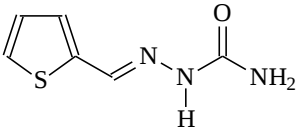
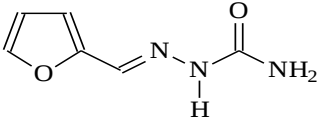
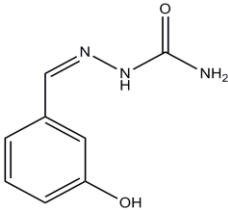
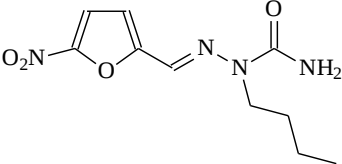
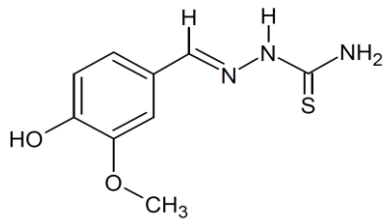
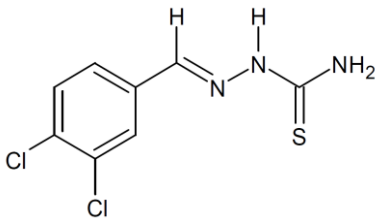
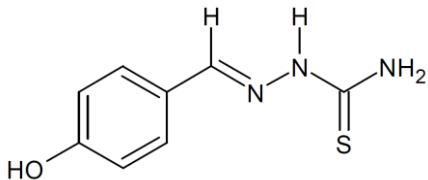
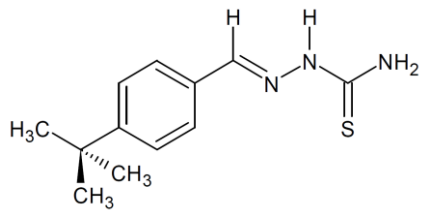
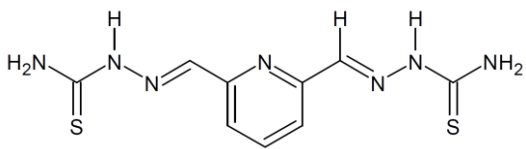
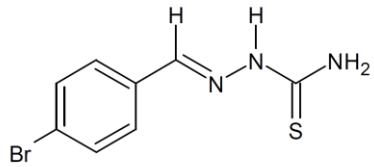
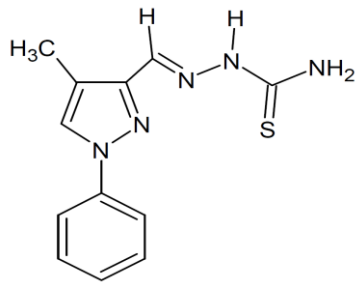
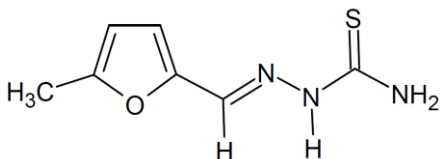
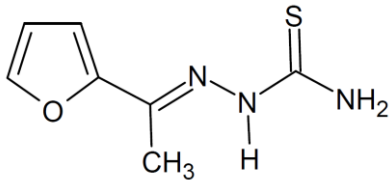
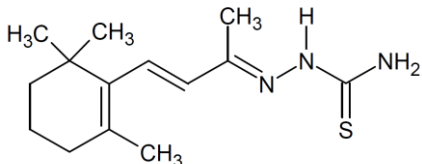
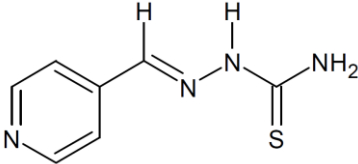
Estrutura	Nomenclatura	Código
	4-piridinacarboxaldeído semicarbazona	3i
	2,6-piridina-dicarboxaldeído semicarbazona	3j
	2-tiofenocarboxaldeído semicarbazona	3k
	2-furfuraldeído semicarbazona	3l
	3-hidroxi benzaldeído semicarbazona	3m
	5-Nitro-2-(N2-butil) furfuraldeído semicarbazona	4a

Tabela 2: Estrutura dos derivados aril-tiossemicarbazônicos sintetizados pelo LABSINFA – UFPE.

Estrutura	Nomenclatura	Código
	2- hidróxi- 3-metóxi-benzaldeído tiossemicarbazona	TS01
	3,4-diclorobenzaldeído tiossemicarbazona	TS02
	4-hidróxi-benzaldeído tiossemicarbazona	TS03
	4- <i>terc</i> -butilbenzaldeído tiossemicarbazona	TS04
	2,6-carboxialdeído piridina tiossemicarbazona	TS05
	4-bromobenzaldeído tiossemicarbazona	TS06
	3-metil-1fenil-1H-pirazol-4carboxaldeído tiossemicarbazona	TS07

Continua.

Tabela 2: Estrutura dos derivados aril-tiossemicarbazônicos sintetizados pelo LABSINFA – UFPE. Conclusão.

Estrutura	Nomenclatura	Código
	5-metil-2-furaldeído tiossemicarbazona	TS08
	Acetilfurano tiossemicarbazona	TS09
	B-ionona tiossemicarbazona	TS10
	4-piridina carboxaldeído tiossemicarbazona	TS11

4.2 Experimentos *in vitro*

4.2.1 Células

Para o ensaio de citotoxicidade em células de câncer humano foram utilizadas linhagens aderidas: HT-29 (carcinoma de cólon), MCF-7 (carcinoma de mama), NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão) e HEp-2 (carcinoma de cérvix uterino) e linhagens em suspensão: K562 (leucemia mielóide crônica), HL-60 (leucemia promielocítica) e MOLT-4 (leucemia linfoblástica). As células foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro e mantidas no Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. As células foram cultivadas em garrafas para cultura de células (volume de 250 mL) e mantidas com meio de cultura RPMI 1640 (HL-60, K562, MOLT-4 e MCF-7) e DMEM (NCI-H292, HT-29 e HEp-2) suplementados com soro fetal bovino a 10% e com antibióticos a 1%, penicilina e estreptomicina. As células foram

mantidas sob incubação em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. O acompanhamento do crescimento celular foi realizado através de microscópio invertido.

4.2.2 Determinação da atividade citotóxica

4.2.2.1 Ensaio de citotoxicidade em células tumorais humanas pelo teste do MTT

Princípio do teste

A avaliação do efeito citotóxico dos compostos foi realizado através do teste do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium) que é um ensaio quantitativo *in vitro* para estimar a proliferação e a sobrevivência celular (ALLEY et al., 1988; MOSMANN, 1983). É baseado na capacidade da enzima succinato desidrogenase, ativa nas mitocôndrias de células viáveis, converter o sal tetrazolium (MTT) que é hidrossolúvel e de cor amarelada, em cristais de formazan, que são de cor púrpura. Nesse trabalho, esse ensaio foi utilizado para fazer a triagem dos compostos frente às linhagens cancerígenas e posteriormente selecionar os compostos mais ativos.

Procedimento experimental

As células tumorais foram semeadas em placas de 96 poços nas seguintes concentrações: NCI-H292, HT-29, HEp-2 e MCF-7 (10^5 células/mL), HL-60 e K562 ($0,3 \times 10^6$ células/mL) e MOLT-4 (10^6 células/mL). Em seguida os compostos previamente dissolvidos em DMSO (dimetilsufóxido), foram diluídos em meio DMEM (NCI-H292, HT-29 e HEp-2) e RPMI 1640 (MCF-7, HL-60, K562 e MOLT-4) para então serem pipetados nas concentrações desejadas.

Na triagem inicial foi determinado o percentual de inibição do crescimento celular (IC %) de todos os derivados na concentração de 25 µg/mL frente às linhagens citadas. Os compostos que nessa concentração inibiram o crescimento celular em mais de 75 % foram submetidos a teste de citotoxicidade em diferentes concentrações para calcular a concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular (CI₅₀) de 72 horas. Para isso, os compostos foram diluídos em série para obtenção das concentrações finais entre 0,19 - 25 µg/mL. A doxorubicina foi utilizada como padrão na concentração (0,078-10 µg/mL). Após o período de contato das células com os compostos, foi adicionado em cada poço 25 µL de solução de MTT (5 mg/mL). As placas foram deixadas por 3 h em estufa a 37 °C e ao final desse período o sobrenadante foi aspirado. Para a realização da leitura, foi adicionado 100 µL

de DMSO em cada poço para a dissolução dos cristais de formazam (ALLEY, et al., 1988; MOSMANN, 1983).

Análise dos dados

A absorbância foi medida em um leitor de microplacas (Modelo 3550 BIO-RAD, Inc.) no comprimento de onda de 560 nm. Os experimentos foram analisados através da média e desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. O percentual de inibição do crescimento celular (IC%) foi determinado considerando a média do controle negativo como 100 % de viabilidade. A porcentagem de inibição x log da concentração foi registrada e suas CI_{50} e os respectivos intervalos de confiança (IC 95%) foram calculados a partir da regressão não linear no programa *GraphPad Prism* versão 6.0. demo.

Aspectos éticos do ensaio de citotoxicidade em Células Mononucleadas de Sangue Periférico Humano e atividade hemolítica em eritrócitos humanos

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Pernambuco, sob o n ° 67004017.3.0000.5208 e foi realizado de acordo com a resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (ANEXO A).

4.2.2.2 Avaliação da atividade citotóxica em células mononucleadas do sangue periférico humano

Princípio do teste

Avaliar a citotoxicidade do composto em estudo sobre a proliferação de células normais. Nesse ensaio foram utilizadas células mononucleadas do sangue periférico humano (CMSPH), que inclui linfócitos e monócitos, e com o resultado desse ensaio foi possível calcular o índice de seletividade do composto teste para células de câncer (BUARQUE et al., 2011).

Procedimento experimental

As células mononucleadas foram obtidas do sangue periférico de voluntários sadios por meio de coleta em tubo de heparina e isoladas por centrifugação em gradiente de Ficoll (Histopaque). Após a centrifugação, as células foram colhidas, lavadas com tampão fosfato

(PBS) e ressuspensas em meio RPMI 1640 completo. Utilizando a câmara de Neubauer, as células foram contadas e plaqueadas em placa de 96 poços na concentração de 10^6 e mantidas sob incubação a 37 °C e 5 % CO₂. Os compostos previamente dissolvidos em DMSO foram diluídos em meio RPMI 1640 para posteriormente serem pipetados nos poços na concentração desejada. Primeiro foi avaliado o percentual de inibição do composto na concentração de 25 µg/mL e depois foi realizado o ensaio para determinação da CI₅₀. Nesse último caso, o composto foi diluído em série para obtenção das concentrações finais na placa no intervalo de 0,19-25µg/mL. A doxorrubicina foi utilizada como padrão e sua CI₅₀ foi calculada (0,078-10µg/mL). Após o período de incubação de 72 h foi adicionado em cada poço 25 µL de solução de MTT (5 mg/mL) e a placa foi incubada na estufa por mais 4 h. Após esse período, as placas foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi aspirado e para realizar a leitura, foi adicionado 100 µL de DMSO em cada poço para dissolução dos cristais de formazan celular (ALLEY et al., 1988; MOSMANN, 1983).

Análise dos dados

A absorbância foi medida em um leitor de microplacas (Modelo 3550 BIO-RAD, Inc.) no comprimento de onda de 560 nm. Os experimentos foram analisados através de suas médias e respectivos erros padrão, realizados em triplicata em dois experimentos independentes. O percentual de inibição do crescimento celular (IC %) foi determinado considerando a média do controle negativo como 100 % de viabilidade. A porcentagem de inibição x log da concentração foi registrada e suas CI₅₀ e os respectivos intervalos de confiança (IC 95%) foram calculados a partir da regressão não linear no programa *GraphPad Prism* versão 6.0. demo.

A CI₅₀ foi usada para determinar o índice de seletividade (IS), com a seguinte fórmula:

$$IS = CI_{50} \text{ da célula não tumoral (PBMC)} / CI_{50} \text{ da célula tumoral, sendo considerado significativo o } IS \geq 2.0 \text{ (PEREIRA et al., 2015).}$$

4.2.3 Determinação do potencial hemolítico em eritrócitos humanos

Princípio do teste

Segundo Costa-Lotufo et al. (2002), esse ensaio permite avaliar o potencial dos compostos testes em causar danos na membrana celular, seja pela formação de poros ou pela ruptura total da membrana. A presença da hemoglobina na solução é lida no

espectrofotômetro. O composto em estudo foi submetido a esse teste visando avaliar a capacidade desse composto em provocar hemólise em eritrócitos humanos.

Procedimento experimental

O sangue foi coletado de doadores sadios em tubos de EDTA. Os eritrócitos foram lavados com solução salina (NaCl 0,85% + CaCl₂ 10 mM) por centrifugação (3000 rpm/5min) por três vezes, o sobrenadante foi descartado e os eritrócitos ressuspensos em solução salina para se obter uma suspensão final de eritrócitos (SE) a 2%. Esse experimento foi realizado em placa com 96 poços, dispostos da seguinte forma: 100 µL de solução salina (controle negativo); 50 µL da solução salina e 50 µL do veículo (branco); 80 µL de solução salina + 20 µL de Triton X – 100 a 1% (controle positivo); 100 µL de solução salina + 100 µL do composto teste (2 a 250 µg/mL) diluído em DMSO foram plaqueados. Em seguida, 100 µL da solução de eritrócitos foram adicionados em todos os poços e depois a placa foi incubada por 1 h sob agitação constante à temperatura ambiente. Ao final deste período, a leitura óptica do sobrenadante foi feita em leitor automático de placas (450 nm) (COSTA-LOTUFO et al., 2002).

Análise dos dados

Foi registrada a porcentagem do efeito x log da concentração e determinadas suas CE₅₀ (Concentração média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) a partir de regressão não linear utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 6.0. demo. Cada amostra foi testada em duplicata em dois experimentos independentes.

4.2.4 Estudo do padrão de morte celular

4.2.4.1 *Análise morfológica - Coloração diferencial por Panótico rápido*

Princípio do teste

A coloração com kit panótico rápido (BC Labor®) permite a visualização das características morfológicas das células por meio da coloração diferenciada do citoplasma e do núcleo. Dessa forma, ao visualizar as lâminas é possível analisar a morfologia das células e observar um possível padrão de morte celular causado pelo composto em estudo.

Procedimento experimental

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços com o composto teste e incubadas por 48 horas. As concentrações utilizadas para o estudo de mecanismo de ação foram estimadas a partir do valor da CI_{50} de 48 horas encontrada no método do MTT, desse modo, as concentrações escolhidas foram: a metade da CI_{50} , a CI_{50} e o dobro da CI_{50} . A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo em todos os ensaios. Após o período de incubação das células com o composto em estudo, 50 μ L da suspensão de células foi adicionado na centrífuga de lâmina (cytospin). Na sequência as lâminas foram coradas de acordo com o protocolo do kit panótico rápido, lavadas com água destilada para remover o excesso de corante e colocadas para secar para mais tarde serem visualizadas em microscópio óptico.

Análise dos dados

A análise morfológica do núcleo e do citoplasma celular ocorreu com o auxílio de um microscópio óptico com aumento de 400x, sempre comparando com o controle negativo e positivo. O registro das alterações foi feito por fotografia. As imagens escolhidas para exposição representavam o que se mostrava mais constante nas lâminas.

4.2.4.2 Determinação da viabilidade celular utilizando o kit Guava ViaCount

Princípio do teste

O kit *ViaCount* (Guava technologies) determina a viabilidade celular baseado na permeabilidade da membrana. Nesse ensaio, é possível determinar a porcentagem de células viáveis, em apoptose e necrose.

Procedimento experimental

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços e incubadas por 72 h com o composto em estudo. Após o período de incubação, uma alíquota de 500 μ L de suspensão de células tratadas e não tratadas foram transferidas para um tubo tipo eppendorf, centrifugadas para remover o sobrenadante e depois adicionar 190 μ L do reagente *ViaCount*. As amostras foram incubadas por 5 minutos e posteriormente, analisadas no citômetro de fluxo (EasyCyte HT, Guava Technologies, EUA). A leitura e análise das amostras foram realizadas no programa GuavaSoft 2.7. Foram analisados cinco mil eventos.

Análise dos dados

Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram apresentados como média e desvio padrão da média de n experimentos e analisados pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste Student Newman Keuls, com nível de significância estatística de 95% ($p < 0,05$) no programa GraphPad Prism versão 6.0. demo.

4.2.4.3 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial

Princípio do teste

A via intrínseca da apoptose é mediada pela mitocôndria, sendo caracterizada pela perda do potencial da membrana mitocondrial. Ocorre quando a célula sofre estímulos pró-apoptóticos que resultam na formação de poros na membrana externa da mitocôndria. A formação desses poros permite a saída de fatores pró-apoptóticos tais como o citocromo c ou o smac diablo, como também efluxo de íons H^+ , induzindo a alteração do potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$). Nesse sentido, a rodamina 123, um corante fluorescente, foi utilizada como fluorocromo para analisar o potencial de membrana mitocondrial, pois, esse é sequestrado para dentro das mitocôndrias com potencial de membrana inalterado. Assim, as células viáveis emitirão alta fluorescência verde devido à maior quantidade de rodamina 123 ligada às cargas positivas internas, enquanto que as mitocôndrias despolarizadas terão menor afinidade pelo corante, gerando eventos que emitirão menor fluorescência (CHRISTENSEN et al., 2013). Deste modo, este teste foi utilizado para a investigação da possível ativação da via apoptótica intrínseca pelo composto em estudo através da observação da alteração do potencial transmembrânico mitocondrial.

Procedimento experimental

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços e incubadas por 48 ou 72 h com o composto teste. Após o período de incubação, uma alíquota de 500 μ L de suspensão de células tratadas e não tratadas foram transferidas para um tubo tipo eppendorf e centrifugadas. Em seguida, o sobrenadante foi removido e foi adicionado 200 μ L de uma solução de rodamina 123 diluída na concentração de 1 μ g/mL (diluído em tampão fosfato). Após 30 minutos de incubação no escuro, as células foram lavadas e resuspendidas em PBS e reincubadas por mais 30 min e depois analisadas por citometria de fluxo (EasyCyte HT,

Guava Technologies, EUA) usando programa GuavaSoft 2.7 para leitura e análise das amostras onde foram analisados cinco mil eventos.

Análise dos dados

Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram apresentados como média e desvio padrão da média de n experimentos e analisados pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste Student Newman Keuls, com nível de significância estatística de 95% ($p < 0,05$) no programa GraphPad Prism versão 6.0.

4.2.4.4 Avaliação do ciclo celular e fragmentação de DNA por citometria de fluxo

Princípio do teste

O ciclo celular é formado pelas fases G1, S, G2 e M. Cada fase possui uma quantidade específica de DNA, dessa forma, quantificando o conteúdo de DNA é possível mensurar a porcentagem de células presentes em cada fase. Assim, nesse ensaio, após lisar a membrana das células com detergente, foi utilizado iodeto de propídio, um corante fluorescente, que é capaz de se ligar ao DNA e revelar a distribuição das células em cada ciclo (VARTHOLOMATOS et al., 2015; WENPING et al., 2017).

Procedimento experimental

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços e incubadas por 48 ou 72 h com o composto teste. A doxorrubicina foi usada como padrão. Após o período de incubação, as células foram transferidas para um eppendorf, fixadas e incubadas por mais 30 minutos com 200 μ L de solução de lise contendo PI (50 μ g/mL), Triton X-100 (0,1%) e citrato de sódio (0,1%). Em seguida as amostras foram analisadas por citometria de fluxo (EasyCyte HT, Guava Technologies, EUA) usando programa GuavaSoft 2.7 para leitura e análise das amostras, onde foram obtidos os histogramas representando a quantidade de células em cada fase do ciclo celular e a quantidade de células com DNA fragmentado. Em cada poço foram analisados cinco mil eventos.

Análise dos dados

Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram apresentados como média e desvio padrão da média de n experimentos e

analisados pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste Student Newman Keuls, com nível de significância estatística de 95% ($p < 0,05$) no programa GraphPad Prism versão 6.0.

4.2.4.5 Detecção da externalização da fosfatidilserina – Teste da Anexina-V

Princípio do teste

Nesse ensaio foi utilizado o *Kit Guava Nexin* que possui dois corantes e por meio da coloração diferencial por fluorescência permite a identificação de quatro populações distintas: células viáveis, células em apoptose inicial, células em apoptose tardia e células mortas. Um dos corantes é anexina-V que se liga com grande afinidade a fosfatidilserina presente na superfície celular de células em apoptose emitindo alta fluorescência amarela. O outro corante é o 7-AAD que é hidrofílico e impermeável em células intactas, porém em células com perda de integridade da membrana, consegue penetrar e se ligar ao DNA, emitindo alta fluorescência vermelha.

Desse modo, as células sem marcação nenhuma são consideradas células viáveis, as células caracterizadas pela fluorescência amarela são consideradas em apoptose inicial, as células marcadas pela fluorescência amarela e vermelha são consideradas em apoptose tardia e as células que emitem apenas fluorescência vermelha são consideradas já mortas, em necrose (GONÇALVES et al., 2016).

Procedimento experimental

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços e incubadas com o composto em estudo. Após o período de incubação, uma alíquota de 500 μL de suspensão de células tratadas e não tratadas foram transferidas para um tubo tipo eppendorf e centrifugadas para depois remover o sobrenadante. Posteriormente, uma alíquota de 100 μL da suspensão de células em PBS de todos os grupos foi incubada com 100 μL da solução de Guava® Nexin (Guava Technologies). Após 20 minutos de incubação na ausência de luz, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo (EasyCyte HT, Guava Technologies, EUA). Para cada amostra foram analisados cinco mil eventos.

Análise dos dados

Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram apresentados como média e desvio padrão da média de n experimentos e

analisados pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste Student Newman Keuls, com nível de significância estatística de 95% ($p < 0,05$) no programa GraphPad Prism versão 6.0.

4.3 Experimentos *in vivo*

Os experimentos obedeceram às normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animal (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco, sob o processo nº 23076.015286/2017-04 (ANEXO B). Todos os testes *in vivo* foram realizados com o composto TS04 no modelo animal camundongos albinos swiss (*Mus musculus*).

4.3.1 Animais

Foram utilizados camundongos albinos suíços (*Mus musculus*) de ambos os sexos, pesando entre 25-30 gramas, provenientes do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram abrigados em gaiolas com livre acesso à comida e água e mantidos sob ciclo claro-escuro de 12 h com temperatura controlada (22 ± 2 °C).

4.3.2 Ensaio de Toxicidade Oral Aguda

Princípio do teste

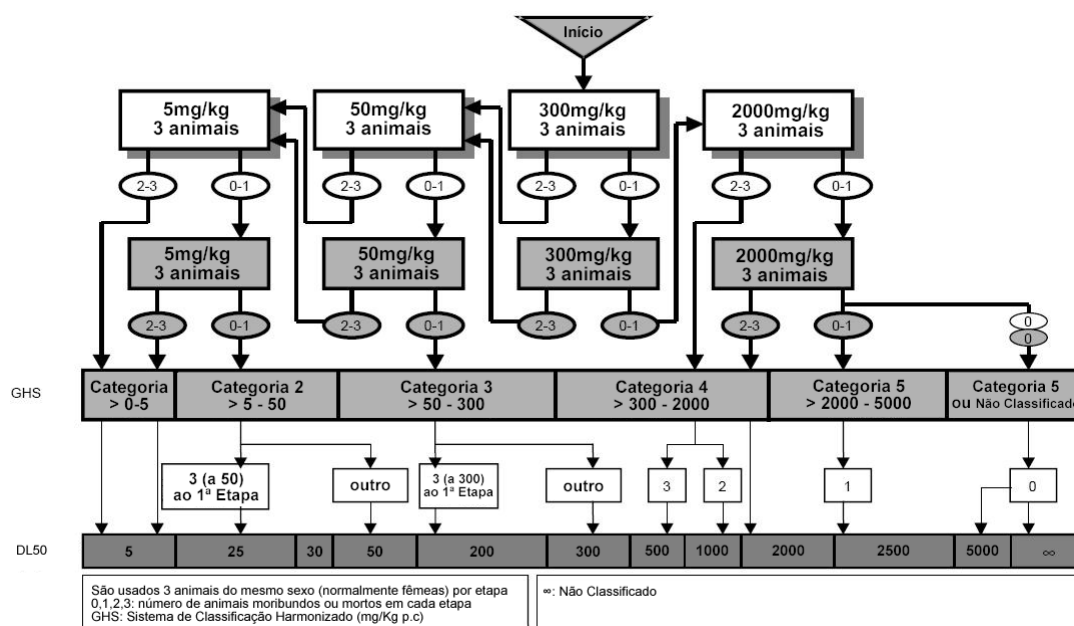
O composto TS04 foi administrado nos animais por via oral (VO) em doses fixas e sequencias. O objetivo desse ensaio foi estimar a faixa de DL_{50} (Dose Letal para 50% dos animais), avaliar possíveis alterações comportamentais e fisiológicas e ainda, ter orientação para escolher as doses que serão trabalhadas nos ensaios da atividade antitumoral e mutagênica.

Procedimento experimental

A Toxicidade Oral Aguda foi realizada de acordo com o Guia 423 da OECD/2001. Método da Toxicidade Oral Aguda de Classe (TAC) que determina doses fixas que devem ser utilizadas no estudo (2000, 300, 50 e 5 mg/kg) e a quantidade de animais tratados por dose (três fêmeas).

Os testes foram iniciados com a dose de 300 mg/kg, por se tratar de um composto puro. Segundo o protocolo, se ocorresse a morte de 0-1 animal a dose seria repetida em 3 animais nas mesmas condições anteriores. Se ocorresse a morte de 2-3 animais, doses sequenciais menores seriam administradas até possibilitar estimativa de uma faixa de DL_{50} (Figura 13).

Figura 13: Etapas para ensaio de Toxicidade Oral Aguda iniciando pela dose de 300 mg/kg



Fonte: Guia 423 da OECD/2001.

Após a administração os animais foram observados continuamente nas duas primeiras horas e depois a cada 24 horas diariamente durante 14 dias para a verificação de qualquer alteração comportamental ou nas atividades fisiológicas. Os animais foram avaliados pelo método de *screening* hipocrático, no qual se verifica possíveis alterações no estado de consciência, disposição geral, atividade e coordenação do sistema motor, tônus muscular, reflexos e atividade do sistema nervoso central e autônomo (KUMAR et al., 2017).

Os parâmetros avaliados foram: atividade geral, frênto vocal, irritabilidade, resposta ao toque, resposta ao aperto da cauda, contorção, posição trem posterior, reflexo endireitamento, tônus do corpo, força para agarrar, ataxia, reflexo auricular, reflexo corneal, tremores, convulsões, hipnose, anestesia, lacrimação, ptose, micção, defecação, piloereção, hipotermia, respiração, cianose, hiperemia e morte. Durante os 14 dias também foram observados a variação de peso corporal e consumo de água e alimento. Ao final do período de observação os animais foram submetidos a um jejum de 12 h com água *ad libitum* e anestesiados com cetamina/xilazina (90/9 mg/kg) por via intraperitoneal. O sangue foi coletado por punção cardíaca para avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos. Os órgãos (fígado, rim e baço) foram coletados para avaliar as possíveis alterações macroscópicas e pesados para determinar o índice dos órgãos (peso do órgão/peso corpóreo).

4.3.3 Avaliação da atividade antitumoral

Princípio do teste

O tumor de Ehrlich é um adenocarcinoma espontâneo da glândula mamária de camundongos fêmeas. Foi desenvolvido por Paul Ehrlich em 1896 e desenvolve-se na forma sólida quando inoculado por via subcutânea ou intramuscular (EHRlich, 1906).

Procedimento experimental

As células tumorais do carcinoma de Ehrlich foram provenientes de animais portadores do tumor com oito dias de implantação. Os animais doadores foram eutanasiados com cetamina/xilazina (300/30 mg/kg). As células foram aspiradas com auxílio de uma seringa e depois diluídas em solução salina para uma concentração de 5×10^5 células/mL. Em seguida, uma alíquota de 0,2 mL da suspensão de células tumorais foi introduzida, por via subcutânea, na região axilar dos animais receptores. O tratamento foi iniciado 24 h após a implantação.

O efeito do composto TS04 foi avaliado por via oral nas doses de 5, 10, 20 e 30 mg/kg. O fármaco doxorrubicina foi utilizado como padrão por via intraperitoneal (i.p.) na dose de 1,5 mg/kg. O grupo controle negativo recebeu solução salina por via oral. Os animais foram tratados uma vez ao dia por um período de sete dias.

No nono dia de experimento, os animais foram eutanasiados para extirpação da massa tumoral, coleta do sangue e retirada dos órgãos (rins, baço e fígado). O sangue coletado foi destinado para análise dos parâmetros bioquímicos e hematológicos. Os órgãos foram analisados macroscopicamente e pesados para avaliar indícios de toxicidade (KUMAR et al., 2017; ZHENG et al., 2011).

O peso dos tumores foi utilizado para calcular a inibição do crescimento tumoral dos grupos tratados em relação ao controle. O percentual de inibição do crescimento tumoral (IT) foi calculado pela fórmula:

$$IT (\%) = [(A-B) / A] \times 100$$

Onde:

A = média dos pesos dos tumores no grupo controle.

B = média dos pesos dos tumores nos grupos tratados.

Análise dos dados

Os resultados (peso relativo dos órgãos e peso dos tumores) foram analisados a partir da média e do desvio padrão de n experimentos. Para verificação da ocorrência de diferenças

significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman Keuls, com nível de significância estatística de 95% no programa GraphPad Prism versão 6.0.

4.3.4 Teste do micronúcleo em sangue periférico de camundongos

Princípio do teste

Avaliar o potencial mutagênico do composto TS04 pelo teste de micronúcleos em sangue periférico de camundongos.

Procedimento experimental

Os ensaios foram realizados de acordo com Hayashi et al. (1990) e Guia 474 da OECD/1997.

Os animais do grupo controle negativo receberam salina por via oral. Os animais tratados com o composto TS04 receberam a dose de 50 mg/kg por via oral. A dose analisada (50 mg/kg) foi escolhida com base na DMT (Dose Máxima Tolerada) encontrada no ensaio de Toxicidade Oral Aguda.

Os animais do grupo controle positivo receberam ciclofosfamida por via intraperitoneal na dose de 50 mg/kg. Os tratamentos foram realizados em uma única dose.

Após 24 h de tratamento, foi coletada uma gota de sangue (50 µL) da veia caudal dos animais por meio de um corte na ponta da cauda. O sangue foi coletado diretamente na extremidade de uma lâmina previamente limpa e seca, foi feito o esfregão e a lâmina secou em temperatura ambiente. Para cada animal foram feitas no mínimo três lâminas. Após 24 h de secagem, as lâminas foram fixadas em metanol absoluto por 10 minutos e colocadas para secar novamente. Após isso, as lâminas com esfregão foram coradas com Giemsa a 10% por 20 minutos.

A análise foi realizada por microscopia óptica no aumento de 1000x. Foram analisados 2000 eritrócitos policromáticos (EPC) por animal e o número de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) foi anotado para posterior análise estatística.

Os micronúcleos foram identificados como estruturas tipicamente arredondadas, com contorno liso, definido e tamanho entre 1/5 e 1/20 do EPC.

Análise dos dados

Os resultados apresentados foram expressos como média e desvio padrão da média de n experimentos e analisados pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste Student

Newman Keuls, com nível de significância estatística de 95% ($p < 0,05$) no programa GraphPad Prism versão 6.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resultados referentes aos derivados aril-semicarbazônicos

5.1.1 Avaliação da atividade citotóxica dos derivados aril-semicarbazônicos em células tumorais humanas

A avaliação da citotoxicidade foi realizada pelo teste do MTT após 72 h de incubação. Nesse ensaio 14 derivados aril-semicarbazônicos foram analisados em um painel de 7 linhagens tumorais de diferentes tipos histológicos.

Inicialmente foi determinado o percentual de inibição no crescimento celular de cada composto na concentração de 25 µg/mL frente a cada linhagem celular (Tabela 3).

Tabela 3: Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) dos derivados aril-semicarbazônicos na concentração de 25 µg/mL frente a linhagens tumorais após 72 h de incubação.

Código	Linhagens celulares (IC%)						
	K562	HL-60	MOLT-4	HEp-2	NCI-H292	HT-29	MCF-7
3a	57,2 ± 1,9	59,3 ± 2,1	17,7 ± 1,6	37,3 ± 3,0	20,7 ± 1,3	14,7 ± 0,5	66,2 ± 6,7
3b	26,0 ± 2,0	44,0 ± 2,3	33,0 ± 0,4	38,3 ± 0,9	33,0 ± 2,6	35,0 ± 1,3	61,6 ± 6,7
3c	76,1 ± 1,7	92,5 ± 2,3	81,4 ± 4,2	78,8 ± 4,0	75,1 ± 6,8	75,4 ± 0,1	85,4 ± 0,1
3d	80,9 ± 4,6	98,0 ± 6,2	75,6 ± 4,6	83,0 ± 4,8	70,0 ± 1,0	69,5 ± 4,9	75,0 ± 7,5
3e	75,4 ± 0,2	58,1 ± 2,4	37,4 ± 5,9	78,2 ± 5,9	57,5 ± 1,0	66,0 ± 0,1	77,4 ± 4,7
3f	76,5 ± 1,7	77,0 ± 4,9	38,1 ± 1,8	99,1 ± 3,5	59,0 ± 1,8	38,4 ± 0,6	76,8 ± 2,8
3g	81,6 ± 2,0	85,0 ± 2,0	75,4 ± 4,9	80,8 ± 2,2	61,8 ± 0,3	60,0 ± 1,6	60,0 ± 1,6
3h	25,6 ± 1,8	47,0 ± 2,5	78,3 ± 5,9	77,3 ± 6,5	75,9 ± 3,3	76,9 ± 3,1	76,7 ± 2,6
3i	33,4 ± 3,0	29,7 ± 1,3	33,1 ± 1,5	49,5 ± 0,7	37,0 ± 1,4	32,7 ± 1,7	64,0 ± 3,4
3j	26,1 ± 2,1	20,0 ± 1,9	28,8 ± 2,4	36,0 ± 1,8	27,5 ± 1,8	14,5 ± 1,4	66,9 ± 5,4
3k	54,0 ± 2,1	55,1 ± 6,5	4,8 ± 0,1	51,3 ± 2,3	26,6 ± 1,7	35,0 ± 2,1	43,4 ± 4,0
3l	38,1 ± 0,8	60,6 ± 5,3	23,6 ± 0,5	49,7 ± 4,4	37,9 ± 3,6	17,1 ± 1,0	41,7 ± 2,9
3m	17,6 ± 0,9	47,3 ± 1,8	37,0 ± 1,2	43,1 ± 2,0	35,3 ± 0,7	16,4 ± 1,4	40,0 ± 1,5
4a	96,0 ± 0,4	97,0 ± 0,5	98,5 ± 0,5	79,8 ± 0,9	77,2 ± 3,4	81,6 ± 0,5	81,4 ± 4,2

Os valores correspondem à média ± desvio padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata.

Na triagem inicial foi verificado que 7 compostos apresentaram um percentual de inibição maior que 75% em no mínimo 3 linhagens e por isso, foram selecionados para a determinação da concentração que inibe 50% do crescimento celular (CI₅₀) (Tabela 4).

Tabela 4: CI₅₀ dos derivados aril-semicarbazônicos em linhagens de células tumorais e Células Mononucleadas de Sangue Periférico (PBMC) realizado pelo teste do MTT, após 72 horas de incubação.

Cód.	CI ₅₀ (μM)							
	K562	HL-60	MOLT	HEp-2	NCI-H292	HT-29	MCF-7	PBMC
3c	52,34 ± 1,15	13,08 ± 0,62	41,00 ± 0,7	37,08 ± 1,50	56,27 ± 3,05	40,57 ± 1,02	34,02 ± 1,06	82,01 ± 1,63
3d	25,19 ± 2,43	16,93 ± 1,10	37,17 ± 0,84	23,13 ± 0,80	> 103,27	> 103,27	33,46 ± 0,75	46,26 ± 0,97
3e	58,69 ± 0,97	> 126,50	> 126,50	22,26 ± 0,40	> 126,50	> 126,50	33,90 ± 0,80	> 126,50
3f	26,28 ± 1,86	14,22 ± 1,41	> 107,73	8,61 ± 0,35	> 107,73	> 107,73	23,26 ± 1,55	> 107,73
3g	33,29 ± 0,71	48,53 ± 1,63	56,43 ± 0,97	24,26 ± 0,97	> 141,08	> 141,08	> 141,08	> 141,08
3h	> 114,00	> 114,00	25,53 ± 1,9	42,86 ± 0,75	48,79 ± 0,97	46,97 ± 0,75	58,37 ± 1,86	49,70 ± 1,06
4a	24,21 ± 1,15	11,38 ± 0,27	19,53 ± 0,62	34,37 ± 0,88	37,89 ± 1,50	36,32 ± 0,97	33,59 ± 0,71	51,21 ± 0,75
Doxo ^a	1,47 ± 0,09	0,11 ± 0,01	0,73 ± 0,08	1,28 ± 0,11	0,18 ± 0,02	0,73 ± 0,09	0,20 ± 0,03	5,33 ± 0,62

Os dados são expressos como média ± DP de três experimentos diferentes realizados em triplicata.

^a Doxo (doxorubicina) foi usada como controle positivo.

* IS (Índice de Seletividade) = CI₅₀ PBMC / CI₅₀ células de câncer.

Somente os compostos **3c** e **4a** apresentaram atividade antiproliferativa frente a todas as linhagens testadas. A atividade citotóxica dos demais compostos variou de acordo com os substituintes ligados ao anel aromático e a linhagem celular.

A presença de um grupamento fortemente ativador, como o radical metoxi na posição 3 e uma hidroxila na posição 4 (**3b**), não modificou a potência quando comparado com o composto **3a**, que possui um grupo metoxil na posição 4. Dessa forma, foi observado que os compostos com substituintes fortemente ativadores no anel aromático benzeno não apresentaram atividade citotóxica, porém quando houve a substituição do anel benzeno pelo naftaleno e adição de um grupo ativador OH (composto **3c**), este composto apresentou atividade contra todas as linhagens.

A substituição no anel aromático benzeno por um grupo de ativação moderada ($\text{H}_3\text{C}-$) na posição 4 (**3g**) concedeu a esse composto atividade citotóxica frente a quatro linhagens (K562, HL-60, MOLT-4 e HEp-2) quando comparado com compostos onde os substituintes são ativadores fortes (**3a**, **3b**) que não apresentaram atividade.

O derivado **3h** também recebeu um substituinte de ativação moderada [$(\text{CH}_3)_3\text{C}-$] na posição 4, porém com maior lipofilia e impedimento estérico, causando nesse composto diminuição da atividade em algumas linhagens e aumento em outras linhagens testadas.

Os compostos sintetizados com substituintes formados por átomos de halogênios (grupos desativadores) apresentaram atividade citotóxica frente a algumas linhagens. A mudança do átomo halogênio cloro (**3e**) para o átomo halogênio bromo na mesma posição (**3d**) favoreceu o aumento da atividade citotóxica. A adição de um átomo de cloro na posição 3 do anel aromático conferiu ao composto **3f** aumento da atividade que ficou próxima a do composto **3d** onde o substituinte é um átomo bromo.

Analisando os compostos heterocíclicos aromáticos, foi observado que o radical butila ligado ao N2 da semicarbazona (**4a**) aumentou a lipofilia e potencializou a atividade deste composto em comparação aos demais derivados. Diante disso, pode-se inferir que as semicarbazonas condensadas a heteroaromáticos possam ter interação com alvos biológicos, no entanto, se a molécula possui baixa lipofilia, terá dificuldade em atravessar as membranas celulares e consequentemente a atividade biológica cairá acentuadamente.

Foi verificado que não importa o átomo envolvido no anel aromático O, S ou N presente nos compostos **3l**, **3k** e **3i**, respectivamente. Esses átomos não influenciaram no aumento da atividade, mesmo no composto dissustituído (**3j**) que é o menos lipofílico dos derivados heterocíclicos.

A lipofilia é um dos fatores fundamentais para atividade biológica dos fármacos, pois está diretamente ligada ao grau de permeabilidade das membranas celulares e o quanto a molécula estará disponível para interagir com os receptores biológicos.

Após análise dos compostos e seus substituintes aromáticos, foi observado que os derivados mais promissores foram os compostos **3c** e **4a**. Estes derivados apresentaram atividade citotóxica frente a todas as linhagens testadas e os melhores resultados foram frente à linhagem HL-60. O composto **3c** apresentou CI_{50} variando entre 13,08 e 56,27 μM , enquanto **4a** apresentou CI_{50} entre 11,38 e 37,89 μM , sendo este mais citotóxico para todas as linhagens. A eficácia maior do **4a** provavelmente se deve ao grupamento nitro (NO_2) que possui forte caráter desativador do anel aromático e aceptor de elétrons, além do aumento da lipofilia proferida pelo grupo butil ligado ao N2 da semicarbazona.

Visando avaliar o potencial citotóxico em células normais, todos os derivados foram testados frente a Células Mononucleadas de Sangue Periférico Humano (PBMC) e os compostos mais promissores foram novamente os compostos **3c** e **4a**, que apresentaram seletividade para as células cancerígenas.

O Índice de Seletividade (IS*) dos derivados **3c** e **4a** para a linhagem com menor CI_{50} (HL-60) foi de 6,2 e 4,5, respectivamente.

5.1.2 Inibição de proteínas quinases

Os 7 compostos mais citotóxicos foram testados *in vitro* frente a um painel de 11 proteínas quinases diferentes conhecidas por estarem envolvidas no processo de iniciação e progressão do câncer.

As proteínas quinases estudadas foram: CDK2/CyclinA, CDK5/p25, CDK9/CyclinT (cyclin-dependent kinase), HASPIN (haploid germ cell-specific nuclear protein kinase), PIM1 (PIM family kinase 1), CLK1 (cdc2-like kinase 1), DYRK1A (dual-specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase), CK1 (casein kinase 1), CK1 δ/ϵ (casein kinase 1 isoforms), GSK3 α/β (glycogen synthase kinase 3) e AURKA (aurora kinase A).

Inicialmente, todos os compostos foram testados em uma concentração única de 10 μ M. Os compostos que apresentaram inibição menor que 50% foram considerados inativos ($CI_{50} > 10 \mu$ M). Os compostos que apresentaram inibição maior que 50% foram diluídos em série no intervalo de concentrações entre 0,01 - 10 μ M para calcular a CI_{50} . Os valores de CI_{50} foram determinados a partir da curva dose-resposta (Sigma-Plot). Os resultados são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5. Atividade inibitória dos derivados aril-semicarbazônicos frente a proteínas quinases.

Proteínas quinases	CI_{50} (μ M)						
	3c	3d	3e	3f	3g	3h	4a
CDK2/CyclinA	0,53	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
CDK5/p25	0,35	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
CDK9/CyclinT	0,86	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
HASPIN	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
PIM1	0,52	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
CLK1	0,29	> 10	> 10	> 10	> 10	1,9	> 10
DYRK1A	0,073	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
CK 1 δ/ϵ	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	0,76
CK1	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
GSK3 α/β	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
AURKA	5,1	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10

Os resultados estão expressos a partir da média de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata com Desvio Padrão $\pm$ 10%.

Composto **3c** foi o mais ativo com CI_{50} variando entre 0,073 – 5,1 μ M. O **3c** apresentou atividade inibitória contra 7 proteínas quinases e a maior atividade foi contra DYRK1A. O composto **4a** apresentou CI_{50} no valor de 0,76 μ M contra as isoformas de CK1 δ/ϵ .

As proteínas quinases estão envolvidas em diversas funções celulares, como transcrição de genes, progressão do ciclo celular, rearranjo do citoesqueleto, proliferação, diferenciação, migração e morte celular (ASSADIESKANDAR et al., 2018). A desregulação das vias de sinalização dessas proteínas está associada a diversas doenças, entre elas o câncer (LOIDREAU et al., 2012; LOIDREAU et al., 2015). Consequentemente, esta classe de enzimas representa alvos terapêuticos importantes para tratar doenças (REGGI et al., 2017).

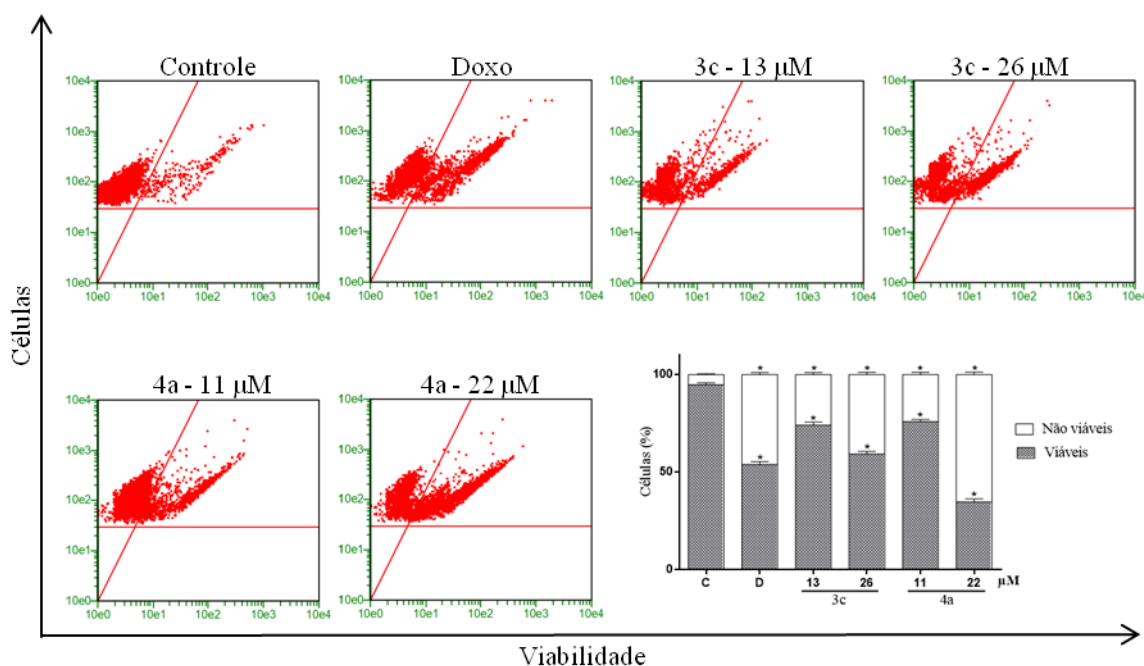
Na literatura há relatos de derivados semicarbazônicos como inibidores de proteínas quinases (LIU et al., 2014; QI et al., 2013; TU et al., 2017; ZHAI et al., 2016;). Isso motivou a realização desse teste que apontou **3c** e **4a** como compostos promissores que merecem serem melhores estudados, sendo os mesmos escolhidos para estudo de possíveis mecanismos de ação.

5.1.3 Detecção da viabilidade celular utilizando o kit Guava ViaCount

Inicialmente, foi determinada a viabilidade das células utilizando o kit *ViaCount*. As concentrações utilizadas nos testes de citometria foram os valores correspondentes a CI_{50} e 2x CI_{50} de 72 h e linhagem escolhida foi HL-60 (leucemia promielocítica).

Os resultados obtidos mostraram que os dois compostos diminuíram a viabilidade celular (Figura 14).

Figura 14. Efeito dos compostos 3c e 4a na viabilidade celular de células HL-60 utilizando o kit ViaCount após 72 h de incubação.



A doxorubicina (Doxo; 0,11 μM) foi usada como padrão. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO; 0,1%). Os valores correspondem à média $\pm$ desvio padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. *, $p < 0,05$ quando comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste Student Newman-Keuls.

O composto **3c** reduziu o número de células viáveis em 26% (13 μM) e 40,8% (26 μM). O derivado **4a** foi mais citotóxico apresentando 65% de células mortas na concentração 22 μM .

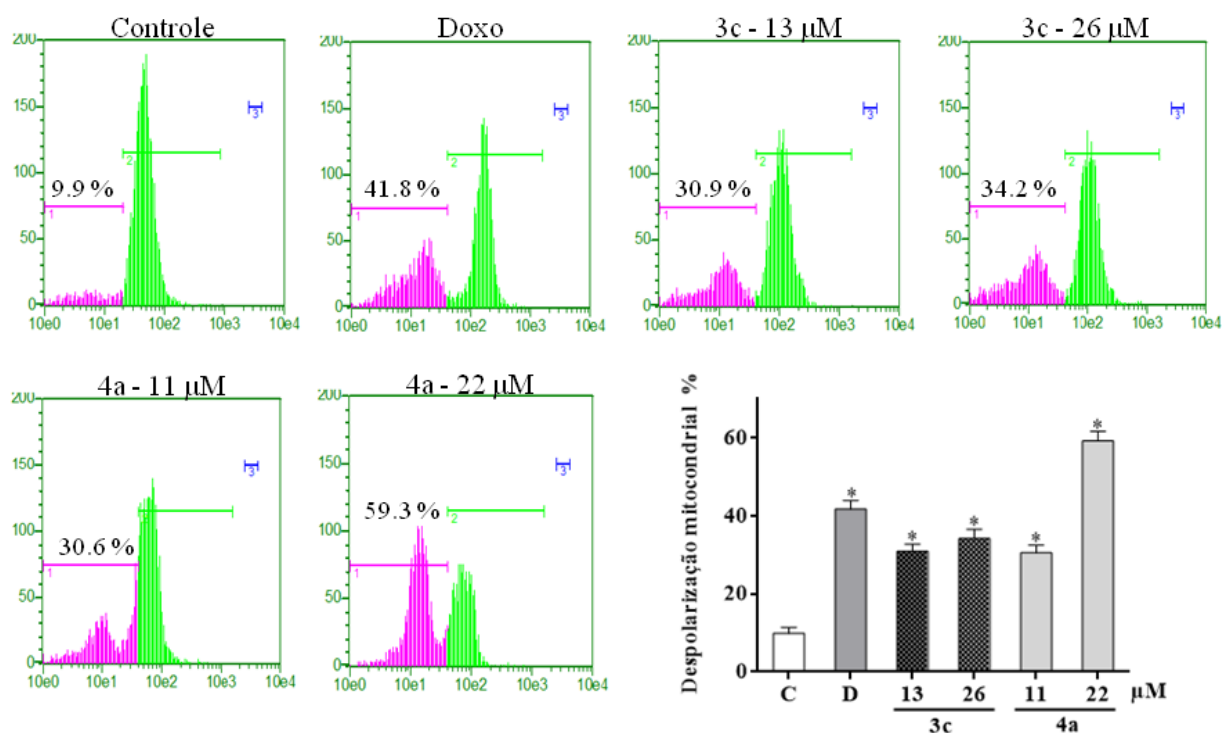
5.1.4 Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$)

As mitocôndrias desempenham um papel essencial na vida e na morte das células, pois são responsáveis pela produção energética necessária para a sobrevivência celular (CHRISTENSEN et al., 2013). O bom desempenho na produção de energia e a integridade das mitocôndrias são garantidos pela manutenção do potencial elétrico mitocondrial (BURKE et al., 2017).

Algumas moléculas atuam induzindo a perda do potencial transmembrânico mitocondrial levando ao processo chamado de depolarização mitocondrial que é um dos eventos iniciais no processo de morte celular por apoptose ativada por via intrínseca (MA et al., 2018).

Nesse sentido, visando avaliar se os compostos (**3c** e **4a**) induzem a apoptose por alteração nas mitocôndrias das células, foi realizado o teste usando o fluorocromo rodamina 123, pois esse é capaz de se acumular nas células com potencial de membrana inalterado (CHEN et al., 2018). Após 72 h de incubação, foi verificado que **3c** e **4a** foram capazes de induzir despolarização mitocondrial nas células HL-60 (Figura 15).

Figura 15. Efeito dos compostos **3c** e **4a** no potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de células HL-60 após 72 horas de incubação.



A doxorubicina (Doxo; 0,11 μM) foi usada como padrão. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO; 0,1%). Nos histogramas, o marcador 1 (rosa) corresponde a porcentagem de células despolarizadas e o marcador 2 (verde) a porcentagem de células não despolarizadas. Os valores correspondem à média $\pm$ desvio padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$ quando comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste Student Newman-Keuls.

As células tratadas com **3c** nas concentrações de 13 e 26 μM apresentaram 30,9% e 34,2% de células despolarizadas, respectivamente. O composto **4a** foi mais ativo e induziu a despolarização em 30,6% e 59,3% das células na concentração de 11 μM e 22 μM , respectivamente. O controle positivo, doxorubicina, apresentou 41,8% de células despolarizadas.

A apoptose é um programa de morte celular vital para vários processos. Um deles é o equilíbrio entre a proliferação e morte celular, imprescindíveis para a manutenção da

homeostase tecidual. Em geral, duas vias de sinalização principais controlam a apoptose, ou seja, via mediada por mitocôndrias ou intrínseca e via mediada por receptor de morte ou extrínseca (SHEIKH et al., 2017).

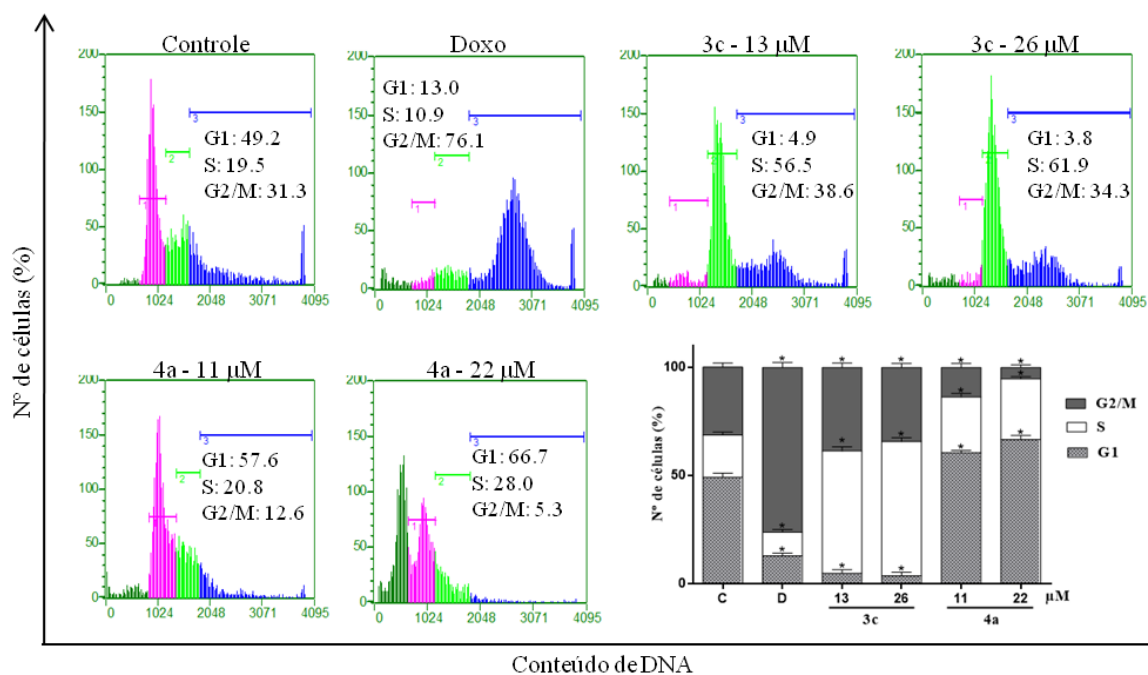
Quando a célula sofre estímulos pró-apoptóticos, como privação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia, ativação de oncogenes, dentre outros, os sinais que são traduzidos se convergem principalmente para mitocôndria provocando o colapso do potencial da membrana mitocondrial interna ($\Delta\psi$) que resulta em uma sequência de eventos que culminam na apoptose (HSU et al., 2018).

Os resultados obtidos neste teste demonstram que os compostos provocam efeitos pró-apoptóticos que induzem a despolarização mitocondrial nas células HL-60.

5.1.5 Ensaio do ciclo celular

Ainda estudando o mecanismo de morte provocado pelos compostos **3c** e **4a** nas células HL-60, foi avaliado o efeito dos compostos na progressão do ciclo celular por citometria de fluxo após coloração com iodeto de propídeo (GE et al., 2017) (Figura 16).

Figura 16. Efeito dos compostos 3c e 4a sobre o ciclo celular das células HL-60 após 72 horas de incubação.



A doxorubicina (Doxo; 0,11μM) foi usada como padrão. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO; 0,1%). Os valores correspondem à média $\pm$ DP de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$ quando comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste Student Newman-Keuls.

Após o período de tratamento com **3c** (13 μ M), observou-se que 56,5% das células estavam na fase S e 38,6% na fase G2/M. Na concentração de 26 μ M essas populações aumentaram para 61,9% na fase S e 34,3% na fase G2/M. Esses resultados indicam que **3c** provoca parada de ciclo nas fases S e G2/M.

O tratamento com **4a** aumentou a população de células na fase G1 em 57,6% (11 μ M) e 66,7% (22 μ M), indicando parada de ciclo na fase G1 também dependente da concentração. No histograma (4a; 22 μ M) é possível visualizar grande número de debris celulares. O quimioterápico doxorrubicina provocou parada em G2/M.

O ciclo celular é o processo pelo qual as células se multiplicam. Este é dividido em quatro fases: G1, S, G2 e M. Para garantir a correta progressão pelo ciclo celular, as células desenvolveram pontos de verificação ou *checkpoints* que são mecanismos de controle que avaliam as condições da célula, antes de iniciar a fase seguinte, assegurando dessa forma, a fidelidade da divisão celular (BRANDMAIER et al., 2017). Nesses pontos de checagem, caso seja necessário, ocorre à interrupção do ciclo e são realizados reparos no DNA, porém, dependendo da eficácia do processo, o ciclo não é completado e a célula é encaminhada para apoptose.

A regulação do ciclo celular é um equilíbrio entre os reguladores positivos que induzem replicação celular e reguladores negativos que impedem a replicação (TUTONE et al., 2017).

Os reguladores positivos são formados por proteínas quinases que atuam em conjunto estimulando a continuidade do ciclo. Estas proteínas são as ciclinas e as cinases dependentes de ciclinas (CDKs). As ciclinas ativam as CDKs formando complexos moleculares CDK-Ciclinas. As cinases ativadas fosforilam moléculas cruciais para que ocorra a divisão celular (SÁNCHEZ-MARTÍNEZ et al., 2015). Na condução do ciclo celular, complexos CDK-Ciclina específicos operam em fases distintas da divisão celular (WHITTAKER et al., 2017). O complexo CDK2-CiclinaA é crucial para a progressão da fase S e transição para fase G2/M (LATIF et al., 2016; SHAO et al., 2013).

No teste de inibição de proteínas quinases foi verificado que **3c** inibe fortemente o complexo CDK2/CiclinaA com valor de CI_{50} igual a 0,53 μ M. Este resultado foi confirmado no teste do ciclo celular, pois o tratamento com **3c** provocou acúmulo de células na fase S.

Os inibidores de cinases dependentes de ciclinas (CKIs) atuam regulando negativamente o ciclo celular, impedindo a replicação. São chamados de supressores tumorais (KOHRMAN et al., 2017). A proteína p53 está entre os supressores tumorais mais estudados, pois sua inativação é uma característica comum nas células cancerígenas. Em células normais,

a p53 é mantida em níveis baixos, através da proteína MDM2 responsável por sua degradação. Porém, quando a célula entra em condições de estresse, como radiação ionizante, instabilidade genômica, danos no DNA, ativação de oncogenes, entre outros (LAZO et al., 2017), a proteína MDM2 é rapidamente degradada e ocorre a estabilização e ativação da proteína p53 que responde a esses estímulos com parada do ciclo celular no checkpoint G1, mecanismos de reparação e apoptose (HUART et al., 2013).

A via MDM2/p53 está alterada em mais de 50% dos cânceres humanos (INUZUKA et al., 2010). De acordo com Huart et al. (2009; 2013), mais de quatrocentas proteínas interagem com a p53 e muitas delas atuam como inibidores. Estudos têm demonstrado que a família caseína quinase 1 (CK1) fosforilam a proteína MDM2 e modulam a interação com p53 em condições diferentes. Inuzuka et al. (2010) observou que em condições normais, as isoformas CK1 δ/ϵ são capazes de fosforilar vários resíduos de serina no domínio ácido da MDM2 que estão envolvidos na degradação da p53, atuando como um regulador negativo dessa proteína. Vários estudos sugerem que a desregulação desses processos celulares contribuem para a oncogênese e que a inibição farmacológica da CK1 pode aumentar os níveis da proteína p53 nas células e induzir a morte celular. Assim, a inibição dessas cinases representam alvos importantes na terapia anticâncer (BIBIAN et al., 2013; CHEONG et al., 2011; MONASTYRSKYI et al., 2018).

O composto **4a** inibiu a atividade das isoformas CK1 δ/ϵ com CI_{50} no valor de 0,76 μ M. Esse resultado pode estar associado à parada de ciclo na fase G1 provocado por **4a** nas células HL-60.

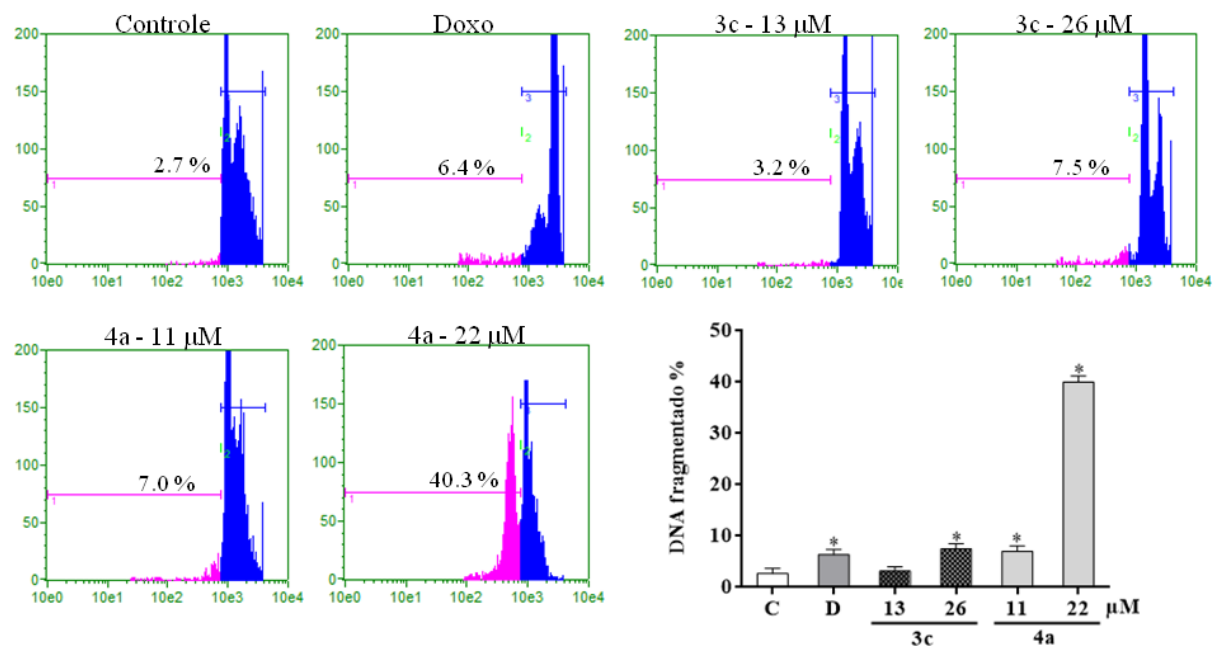
5.1.6 Ensaio de fragmentação do DNA

A morte celular por apoptose é caracterizada por alterações morfológicas marcantes tais como, condensação da cromatina, fragmentação do DNA, *blebbing* da membrana celular e formação de corpos apoptóticos (FADEEL et al., 2005; KERR et al., 1972). A fragmentação do DNA é iniciada após a condensação da cromatina e depende de várias variáveis, como por exemplo, o tempo necessário para a despolarização das mitocôndrias e ativação da cascata das caspases. Em resposta a danos no DNA a proteína p53 é ativada provocando parada de ciclo celular em G1 (JOHN et al., 2014).

Na citometria de fluxo as células apoptóticas com DNA fragmentado podem ser identificadas como a população sub-G1, vista à esquerda do pico G1 (LUO et al., 2014).

Assim, utilizando o fluorocromo iodeto de propídeo e o mesmo princípio do teste de ciclo celular foi realizado ensaio para identificar células HL-60 com DNA fragmentado (Figura 17).

Figura 17. Efeito dos compostos **3c** e **4a** na fragmentação do DNA de células HL-60 após 72 horas de incubação.



A doxorubicina (Doxo, 0,11 μ M) foi usada como padrão. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO) a 0,1%. Os valores correspondem a média $\pm$ desvio padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. *p<0,05 quando comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste Student Newman-Keuls.

O composto **3c** induziu fragmentação em 3,2% e 7,5% das células nas concentrações de 13 μ M e 26 μ M, respectivamente. O composto **4a** induziu a fragmentação em 7,0% e 40,3% das células nas concentrações de 11 e 22 μ M, respectivamente.

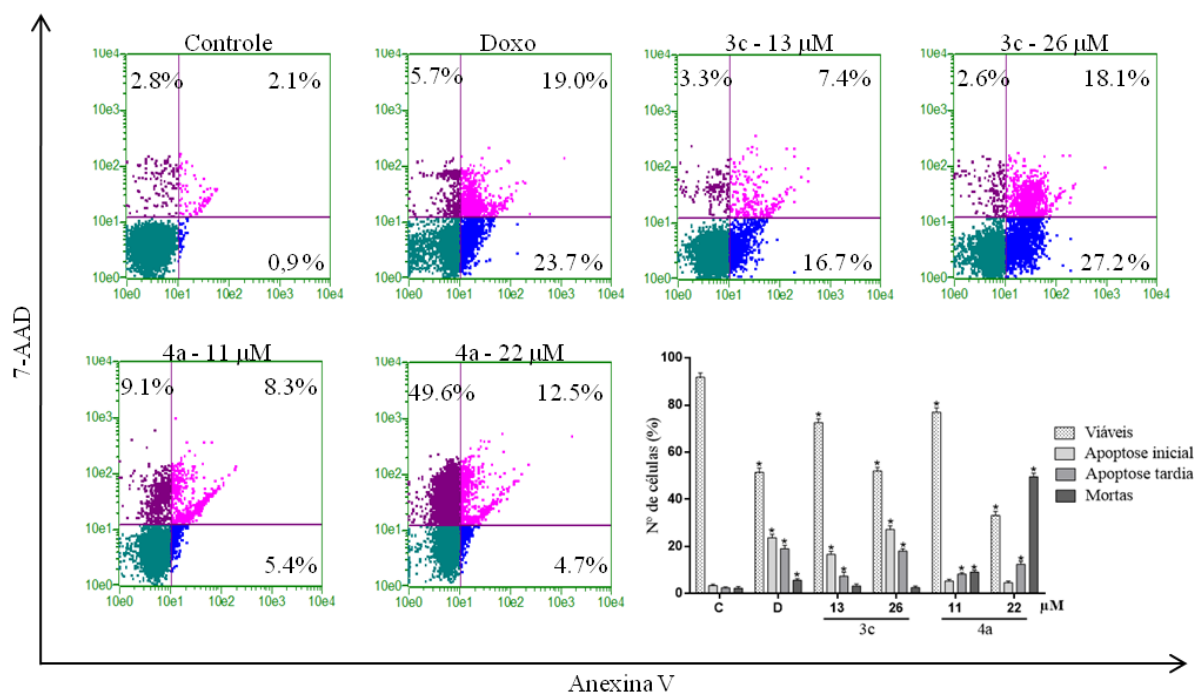
5.1.7 Estudo da indução de morte celular pelo teste da anexina V

A morte celular por apoptose pode ser confirmada por meio do teste da anexina V-FITC/7-AAD. Esse ensaio baseia-se na capacidade da anexina V se ligar com alta afinidade a fosfatidilserina que é translocada para membrana externa de células apoptóticas e o corante 7-AAD se ligar ao DNA de células com perda da integridade de membrana. Assim, é possível identificar quatro populações distintas: células viáveis [Anexina V (-) e 7-AAD (-)], células em apoptose inicial [Anexina V (+) e 7-AAD (-)], células em apoptose tardia [Anexina V (+) e 7-AAD (+)].

e 7-AAD (+)] e células mortas [Anexina V (-) e 7-AAD (+)] (GU et al., 2017; ZHANG et al., 2016).

As células HL-60 foram submetidas a esse ensaio após 72 h de tratamento com os compostos **3c** e **4a** (Figura 18).

Figura 18. Efeito dos compostos **3c** e **4a** sobre a indução de morte das células HL-60 após 72 horas de incubação.



A doxorrubicina (Doxo; 0,11μM) foi usada como padrão. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO) a 0,1%. Os valores correspondem a média ± desvio padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. *, p<0,05 quando comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste Student Newman-Keuls.

Após tratamento das células HL-60 com **3c** (13 e 26 μM), observou-se que 16,7 e 27,2% estavam em apoptose inicial e 7,4 e 18,1% em apoptose tardia, respectivamente. O tratamento com **4a** induziu a morte celular, principalmente na concentração de 22 μM onde 49,6 % das células estavam nessa condição. No tratamento com a doxorrubicina, 23,7% das células estavam em apoptose inicial e 19% em apoptose tardia.

Na morte celular por apoptose, a célula sofre alterações morfológicas marcantes e coordenadas. Inicialmente, a membrana plasmática celular permanece íntegra, mas sofre alterações estruturais, como a distribuição de fosfatidilserina na camada externa da membrana, que é um sinalizador para o reconhecimento pelos fagócitos. Deste modo, a célula morta é rapidamente fagocitada por macrófagos e removida sem que haja extravasamento do conteúdo citoplasmático (LUI et al., 2018).

A principal via de morte causada pelo composto **3c** foi a apoptose e todos os testes confirmam isso. Isso provavelmente ocorreu devido a sua forte inibição de proteínas quinases, que provocam parada de ciclo e emitem sinais pró-apoptóticos que levam ao colapso do potencial de membrana mitocondrial, culminando na apoptose (DAS et al., 2016).

O composto **4a** na maior concentração (22 μ M) induziu a morte na maioria das células e provocou fragmentação do DNA. A molécula **4a** é um nitrocomposto e o efeito provocado pode está associado ao mecanismo de ação desta classe de substâncias que está relacionado com a redução do grupo nitro, resultando em espécies reativas que interagem com a membrana plasmática das células e com biomoléculas essenciais, causando o efeito citotóxico. Os radicais formados também interagem com o DNA, inibindo a síntese de ácidos nucleicos e provocando rupturas na cadeia simples e dupla da fita de DNA. Os nitrocompostos são de grande interesse para tratar tumores sólidos com áreas de hipóxia, pois em baixas concentrações de oxigênio sofrem biorredução e liberam radicais livres tóxicos para células hipóxicas, assim, esses compostos têm sido estudados visando encontrar medicamentos antineoplásicos mais seletivos (ANDRADE et al., 2016).

5.2 Resultados referentes aos derivados aril-tiossemicarbazônicos

5.2.1 Resultados *in vitro*

5.2.1.1 Avaliação da atividade citotóxica dos derivados aril-tiossemicarbazônicos em células tumorais humanas

A atividade citotóxica dos derivados aril-tiossemicarbazônicos foi realizada pelo teste do MTT após 72 horas de incubação. Foram testados 11 compostos desta série frente a 6 linhagens de diferentes tipos histológicos. Inicialmente, todos os compostos passaram por uma triagem onde foi determinado o percentual de inibição no crescimento celular de cada linhagem frente a uma concentração única de 25 µg/mL (Tabela 6).

Os compostos que apresentaram atividade citotóxica maior que 75% em pelo menos 3 linhagens, passaram para fase seguinte, onde foi a determinação da CI_{50} .

Tabela 6: Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) dos derivados aril-tiossemicarbazônicos na concentração de 25 µg/mL frente a linhagens tumorais após 72 h de incubação.

	Linhagens celulares (IC% ± DP)					
	K562	HL-60	HEp-2	NCI-H292	HT29	MCF-7
TS01	76,7 ± 0,9	78,8 ± 5,3	67,7 ± 2,8	70,1 ± 0,3	76,6 ± 2,4	70,4 ± 1,2
TS02	75,6 ± 0,7	77,2 ± 2,9	89,7 ± 0,4	79,8 ± 2,7	75,7 ± 0,6	85,2 ± 2,1
TS03	48,9 ± 4,0	37,8 ± 2,3	44,3 ± 2,8	23,9 ± 3,9	35,3 ± 1,0	43,0 ± 3,1
TS04	99,4 ± 1,7	99,8 ± 1,4	97,2 ± 3,6	99,8 ± 2,7	98,4 ± 2,9	97,4 ± 4,2
TS05	50,3 ± 2,7	47,9 ± 3,1	51,1 ± 2,6	34,5 ± 0,1	36,1 ± 2,5	26,5 ± 2,5
TS06	87,0 ± 2,8	89,8 ± 3,1	81,3 ± 6,7	87,3 ± 2,0	84,4 ± 1,0	78,0 ± 3,4
TS07	89,3 ± 5,2	73,1 ± 3,5	59,2 ± 3,9	85,3 ± 6,7	21,5 ± 1,1	89,9 ± 3,4
TS08	55,0 ± 2,5	51,3 ± 2,4	28,0 ± 0,6	16,0 ± 2,1	46,8 ± 0,3	48,1 ± 4,1
TS09	33,7 ± 1,7	56,0 ± 4,9	26,9 ± 0,8	53,3 ± 3,3	49,9 ± 3,3	48,9 ± 0,7
TS10	79,2 ± 2,0	91,5 ± 0,1	76,1 ± 4,5	76,5 ± 3,3	90,0 ± 2,1	88,3 ± 6,4
TS11	10,0 ± 0,1	29,0 ± 2,0	33,0 ± 0,8	29,0 ± 1,3	14,0 ± 1,2	23,0 ± 1,9

Os valores correspondem à média ± desvio padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata.

Após os testes iniciais, seis compostos foram selecionados e tiveram as suas CI_{50} determinadas, conforme mostrado na Tabela 7.

Tabela 7: CI_{50} dos derivados aril-tiossemicarbazônicos em linhagens de células tumorais realizada pelo teste do MTT, após 72 h de incubação.

	CI_{50} (μM)					
	K562	HL-60	HEp-2	NCI-H292	HT-29	MCF-7
TS01	32,44 $\pm$ 3,08	37,77 $\pm$ 3,21	> 111,11	> 111,11	34,66 $\pm$ 3,14	> 111,11
TS02	22,97 $\pm$ 2,03	9,67 $\pm$ 0,89	10,88 $\pm$ 0,99	33,85 $\pm$ 3,15	42,31 $\pm$ 3,87	15,71 $\pm$ 1,23
TS04	3,22 $\pm$ 0,28	1,91 $\pm$ 0,17	3,10 $\pm$ 0,28	5,09 $\pm$ 0,46	7,64 $\pm$ 0,68	5,09 $\pm$ 0,51
TS06	14,33 $\pm$ 1,22	5,03 $\pm$ 0,43	15,88 $\pm$ 1,37	6,58 $\pm$ 0,61	6,58 $\pm$ 5,8	26,72 $\pm$ 2,55
TS07	27,37 $\pm$ 1,83	> 96,40	> 96,40	21,97	> 96,40	13,49 $\pm$ 0,98
TS10	10,54 $\pm$ 0,92	2,63 $\pm$ 0,18	21,09 $\pm$ 2,02	22,98 $\pm$ 1,74	12,43 $\pm$ 1,08	15,44 $\pm$ 1,11
Doxo ^a	1,47 $\pm$ 0,09	0,11 $\pm$ 0,01	1,28 $\pm$ 0,13	0,18 $\pm$ 0,03	0,73 $\pm$ 0,09	0,20 $\pm$ 0,03

Os dados são expressos como média $\pm$ DP de três experimentos diferentes realizados em triplicata.

^a Doxo (doxorubicina) foi usada como controle positivo.

Os valores de CI_{50} dos derivados aril-tiossemicarbazônicos ficaram entre 1,91 – 42,31 μM . A atividade citotóxica dos compostos teve variação de acordo com o anel aromático presente na estrutura e os substituintes do anel. Sendo assim, o composto TS03 que possui hidroxila na posição 4, não apresentou atividade, porém, a adição do radical metoxi (CH_3O-) na posição 3 conferiu ao composto TS01 atividade frente as linhagens K562, HL-60 e HT-29.

O composto TS06 que tem um átomo de bromo na posição não apresentou atividade citotóxica. Já o composto dissustituído 3,4 dicloro (TS02) apresentou atividade frente a todas as linhagens testadas.

A presença do anel piridina (TS05 e TS11) ou anel furano (TS08 e TS09) não atribuiu atividade citotóxica a esses compostos.

O composto TS04 apresentou a maior atividade citotóxica. Esse composto possui um radical terc-butil ($-C_4H_9$) na posição 4 que confere aumento da lipossolubilidade e melhor transporte pelas membranas celulares, além de, provavelmente se encaixar melhor nos receptores biológicos, devido a sua estrutura. Essas características devem estar associadas a excelente atividade citotóxica desse composto.

As propriedades biológicas de um composto estão relacionadas com sua estrutura química e pequenas variações estruturais podem implicar em grandes alterações na resposta biológica. Isso ocorre porque para produzir o efeito biológico a maioria dos fármacos precisam interagir com uma determinada biomacromolécula específica, chamado receptor ou biorreceptor. O reconhecimento molecular dos fármacos pelo receptor é dependente da estrutura do fármaco, incluindo o arranjo dos seus grupamentos funcionais, que devem ser

complementares ao sítio de ligação localizado na macromolécula (sítio receptor). Além disso, a interação fármaco-receptor depende de forças químicas que se estabelecem entre os dois. A intensidade dessas forças é proporcional à intensidade da resposta farmacológica, dessa forma, a polaridade de grupos substituintes ou funções químicas desempenham papel preponderante nesta interação (PAN et al., 2013).

O primeiro passo para o desenvolvimento de melhores tratamentos para a cura do câncer é a seleção de compostos através de boas estratégias de teste, assim, os modelos pré-clínicos devem ser bem empregados para identificar os melhores candidatos a medicamentos. Nesse contexto, o teste do MTT é um ensaio pré-clínico *in vitro* amplamente descrito na literatura por milhares de artigos publicados. Na realização desse ensaio os compostos em estudo são expostos a uma variedade de células cancerígenas com a finalidade de determinar a citotoxicidade do composto frente às linhagens testadas (LÓPEZ-LÁZARO, 2015; SKEHAN et al., 1990).

No *screening* inicial realizado com os novos derivados aril-tiossemicarbazônicos, o derivado TS04 se destacou com os melhores resultados e, por isso, foi o escolhido para dar continuidade nos testes. As linhagens escolhidas foram K562 e NCI-H292 por terem apresentado notável sensibilidade frente a esse composto.

Nesse seguimento, após a realização do teste de citotoxicidade de 72 h, foi realizado um novo teste de 48 h com o composto selecionado frente às linhagens escolhidas a fim de determinar a concentração que seria utilizada nos ensaios posteriores. Em todos os ensaios a doxorrubicina foi utilizada como padrão (Tabela 8).

Tabela 8: CI_{50} do composto TS04 nas linhagens de células tumorais K562 e NCI-H292, após 48 h de incubação.

	CI_{50} (μM)	
	K562	NCI-H292
TS04	$16,57 \pm 1,47$	$18,27 \pm 1,72$
Doxo ^a	$0,47 \pm 0,04$	$0,58 \pm 0,06$

Os dados são expressos como média $\pm$ DP de três experimentos diferentes realizados em triplicata.

^a Doxo (doxorrubicina) foi usada como controle positivo.

As concentrações utilizadas nos testes posteriores foram escolhidas com base na CI_{50} de 48 h identificada para as duas linhagens. Dessa forma, as concentrações selecionadas foram: CI_{50} (17 μM) e 2x CI_{50} (34 μM).

5.2.1.2 Citotoxicidade em células mononucleadas do sangue periférico

Para determinar a seletividade do composto TS04 para as células de câncer, foi realizado ensaio de citotoxicidade frente a células mononucleadas do sangue periférico humano. O ensaio foi realizado após 72 h de incubação do composto TS04 com as células. A CI_{50} encontrada foi 59,91 μM , com intervalo de confiança variando entre 44,61 – 79,88 μM .

A doxorubicina foi utilizada como padrão e apresentou CI_{50} de 5,33 μM , com intervalo de confiança variando entre 4,23 – 6,8 μM . A Tabela 9 apresenta os valores do índice de seletividade obtidos no ensaio.

Tabela 9: Índice de seletividade (IS) do composto TS04 para células de câncer em relação a Células Mononucleadas de Sangue Periférico Humano (CMSPH)

Linhagens de células tumorais	IS* em CMSPH
	TS04
K562	18,5
HL-60	31,3
HEp-2	19,3
NCI-H292	11,7
HT-29	7,8
MCF-7	11,7

*IS (Índice de seletividade) = CI_{50} para as CMSPH / CI_{50} para célula de câncer.

Nos resultados apresentados, o composto TS04 foi consideravelmente mais citotóxico para as células de câncer.

Esses resultados estão de acordo com Oliveira et al., (2008) que sintetizaram derivados tiossemicarbazônicos com a finalidade de avaliar a atividade antimalárica e citotoxicidade em CMSPH. Os compostos apresentaram boa atividade antimalárica e não provocou efeitos citotóxicos significativos nas células normais humanas.

Os agentes quimioterápicos utilizados para tratar o câncer possuem severos efeitos colaterais, pois atingem as células cancerígenas e as células saudáveis, portanto, tratamentos mais seletivos são cruciais para diminuir a toxicidade e aumentar o sucesso da quimioterapia (WANI et al., 2016).

Nesse sentido, o teste que determina o índice de seletividade (IS) expressa o índice de segurança do composto. Quanto maior for o valor do IS, mais seletivo é o composto para a

célula de câncer. Para composto puro o IS é considerado significativo quando seu valor é ≥ 2.0 (BADISA et al., 2009; CHUPRAJOB et al., 2014).

O composto TS04 apresentou IS variando entre 2,7 – 31,3. Dessa forma, esse composto apresentou valores de seletividade significativos para todas as linhagens testadas podendo ser considerado promissor e qualificado para testes mais detalhados.

5.2.1.3 Determinação da atividade hemolítica em eritrócitos humanos

O composto TS04 não foi capaz de causar lise dos eritrócitos nas concentrações testadas até 250 $\mu\text{g/mL}$, portanto a CE_{50} (concentração média capaz de provocar 50 % do efeito máximo) $> 250 \mu\text{g/mL}$.

Esse ensaio foi realizado visando avaliar a capacidade que esse composto tem de provocar danos nas membranas de eritrócitos humanos, uma vez que, a ruptura de eritrócitos é uma barreira para implantação dos ensaios *in vivo* (PIETKIEWICZ et al., 2010).

O composto não provocou ruptura na membrana dos eritrócitos em uma concentração 10 vezes maior que a utilizada nos ensaios com linhagens de câncer, dessa maneira, esse resultado sugere que o efeito citotóxico nas células cancerígenas independe de dano específico provocado na membrana plasmática.

Após a triagem dos derivados aril-tiossemicarbazônicos, o composto TS04 foi o que apresentou o menor valor de CI_{50} para as linhagens tumorais, como também, boa seletividade para essas células em relação a células saudáveis. Diante disso, esse composto foi eleito para dar continuidade aos testes visando elucidar o mecanismo de morte provocado nas linhagens K652 e NCI-H292.

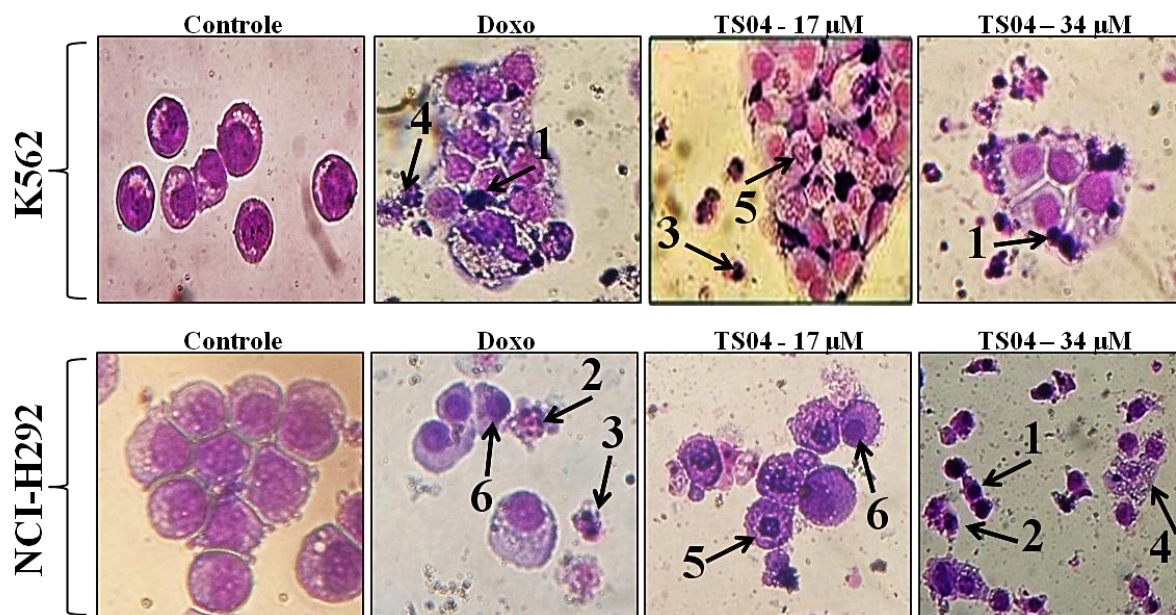
5.2.1.4 Avaliação morfológica

Os resultados mostraram que o composto TS04 foi capaz de alterar a morfologia das células K562 e NCI-H292.

Após o período de incubação, as células K562 e NCI-H292 não tratadas (controle negativo) estavam com morfologia típica de células não aderidas e aderidas, respectivamente. As duas linhagens apresentaram membrana íntegra, citoplasma homogêneo e nítida visualização da membrana plasmática e nuclear. As células das duas linhagens tratadas com a doxorrubicina apresentaram fragmentação nuclear, presença de corpos apoptóticos, núcleos picnóticos e restos celulares (Figura 19).

As células das duas linhagens tratadas com o composto TS04 apresentaram corpos apoptóticos, fragmentação nuclear, núcleos condensados e redução do volume celular. Além dessas alterações, a concentração 17 μM apresentou várias figuras mitóticas e a concentração 34 μM apresentou um estado mais avançado de deterioração celular (Figura 19).

Figura 19: Análise morfológica das células K562 e NCI-H292 após 48 h de incubação, coradas pelo kit panótico rápido e visualizadas por microscopia óptica (400x).



As células do controle negativo foram tratadas apenas com o veículo utilizado para diluição dos compostos (DMSO) a 0,1%. O quimioterápico doxorubicina foi usado como padrão nas concentrações 0,47 μM e 0,58 μM para as linhagens K562 e NCI-H292, respectivamente. Os numerais indicam os processos observados: 1- picnose, 2- fragmentação nuclear, 3- corpos apoptóticos, 4- resto celular, 5- célula em mitose e 6- núcleo condensado.

As alterações morfológicas foram analisadas a fim de investigar o tipo de morte relacionado com a citotoxicidade do composto nas linhagens K562 e NCI-H292 e as características observadas são típicas de processos apoptóticos.

A apoptose é um mecanismo necessário para preservar a homeostase do organismo, sendo muito importante para eliminar células supérfluas ou defeituosas. O processo apoptótico ocorre quando a célula recebe estímulos pró-apoptóticos que dá início a uma sequência de eventos morfológicos e bioquímicos bem definidos. Nesses eventos ocorrem desagregação da membrana nuclear, condensação da cromatina, reorganização do citoesqueleto, perda de adesão celular e formação de corpos apoptóticos. Os corpos

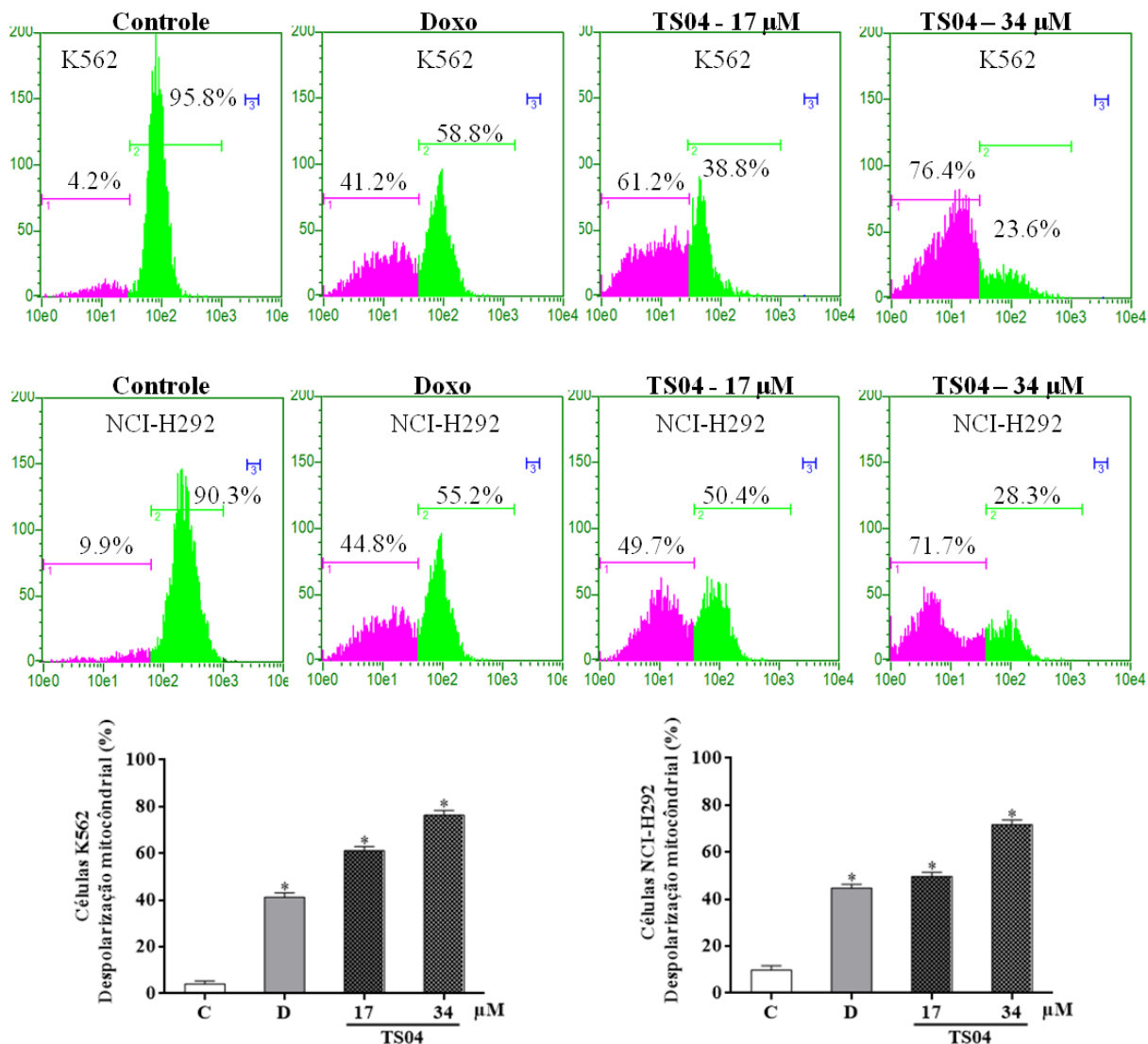
apoptóticos expõem para o lado externo da membrana plasmática fosfolipídios que emitem sinais para serem fagocitados por macrófagos (CHAABANE et al., 2013).

A evasão dos processos de morte celular endógenos, incluindo a apoptose, representa uma das características do câncer. As células pré-malignas acumulam defeitos nos mecanismos fisiológicos da apoptose que contribuem para a expansão da célula patológica e para o desenvolvimento e progressão do câncer (ZIVNY et al., 2010). Diante disso, a apoptose é uma estratégia muito estudada visando induzir a morte das células cancerígenas.

5.2.1.5 Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial

As mitocôndrias são compartimentos celulares responsáveis pela produção energética necessária para a sobrevivência celular e estão envolvidas no processo de morte por apoptose. Nos resultados encontrados o composto TS04 provocou danos que resultou na despolarização mitocondrial das células K562 e NCI-H292. Os resultados foram mais expressivos na linhagem K562 (Figura 20).

Figura 20: Análise da variação do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de células K562 e NCI-H292 determinado por citometria de fluxo usando rodamina 123 após 48 horas de incubação com o composto TS04.



O controle negativo foi tratado apenas com o veículo utilizado para diluição dos compostos (DMSO) a 0,1%. A doxorubicina foi usada como padrão nas concentrações 0,47 μ M e 0,58 μ M para as linhagens K562 e NCI-H292, respectivamente. Nos histogramas, o marcador 1 (rosa) corresponde a porcentagem de células despolarizadas e o marcador 2 (verde) a porcentagem de células não despolarizadas. Os valores correspondem à média $\pm$ desvio padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento. *, $p < 0,05$ quando comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste Student Newman-Keuls.

Kalaivani e colaboradores (2014) sintetizaram e caracterizaram uma série de quatro compostos tiossemicarbazônicos. Os novos compostos foram testados *in vitro* contra a linhagem celular adenocarcinoma do pulmão humano (A549). Os resultados demonstraram elevada citotoxicidade e todos os compostos foram avaliados nos testes subsequentes. No

ensaio para avaliar a indução da apoptose através a via mitocondrial, todos os compostos foram altamente catastróficos para a membrana mitocondrial promovendo a despolarização.

O colapso do potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\psi$) promove a Transição da Permeabilidade Mitocondrial (TPM). A TPM é um evento crítico na morte celular e está envolvido no mecanismo de disfunção da mitocôndria resultando na apoptose. A TPM é caracterizada pela abertura de poros não seletivos na membrana mitocondrial que permite a passagem livre de íons, solutos e moléculas de baixo peso molecular (1500 Dalton) para dentro da membrana mitocondrial. Esse evento leva à perda da homeostase celular, bloqueia a síntese de ATP e aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que levam à oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, além de contribuir para a ativação das caspases 9 e 3. O desarranjo mitocondrial também pode facilitar a liberação de citocromo c para o citoplasma, onde o mesmo forma complexo com o fator de ativação associado à apoptose-1 (APAF-1) e caspase 9, o chamado apoptossomo, que promove a clivagem da pró-caspase 9, liberando a caspase 9 ativa, que é capaz de ativar a caspase 3 e provocar a apoptose (GIORGIO et al., 2018).

5.2.1.6 Estudo do ciclo celular por citometria de fluxo

O ciclo celular é um processo ordenado e rigorosamente regulado. Para garantir a correta progressão em cada fase, as células desenvolveram uma série de pontos de controle ou checkpoints que são regulados por diferentes proteínas quinases. Essas proteínas desempenham papéis críticos que quando bem executados, asseguram a formação correta das células filhas. Alterações na expressão das proteínas reguladoras do ciclo celular produzindo um controle ineficaz resultam em respostas aberrantes e está associada à proliferação de células tumorais (BRANDMAIER et al., 2017). Em razão disso, é importante o desenvolvimento de agentes anticâncer que tenham atuação nas vias do ciclo celular interferindo o processo mitótico das células tumorais.

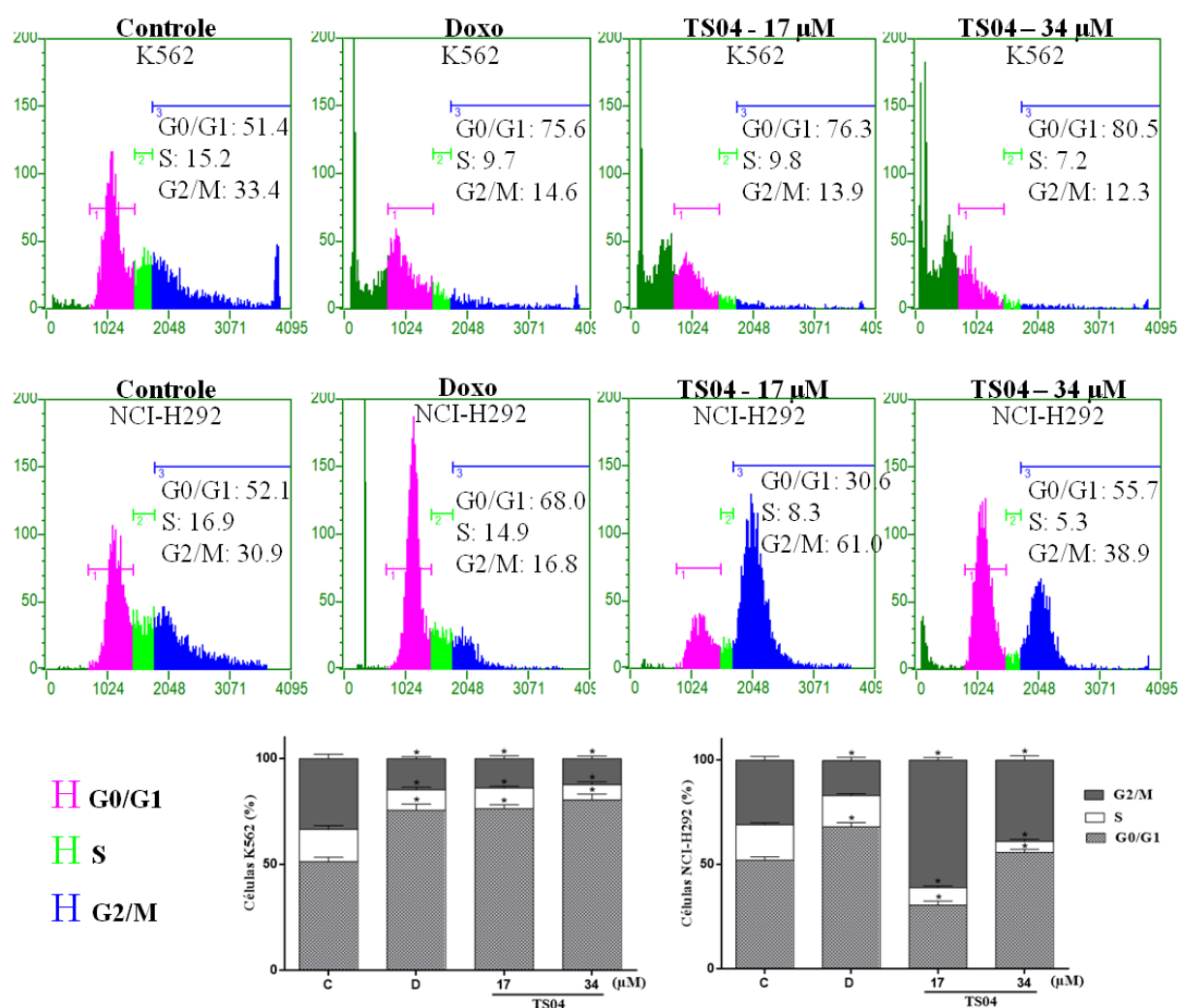
No ensaio para analisar a progressão do ciclo celular foi verificado que o derivado TS04 provocou parada nas duas linhagens testadas (Figura 21).

Na linhagem K562 houve parada em G0/G1 e foi observado nos histogramas grande quantidade de debris celulares.

Na linhagem NCI-H292 tratada com o composto TS04 na concentração de 17 μM houve parada em G2/M, enquanto que as células tratadas com a concentração 34 μM apresentaram um comportamento diferente. Comparando os resultados das concentrações 17

μM e $34 \mu\text{M}$, foi observado que na concentração de $34 \mu\text{M}$ houve um aumento da população de células em G0/G1 e diminuição da população G2/M. No histograma foi possível visualizar duas populações distintas e delimitadas nas fases G0/G1 e G2/M com uma menor população na fase S. Esses resultados indicam que na linhagem NCI-H292 ($34 \mu\text{M}$), o composto TS04 provoca parada em G0/G1 e G2/M.

Figura 21: Efeito do composto TS04 sobre as fases do ciclo celular de células K562 e NCI-H292 determinado por citometria de fluxo após 48 horas de incubação.



O controle negativo foi tratado apenas com o veículo utilizado para diluição dos compostos (DMSO) a 0,1%. A doxorubicina foi usada como padrão nas concentrações $0,47 \mu\text{M}$ e $0,58 \mu\text{M}$ para as linhagens K562 e NCI-H292, respectivamente. Os valores correspondem à média $\pm$ desvio padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento. *, $p < 0,05$ quando comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste Student Newman-Keuls.

Bisceglie e colaboradores (2014) sintetizaram seis derivados tiossemicarbazônicos e testaram *in vitro* frente à linhagem U937. Os resultados demonstraram que os compostos

alteraram a distribuição das células nas fases do ciclo celular. Os testes foram realizados nos tempos de 6, 12, 24 e 48 h e os diferentes períodos de incubação influenciaram na resposta sobre o ciclo celular. Além disso, todos os derivados provocaram fragmentação do DNA indicando indução da apoptose nas células tratadas.

Para confirmar essa hipótese, os autores realizaram o teste da anexina V com as células U937 após o período de tratamento de 6, 12, 24 e 48 h com os derivados. Nos resultados apresentados, foram observados que no período de incubação de 12 h as células estavam em apoptose inicial. Já nos períodos de 24 e 48 h, as células estavam em apoptose tardia e necrose, processos mais avançados de morte celular.

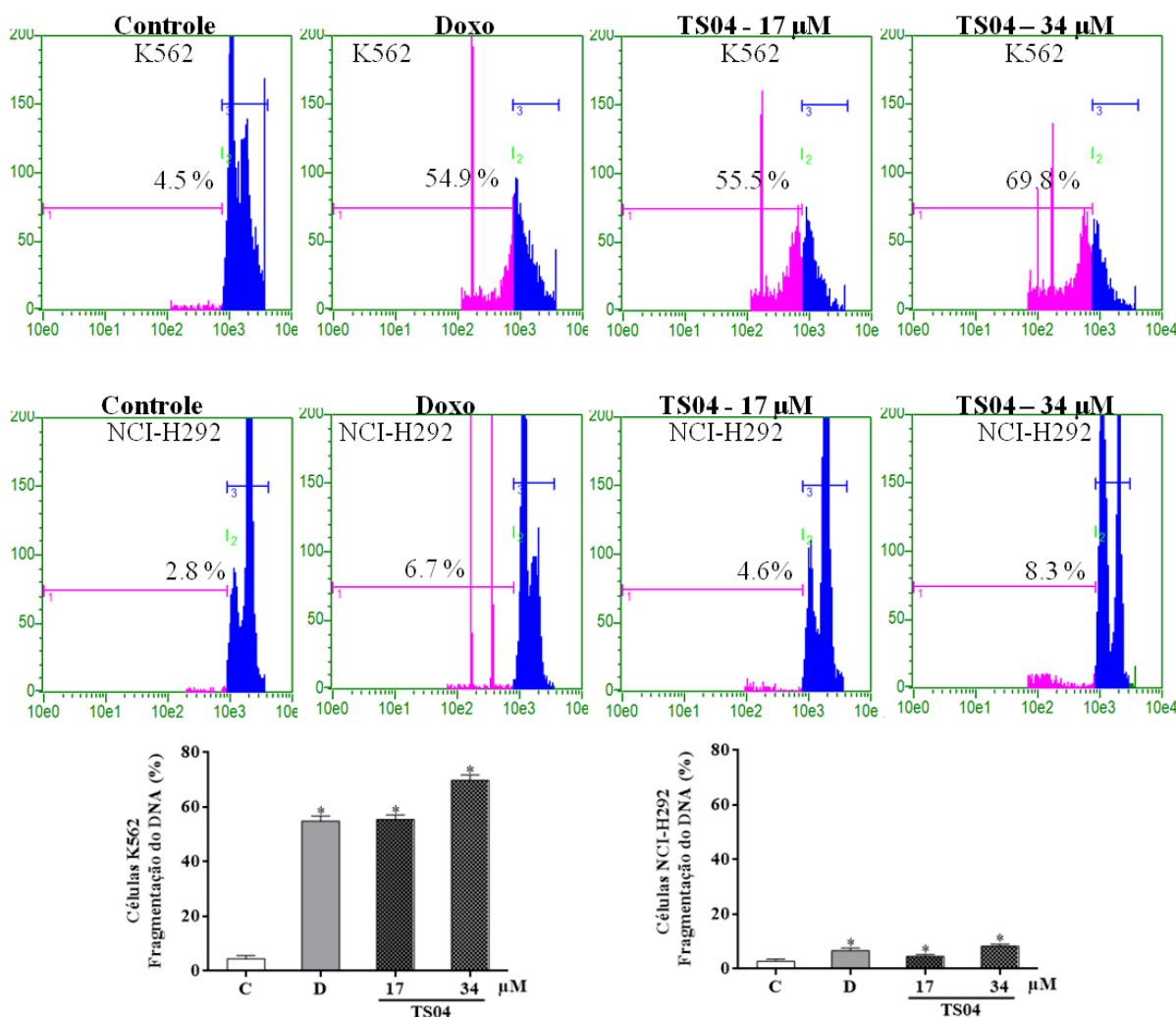
Em 2017, Oliveira e colaboradores sintetizaram e avaliaram a atividade anticâncer *in vitro* de derivados tiossemicarbazônicos e tiazolidinonas. Um derivado tiossemicarbazônico foi o mais promissor e por isso, foi escolhido para análise do ciclo celular e estudo do mecanismo de morte. O composto induziu parada do ciclo em G2/M e o resultado foi semelhante ao encontrado para a colchicina, controle positivo do ensaio.

5.2.1.7 Estudo da fragmentação do DNA por citometria de fluxo

A população de células com DNA fragmentado incorpora menor quantidade de iodeto de propídeo e, portanto, emitem menor fluorescência sendo visualizadas no histograma como população sub-G1, vista a esquerda do pico G1.

A Figura 22 mostra o percentual de células K562 e NCI-H292 com DNA fragmentado, após o tratamento com o composto TS04. As duas linhagens apresentaram fragmentação do DNA, porém os resultados foram mais expressivos na linhagem K562 (34 μ M), onde quase 70% das células estavam com DNA fragmentado.

Figura 22: Efeito do composto TS04 sobre a fragmentação do DNA das células K562 e NCI-H292 determinado por citometria de fluxo após 48 horas de incubação



O controle negativo foi tratado apenas com o veículo utilizado para diluição dos compostos (DMSO) a 0,1%. A doxorubicina foi usada como padrão nas concentrações 0,47 μ M e 0,58 μ M para as linhagens K562 e NCI-H292, respectivamente. Os valores correspondem à média $\pm$ desvio padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento. *, $p < 0,05$ quando comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste Student Newman-Keuls.

Uma das características bioquímicas da apoptose é a clivagem do DNA cromossômico por uma endonuclease que fragmenta a cromatina em unidades nucleossômicas. A fragmentação do DNA ocorre em resposta a vários estímulos apoptóticos e em uma ampla variedade de tipos de células. Determinar se existe fragmentação do DNA em uma população de células pode fornecer informações sobre o tipo de morte celular que está ocorrendo e as possíveis vias ativadas no processo de morte (LUO et al., 2014).

A fragmentação do DNA por endonucleases ou a indução de danos no DNA por algum agente induz parada de ciclo celular na fase G0/G1 (JOHN et al., 2014). Os resultados encontrados nesse estudo estão em conformidade com essa afirmação, visto que, os resultados mais expressivos de DNA fragmentado foram encontrados na linhagem K562, a mesma linhagem que apresentou parada na fase G0/G1 no ensaio do ciclo celular.

Balachandran e colaboradores (2018) sintetizaram três novos compostos tiosemicarbazônicos e avaliaram suas propriedades citotóxicas contra um painel de quatro linhagens de câncer. O composto mais citotóxico foi selecionado para estudo do padrão de morte. Nos resultados encontrados, o composto induziu parada na fase G1 do ciclo celular, reduziu a expressão da Bcl-2, aumentou a expressão da Bax e provocou clivagem do DNA.

5.2.1.8 Avaliação do padrão de morte celular por externalização da fosfatidilserina – Teste da Anexina-V

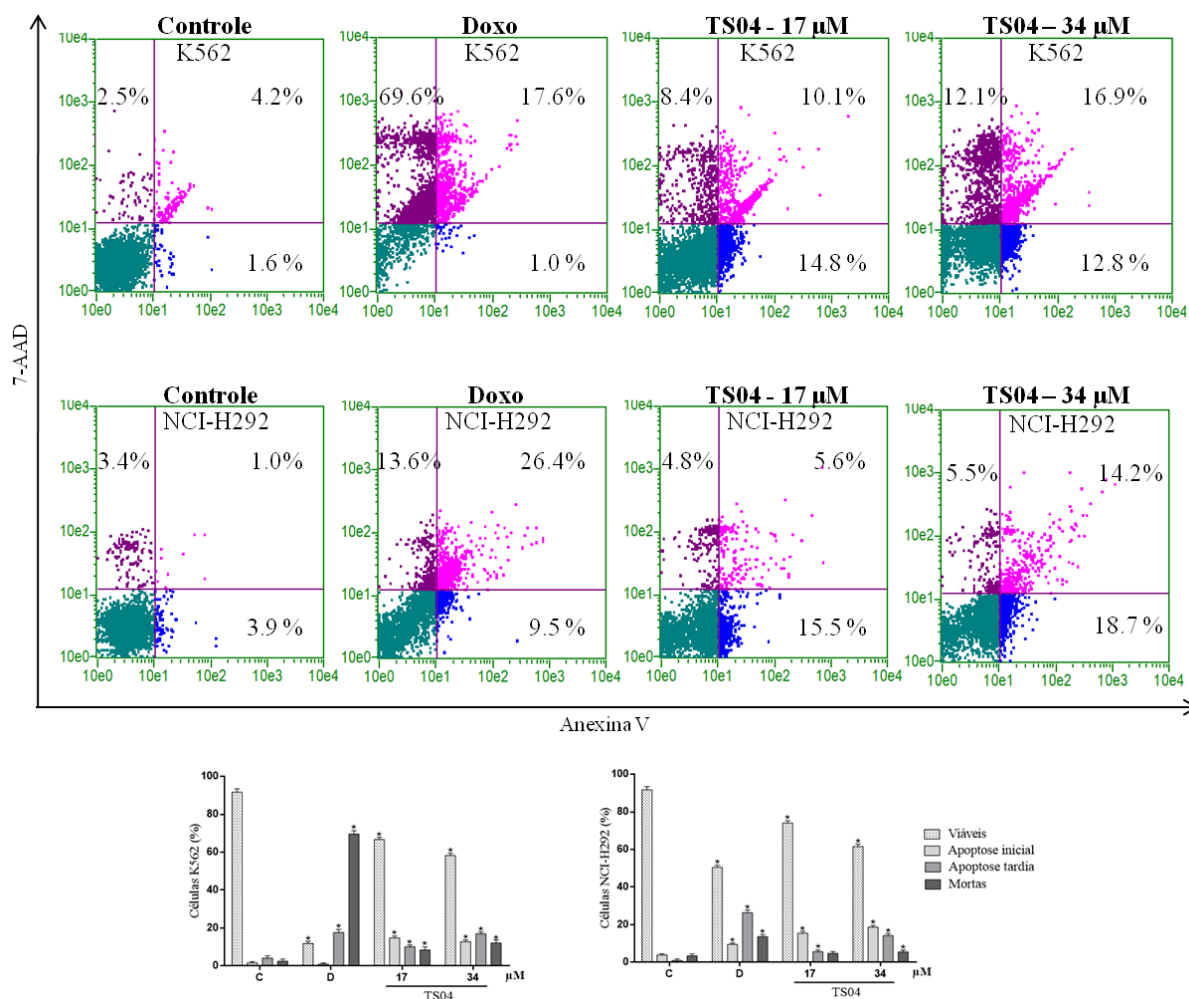
Após o período de incubação, o composto TS04 induziu morte celular e efeitos apoptóticos nas células K562 e NCI-H292 (Figura 23).

Na linhagem K562 houve aumento no número de células mortas e esse resultado condiz ao encontrado no ensaio de ciclo celular, onde é possível visualizar grande formação de debris celulares. Houve também aumento da população de células em apoptose inicial e tardia, esse resultado está de acordo com os encontrados nas análises morfológicas onde foram visualizados numerosos corpos apoptóticos.

Na linhagem NCI-H292 houve aumento dependente da concentração da população de células em apoptose.

O padrão doxorrubicina apresentou elevado número de células em apoptose tardia e mortas.

Figura 23: Efeito do composto TS04 sobre a indução de morte das células K562 e NCI-H292 após 48 h de incubação



O controle negativo foi tratado apenas com o veículo utilizado para diluição dos compostos (DMSO) a 0,1%. A doxorubicina foi usada como padrão nas concentrações 0,47 µM e 0,58 µM para as linhagens K562 e NCI-H292, respectivamente. Os valores correspondem à média $\pm$ desvio padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento. *, $p < 0,05$ quando comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste Student Newman-Keuls.

Pessoto et al. (2015) demonstrou pelo teste da anexina V que cinco derivados tiossemicarbazônicos foram capazes de desencadear a morte e induzir apoptose em células K562. O efeito foi dependente da concentração e em todos os compostos, as concentrações mais altas resultaram no aumento das populações em apoptose tardia e mortas. Esses resultados foram relacionados à perda do perfil bioenergético mitocondrial e fragmentação do DNA provocado pelos compostos nas células K562.

Os resultados encontrados para as células da linhagem NCI-H292 mostraram aumento das populações em apoptose inicial e tardia. Na literatura vários trabalhos demonstram a atividade anticâncer de derivados tiosemicarbazônicos frente a linhagens de câncer de pulmão.

Ouyang e colaboradores (2016) avaliaram o efeito anticâncer de um derivado tiosemicarbazônico frente a linhagens de câncer de pulmão A549 e H460 conhecidas por serem altamente invasivas. Nesse estudo foi demonstrado que o derivado apresentou excelente atividade antiproliferativa *in vitro*, inibiu a migração celular e induziu a morte celular por apoptose nas células. A indução da apoptose foi confirmada pelo teste de anexina V e coloração das células com Hoechst onde foi visualizado que a maioria das células estavam com o núcleo condensado e altamente fluorescente.

Zhao et al. (2017) investigou o mecanismo de morte provocado por um derivado tiosemicarbazônico frente a linhagem de câncer de pulmão A549. Após o período de incubação, foi evidenciado que o composto provocou alterações morfológicas apoptóticas nas células e inibiu a capacidade invasiva das células A549. Os resultados mostraram que o composto induziu a apoptose devido o aumento na expressão da p53 e Bax nas células tratadas com o composto. O derivado também provocou parada de ciclo celular na fase G1 por meio da regulação negativa do complexo CDK4/Ciclina D necessário para a progressão da fase G1 para fase S.

Esses estudos demonstram a versatilidade de mecanismo das tiosemicarbazônas e confirmam o papel promissor desses compostos na busca de novos potenciais agentes com atividade anticâncer.

5.2.2 Resultados *in vivo*

5.2.2.1 Teste de Toxicidade Oral Aguda

Nos testes *in vitro* o composto TS04 apresentou promissora atividade anticâncer e seletividade para as células cancerígenas. Esses resultados sugerem que esse composto é uma molécula promissora, sendo relevante a continuação dos ensaios *in vivo*.

O primeiro ensaio realizado *in vivo* foi o Teste de Toxicidade Oral Aguda. A primeira dose administrada nos camundongos fêmeas (n=3) foi 300 mg/kg. Após a administração, os animais foram observados para identificar possíveis alterações comportamentais, sinais

indicativos de toxicidade e mortalidade. Nos primeiros 30 minutos morreu 1 animal e os outros 2 morreram nas primeiras 24 horas. Esses animais apresentaram agitação, movimentos estereotipados, salivação, contorção abdominal, estiramento, taquicardia e ausência de resposta ao toque (óbito).

Seguindo as recomendações do *Guideline* 423, o teste foi realizado novamente na dose de 50 mg/kg e não houve óbito. O teste foi repetido nas mesmas condições e esse resultado foi confirmando. Na avaliação do *screening* hipocrático não foram observados nos animais tratados com dose de 50 mg/kg sinais tóxicos ou sintomas negativos, tais como convulsões, irritabilidade, salivação, contorções abdominais, taquicardia, tremores, diarreia, sonolência, letargia, hipotermia, cianose, hipnose ou coma.

De acordo com o Guia, o composto TS04 está classificado na categoria 3 (50 mg/kg < DL₅₀ < 300 mg/kg).

Os animais foram observados por 14 dias e durante esse período foi acompanhado o consumo de água, ração e ganho de massa corpórea (Tabela 10).

Tabela 10: Consumo de ração, consumo de água e ganho de massa corpórea dos animais tratados com o composto TS04 (50 mg/kg) em relação ao grupo controle (salina), após 14 dias de administração.

Grupo	Consumo de ração (g)	Consumo de água (mL)	Ganho de massa corpórea (g)
Controle	14,3 ± 1,2	31,9 ± 2,6	5,6 ± 0,4
TS04 (50 mg/kg)	10,3 ± 0,9	30,9 ± 2,1	2,6 ± 1,1

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão, com 6 animais por grupo.

Houve redução no consumo de ração dos animais tratados com TS04 o que levou a diminuição no ganho de peso corporal quando comparados com o controle. Não houve alteração significativa no consumo de água.

Na análise macroscópica do fígado, rim e baço não foi observado lesões ou alterações na coloração, forma e dimensões dos órgãos. Quanto ao índice dos órgãos dos animais tratados com TS04 não houve diferença significativa em relação ao controle (Tabela 11).

Tabela 11: Índice dos órgãos dos animais tratados com o composto TS04 (50 mg/kg) em relação ao controle (salina), após 14 dias de administração.

Grupo	Índice dos órgãos (mg/g)		
	Fígado	Rim	Baço
Controle	62,66 ± 1,6	5,9 ± 0,34	6,0 ± 0,14
TS04 (50 mg/kg)	57,60 ± 3,6	5,9 ± 0,18	5,6 ± 0,42

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão, com 6 animais por grupo.

Na avaliação dos parâmetros hematológicos também não houve alterações significativas do grupo tratado em relação ao controle (Tabela 12).

Tabela 12: Parâmetros hematológicos dos animais tratados com o composto TS04 (50 mg/kg) em relação ao controle (salina), após 14 dias de administração.

Parâmetros	Grupos	
	Controle	TS04 (50mg/kg)
Eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$)	8,7 ± 0,8	8,3 ± 0,9
Hemoglobina (g/dL)	14,0 ± 1,1	12,9 ± 1,2
Hematócrito (%)	45,0 ± 2,2	43,4 ± 2,4
VCM (μ^3)	46,5 ± 1,9	47,3 ± 1,6
HCM (μg)	15,8 ± 0,7	17,4 ± 0,8
CHCM (%)	33,8 ± 1,0	34,4 ± 1,3
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	6,9 ± 0,6	6,6 ± 0,5
Linfócitos (%)	45,5 ± 3,0	44,9 ± 3,8
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	858,7 ± 17,6	848,2 ± 20,5

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão, com 6 animais por grupo.

Rodrigues e colaboradores (2018) avaliaram os parâmetros toxicológicos de um derivado tiossemicarbazônico. Nos testes *in vitro* os autores verificaram baixa citotoxicidade frente a células progenitoras da medula óssea e ausência de hemólise em eritrócitos humanos. No ensaio de Toxicidade Oral Aguda foi administrado uma dose única de 2.000 mg/kg em camundongos. Os animais foram observados durante 14 dias e não foram verificados sinais clínicos de toxicidade ou morte. A análise histopatológica dos órgãos também não

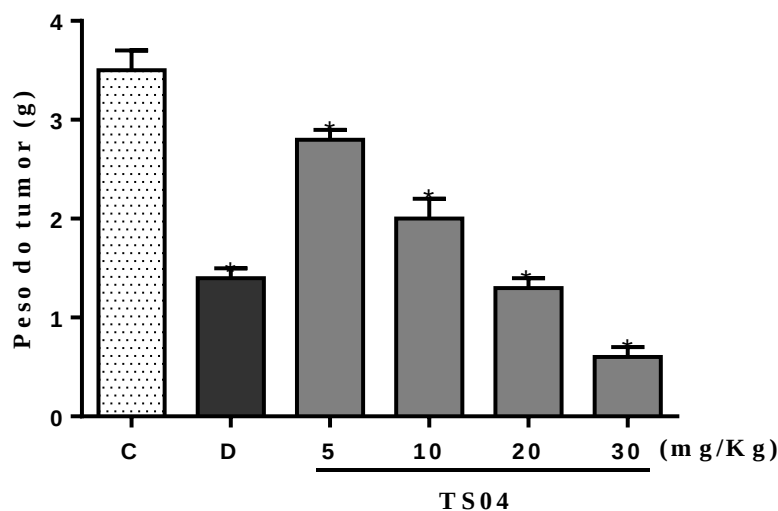
demonstrou alterações. Sendo assim, o composto foi classificado na categoria 5 ($DL_{50} > 2000$ mg/kg), o que sugere baixa toxicidade sistêmica.

5.2.2.2 Avaliação da atividade antitumoral

As doses testadas na atividade antitumoral foram escolhidas de acordo com resultado do ensaio de Toxicidade Oral Aguda e representam cerca de 1/10 da DL_{50} .

O composto TS04 apresentou atividade antitumoral elevada, inibindo de forma dose-dependente o crescimento tumoral dos grupos tratados em relação ao controle. As taxas de inibição foram: 20% para a dose de 5 mg/kg, 42% para a dose de 10 mg/kg, 62% para a dose de 20 mg/kg e 82% para a dose de 30 mg/kg. A doxorrubicina foi utilizada como padrão e inibiu o crescimento tumoral em 60% (Figura 26).

Figura 24: Determinação da massa tumoral dos animais transplantados com o carcinoma de Ehrlich, após 7 dias de tratamento com salina v.o (controle negativo), doxorrubicina (1,5 mg/kg, i.p.) e composto TS04 v.o, nas doses de 5, 10, 20 e 30 mg/kg.



C (controle negativo) D (doxorrubicina). Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão de 6 animais. (* representa $p < 0,05$) comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Student Newman-Keuls.

Vários autores estudaram a atividade antitumoral de derivados tiossemicarbazônicos utilizando o mesmo modelo do presente estudo ou modelos tumorais semelhantes.

Oliveira et al. (2015) sintetizaram e investigaram o efeito anticâncer de derivados tiossemicarbazônicos *in vitro* e *in vivo*. Os resultados obtidos *in vitro* demonstraram que os compostos foram capazes de inibir a proliferação celular. O composto que apresentou o melhor perfil antiproliferativo *in vitro* foi escolhido para estudos adicionais na citometria de fluxo e ensaios *in vivo*. Os autores avaliaram o efeito antitumoral do composto em modelo de tumor sólido de Carcinoma de Ehrlich em camundongos e todas as doses testadas foram capazes de inibir o crescimento do tumor, destacando as tiossemicarbazonas como uma classe promissora na pesquisa de novos agentes anticâncer.

Liu e colaboradores (2014) avaliaram o efeito anticâncer de um derivado tiossemicarbazônico heteroaromático. O efeito antiproliferativo foi avaliado frente a um painel de 10 linhagens de câncer. Após 48 h de incubação a viabilidade de todas as linhagens tinha reduzido e faixa de CI_{50} ficou entre 0,3 – 6,6 μ M. Os efeitos antitumorais *in vivo* foram avaliados em modelos de melanoma de rato (B16), câncer de cólon de camundongo, câncer de pulmão humano (A549) e câncer de ovário humano (SK-OV-3). Em todos os modelos o composto inibiu o crescimento tumoral em mais de 70% na maior dose testada (32 mg/kg).

Os resultados encontrados nos trabalhos citados acima estão em conformidade com os resultados encontrados para composto TS04 que inibiu de forma potente o crescimento tumoral dos animais transplantados com Carcinoma de Ehrlich.

A Tabela 13 apresenta os valores referentes ao aumento da massa corpórea e o índice dos órgãos. O ganho de peso pelos animais foi menor com o aumento da dose administrada do composto TS04. A dose de 30 mg/kg foi a que apresentou o menor ganho de peso corporal, isso provavelmente ocorreu devido à diminuição da massa tumoral, como também menor ingesta de ração. No ensaio de Toxicidade Oral Aguda, o grupo tratado com a dose de 50 mg/kg ingeriu menos ração que o grupo controle e consequentemente teve menor ganho de peso corporal. Com relação ao índice dos órgãos, não houve variação significativa entre os órgãos dos animais tratados com as diferentes doses do composto TS04 e os órgãos dos animais tratados com salina (controle negativo). Na análise macroscópica também não foi observado alterações ou lesões nos grupos tratados com TS04 e todos estavam com características semelhantes ao grupo controle negativo.

Tabela 13: Aumento da massa corpórea e índice dos órgãos dos animais tratados com doxorubicina (1,5 mg/kg, i.p.) e composto TS04 (5, 10, 20 e 30 mg/kg, vo) em relação ao controle (salina), após 7 dias de administração.

Grupo	Aumento da massa corpórea (g)	Índice dos órgãos (mg/g)		
		Fígado	Rim	Baço
Controle	11,4 ± 1,0	76,54 ± 5,85	12,34 ± 1,10	7,40 ± 0,69
Doxo	4,9 ± 0,5*	68,68 ± 4,78	13,73 ± 0,98	8,24 ± 0,81
5 mg/Kg	9,8 ± 0,8*	62,50 ± 6,06	10,41 ± 0,78	5,20 ± 0,48
10 mg/Kg	9,1 ± 0,7*	64,17 ± 5,43	13,36 ± 0,91	5,34 ± 0,51
20 mg/Kg	8,3 ± 0,7*	62,84 ± 4,89	10,92 ± 0,74	5,46 ± 0,41
30 mg/Kg	3,0 ± 0,1*	61,76 ± 5,12	11,76 ± 0,92	5,88 ± 0,60

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão de 6 animais. (* representa $p < 0,05$) comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Student Newman-Keuls.

A avaliação dos parâmetros hematológicos é extremamente importante na pesquisa de novos agentes anticâncer, visto que, os quimioterápicos tradicionais utilizados na clínica atuam no tecido hematopoiético provocando efeitos colaterais graves como imunossupressão e anemia (TARRICONE et al., 2016).

O composto TS04 não provocou alterações nos parâmetros hematológicos avaliados (Tabela 14). Esses resultados corroboram com Mohammud e colaboradores (2013) que sintetizaram um derivado tiossemicarbazônico e avaliaram a atividade anticâncer *in vivo* no modelo Carcinoma Ascítico de Ehrlich em camundongos albinos swiss. Os autores avaliaram a inibição do crescimento das células tumorais, peso do tumor, tempo de sobrevida e parâmetros hematológicos. Foi verificado que o derivado tiossemicarbozônico reduziu significativamente a taxa de crescimento das células tumorais, diminuiu o peso do tumor, aumentou o tempo de vida dos animais tratados e não alterou os parâmetros hematológicos.

Tabela 14: Parâmetros hematológicos dos animais tratados com doxorubicina (1,5 mg/kg, i.p.) e composto TS04 (5, 10, 20 e 30 mg/kg, v.o) em relação ao controle (salina), após 7 dias de administração.

Parâmetros	Grupos					
	Controle	Doxo (1,5 mg/kg)	TS04 (5 mg/Kg)	TS04 (10 mg/Kg)	TS04 (20 mg/Kg)	TS04 (30 mg/Kg)
Eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$)	7,4 ± 0,4	6,3 ± 0,6	7,7 ± 0,7	7,7 ± 0,5	7,4 ± 0,4	7,6 ± 0,8
Hemoglobina (g/dL)	13,0 ± 0,8	11,5 ± 0,8	13,8 ± 1,2	13,9 ± 0,7	13,1 ± 0,6	12,8 ± 1,2
Hematócrito (%)	38,4 ± 1,7	32,5 ± 3,2	40,8 ± 3,7	40,1 ± 2,2	38,4 ± 2,5	38,6 ± 5,2
VCM (μ^3)	52,2 ± 2,7	50,5 ± 2,3	52,7 ± 0,5	52,0 ± 1,3	52,3 ± 0,8	50,6 ± 1,3
HCM (μg)	17,6 ± 1,1	18,0 ± 0,9	18,1 ± 0,4	18,0 ± 0,5	17,8 ± 0,3	16,9 ± 0,6
CHCM (%)	33,8 ± 0,6	35,6 ± 1,8	34,3 ± 0,5	34,6 ± 0,3	34,1 ± 1,0	33,4 ± 1,9
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	10,1 ± 2,3	12,3 ± 2,6	10,9 ± 2,7	11,7 ± 1,5	10,5 ± 1,9	15,6 ± 3,7
Linfócitos (%)	44,2 ± 2,4	41,4 ± 4,3	42,7 ± 4,9	46,4 ± 7,7	47,2 ± 4,0	30,6 ± 3,9
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	834 ± 34,2	761,8 ± 73,6 ^a	848 ± 88,6	849,4 ± 73,0	851,3 ± 84,7	853,2 ± 65,8

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão de 6 animais. (* representa $p < 0,05$) comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Student Newman-Keuls.

O fígado e o rim estão envolvidos nos processos de desintoxicação do organismo, atuam desde o metabolismo até a excreção de metabólitos. Devido às funções executadas por esses órgãos, eles estão vulneráveis a danos, sendo importante monitorar possíveis efeitos tóxicos hepáticos e renais provocados por novos agentes em estudo. As lesões nos hepatócitos podem ser detectadas através da mensuração de enzimas séricas como FA (Fosfatase Alcalina), TGO (Transaminase Glutâmico Oxalacética) e TGP (Transaminase Glutâmico Pirúvica). Já os indicadores da função renal são as concentrações de creatinina, ureia, albumina, globulina e proteínas totais, por exemplo (AL-MUKHAINI et al., 2017).

Visando detectar possíveis sinais de toxicidade hepática e renal nos animais tratados com o composto TS04 foram avaliados parâmetros bioquímicos associados a esses órgãos. Os valores obtidos dos estão demonstrados na Tabela 15.

Tabela 15: Parâmetros bioquímicos dos animais tratados com doxorrubicina (1,5 mg/kg, i.p.) e composto TS04 (5, 10, 20 e 30 mg/kg, vo) em relação ao controle (salina), após 7 dias de administração.

Parâmetros	Grupos					
	Controle	Doxo (1,5 mg/kg)	TS04 (5 mg/kg)	TS04 (10 mg/kg)	TS04 (20 mg/kg)	TS04 (30 mg/kg)
Fosfatase alcalina (U/L)	126,0 ± 10,5	159,5 ± 12,1*	129,6 ± 11,1	128,0 ± 11,4	143,0 ± 10,9*	157,4 ± 11,1*
TGO (U/L)	148,8 ± 11,4	531,5 ± 11,3*	155,6 ± 14,5	169,0 ± 18,8*	182,2 ± 19,3*	195,4 ± 22,1*
TGP (U/L)	52,8 ± 4,1	161,8 ± 16,0*	60,8 ± 6,5	67,8 ± 5,9*	69,8 ± 5,9*	71,8 ± 5,1*
Albumina (g/dL)	1,9 ± 0,01	1,8 ± 0,02	2,1 ± 0,02	2,1 ± 0,03	2,3 ± 0,02	2,2 ± 0,01
Globulina (g/dL)	2,0 ± 0,01	1,9 ± 0,02	2,1 ± 0,02	2,0 ± 0,02	2,3 ± 0,02	2,0 ± 0,02
Proteínas Totais (g/dL)	3,9 ± 0,2	4,4 ± 0,3	4,2 ± 0,3	4,1 ± 0,4	4,3 ± 0,4	4,5 ± 0,3
Ureia (mg/dL)	42,6 ± 4,3	45,8 ± 3,6	37,4 ± 3,4	36,8 ± 3,6	49,8 ± 5,0	50,2 ± 5,0
Creatinina (mg/dL)	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,03	0,3 ± 0,03	0,3 ± 0,01

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão de 6 animais. (* representa $p < 0,05$) comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Student Newman-Keuls.

Nos resultados encontrados foi verificado um discreto aumento na Fosfatase Alcalina (FA) nos animais tratados com as doses de 20 e 30 mg/kg e aumento nas transaminases (TGO e TGP) nos animais tratados com as doses de 10, 20 e 30 mg/kg.

O tratamento com a doxorrubicina provocou aumento considerável da FA e das transaminases, principalmente da TGO.

Kpomah e Kpomah (2017) avaliaram o perfil toxicológico hepático de quatro derivados tiossemicarbazônicos em ratos Wistar. Os derivados foram testados nas doses de 25 e 50 mg/kg. Após cinco dias de tratamento por via oral, os animais foram eutanasiados e em seguida coletadas amostras de sangue para análises bioquímicas e avaliação da atividade hepática. O tecido hepático também foi extirpado para preparação e posterior exame histopatológico.

Nos resultados encontrados os autores verificaram que um dos derivados nas duas doses testadas provocou um discreto aumento na proporção do fígado/peso corporal. Apenas um derivado alterou na dose 50 mg/kg a bilirrubina total e conjugada, albumina, globulina e razão albumina/globulina e outros dois derivados provocaram aumento significativo da FA, TGO e TGP. Esses resultados apontaram para possíveis alterações nas funções hepáticas, porém o exame histopatológico do fígado demonstrou que os grupos tratados com os

derivados apresentaram semelhança com o grupo controle que manteve a arquitetura dos lóbulos hepáticos preservados, hepatócitos normais e tecido sem característica de inflamação.

5.2.2.3 Teste de micronúcleo

Na Tabela 16 estão expressos os resultados da avaliação do efeito mutagênico no tratamento agudo com composto TS04.

Nos resultados apresentados, não houve diferença estatística entre o controle negativo e o grupo tratado com TS04, o que demonstra a ausência de efeito mutagênico. O grupo tratado com ciclofosfamida apresentou um aumento significativo no número de micronúcleos (MN) quando comparado com o controle negativo.

Tabela 16: Frequência de Eritrócitos Policromáticos Micronucleados (EPCMN) em um total de 2000 células analisadas por animal, após 24 horas de tratamento agudo (dose única) com composto TS04 (50 mg/kg, VO), ciclofosfamida (50 mg/kg, i.p.) e salina (controle negativo, VO).

Tratamento	EPCMN/2000 EPCs
Controle	3,1 ± 0,3
Ciclofosfamida 50 mg/kg	22,6 ± 1,8*
TS04 50 mg/kg	4,6 ± 0,5

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão de 5 animais. (* representa $p < 0,05$) comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Student Newman-Keuls.

Blau et al. (2013) avaliou o potencial mutagênico de três derivados aril-tiossemicarbazônicos que se destacaram como antichagásicos *in vitro*. O teste de mutagenicidade foi realizado no sangue periférico de camundongos albinos Swiss e os pesquisadores observaram que houve baixa frequência de micronúcleos nos animais tratados com os derivados aril-tiossemicarbazônicos quando comparados com o controle negativo (salina) e controle positivo (ciclofosfamida). Os resultados encontrados no estudo citado acima corroboram com os resultados encontrados para o composto TS04, pois foi demonstrado baixa frequência de NM nos animais tratados com o derivado TS04.

Os quimioterápicos citotóxicos utilizados para tratar o câncer inibem a replicação celular através da ação direta ou indireta no DNA e por isso, podem induzir efeitos mutagênicos. Um exemplo disso é a ciclofosfamida, um agente alquilante amplamente utilizado no tratamento do câncer, mais devido seu mecanismo de ação, induz a formação de

micronúcleos, mutações genéticas e aberrações cromossômicas. Em consequência disso, o aparecimento de novos tumores estão entre as reações tardias provocadas pela ciclofosfamida. Estudos mostram que há um aumento na incidência de câncer de bexiga e adenocarcinoma de esôfago e pulmão dois anos após o tratamento com esse quimioterápico (MOHAMED; ALY, 2018).

Assim como a ciclofosfamida, vários outros compostos possuem características mutagênicas e são capazes de interagir com o material genético provocando alterações estruturais ou numéricas nos cromossomos que podem resultar na ativação ou inativação de genes envolvidos no aparecimento do câncer e de outras doenças hereditárias e degenerativas (BUYEL, 2018).

Em face disso, as agências reguladoras como a *Food and Drug Administration* (FDA), a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, Brasil) exigem que nos testes de segurança de candidatos a fármacos, estejam inclusos testes de mutagenicidade e que sejam realizados antes do início dos ensaios clínicos em humanos (ALCÁNTAR-DÍAZ et al., 2012).

Os testes de mutagenicidade podem ser realizados *in vitro* e *in vivo* utilizando vários organismos diferentes e se baseiam na busca de formação de micronúcleos durante a mitose. Esses testes são amplamente utilizados pela epidemiologia molecular para monitorar danos cromossômicos em populações expostas a agentes mutagênicos. O teste de micronúcleo em roedores está incluso em praticamente todas as baterias de teste para avaliação da mutagenicidade, sendo aceito pelas agências como parte dos testes para validar novos medicamentos (NERSESYAN et al., 2016).

A realização da técnica em sangue periférico de camundongos apresenta a vantagem de a população celular ser mais uniforme, facilitando a análise. Além disso, a coleta e preparação das amostras de sangue são mais simples e podem ser retiradas repetidamente da cauda dos animais, permitindo assim, que um mesmo animal possa fornecer várias amostras de material, sem a necessidade de eutanásia (HAYASHI et al., 1990).

6 CONCLUSÃO

Dos 14 derivados aril-semicarbazônicos avaliados, sete tiveram a CI_{50} de 72 h determinada e foram testados frente a diferentes proteínas quinases. Diante dos resultados encontrados nesses testes, os derivados **3c** e **4a** foram escolhidos para o estudo do mecanismo de ação. Os resultados demonstraram que esses compostos apresentam atividade anticâncer por indução da apoptose. O derivado **4a** foi mais citotóxico e também apresentou ação sobre a membrana das células. Os dois compostos induziram a apoptose por meio da inibição de proteínas quinases, despolarização mitocondrial, parada do ciclo celular e fragmentação do DNA.

Da série dos derivados aril-tiossemicarbazônicos, o derivado **TS04** apresentou potente atividade antiproliferativa frente às linhagens de câncer testadas e seletividade para as células tumorais. No estudo do padrão de morte celular as propriedades anticâncer do composto foram confirmadas por vários ensaios que comprovaram a indução de morte por apoptose. Nos testes *in vivo*, **TS04** apresentou elevado potencial antitumoral e não induziu efeitos mutagênicos nos animais tratados.

Assim, é possível concluir que os derivados aril-semicarbazônicos e aril-tiossemicarbazônicos estudados são potentes agentes anticâncer e podem ser eleitos para a continuidade dos testes visando estudos complementares necessários para o desenvolvimento de novos medicamentos para tratar o câncer.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, J.; STAFFURTH, J. Hormonal therapy for cancer. **Medicine**, v. 1, p. 30-33, 2016.
- AFRASIABI, Z.; SINN, E.; LIN, W.; MA, Y.; CAMPANA, C.; PADHYE, S. Nickel (II) complexes of naphthaquinone thiosemicarbazone and semicarbazone: Synthesis, structure, spectroscopy, and biological activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, p. 1526-1531, 2005.
- AHSAN, M. J. Semicarbazone analogs as anticonvulsant agents: A review. **Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 148-158, 2013.
- ALI, M. M.; JESMIN, M.; ISLAM, M. K.; KHATUN, F.; AZAD, A. K. Antineoplastic activities of acetone thiosemicarbazone against Ehrlich ascites carcinoma cells bearing mice. **Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences**, v. 21, p. 97-104, 2013.
- ALLEY, M. C.; SCUDIÈRE, 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.
- AL-MUKHAINI, N.; BA-OMAR, T.; ELTAYEB, E.; AL-SHIHI, A.; AL-RIYAMI, N.; AL-BELUSHI, J.; AL-ADAWI, K. Liver and kidney toxicity induced by Afzal smokeless tobacco product in Oman. **Tissue and Cell**, v. 49, p. 307-314, 2017.
- ANDRADE, J. K. F.; SOUZA, M. I. F.; FILHO, M. A. G.; SILVA, D. M. F.; BARROS, A. L. S.; RODRIGUES, M. D.; SILVA, P. B. N.; NASCIMENTO, S. C.; AGUIAR, J. S.; BRONDANI, D. J.; MILITÃO, G. C. G.; SILVA, T. G. N-pentyl-nitrofurantoin induces apoptosis in HL-60 leukemia cell line by upregulating BAX and downregulating BCL-xL gene expression. **Pharmacological Reports**, v. 68, p. 1046–1053, 2016.
- ARJMANDI, M. K.; MOSLEMI, D.; ZARRINI, A. S.; GORJI, M. E.; MOSAPOUR, A.; HAGHHAGHIGHI, A.; HALALKHOR, S.; BIJANI, A.; PARSIAN, H. Preand post radiotherapy serum oxidant/ antioxidant status in breast cancer patients: Impact of age, BMI and clinical stage of the disease. **Reports of Practical Oncology & Radiotherapy**, v. 21, p. 141-148, 2016.
- ASHUTOSH RAO, V.; KLEIN, S. R.; AGAMA, K. K.; TOYODA, E.; ADACHI, N.; POMMIER, Y.; SHACTER, E. B. The Iron Chelator Dp44mT Causes DNA Damage and Selective Inhibition of Topoisomerase II α in Breast Cancer Cells. **Cancer research**, v. 69, p. 948-957, 2009.
- ASSADIESKANDAR, A.; YU, C.; MAISONNEUVE, P.; LIU, X.; CHEN, Y.; PRAKASH, G.K.S.; KURINOV, I.; SICHERI, F.; ZHANG, C. Effects of rigidity on the selectivity of protein kinase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 146, p. 519-528, 2018.

BADISA, R. B.; DARLING-REED, S. F.; JOSEPH, P.; COOPERWOOD, J. S.; LATINWO, L. M.; GOODMAN, C. B. Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells. **Anticancer Research**, v. 29, p. 2993-2996, 2009.

BALDO, B. A.; PAGANI, M. Adverse events to nontargeted and targeted chemotherapeutic agents: emphasis on hypersensitivity responses. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 34, p. 565-596, 2014.

BALMUS, G.; KARP, N. A.; NG, B. L.; JACKSON, S. P.; ADAMS, D. J.; MCINTYRE, R. E. A high-throughput *in vivo* micronucleus assay for genome instability screening in mice. **Nature Protocols**, v. 10, p. 205-215, 2015.

BARCELLOS-HOFF, M.; DAVID L.; TIMOTHY, C. W. The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, p. 511-518, 2013.

BARROS, M. E. S. B.; FREITAS, J. C. R.; OLIVEIRA, J. M.; CRUZ, C. H. B.; SILVA, P. B. N.; ARAÚJO, L. C. C.; MILITÃO, G. C. G.; SILVA, T. G.; OLIVEIRA, R. A.; MENEZES, P. H. Synthesis and evaluation of (-)-Massoialactone and analogues as potential anticancer and anti-inflammatory agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 76, p. 291-300, 2014.

BERALDO, H.; GAMBINO, D. The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 4, p. 31-39, 2004.

BHARTI, N.; SHAIENDRA, S. S.; NAQVI, F.; AZAM, A. New palladium(ii) complexes of 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazones: synthesis, spectral studies and *in vitro* anti-amoebic activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 2923-2929, 2003.

BHAVE, S.; ELFORD, H.; MCVOY, M. A. Ribonucleotide reductase inhibitors hydroxyurea, didox, and trimidox inhibit human cytomegalovirus replication *in vitro* and synergize with ganaciclovir. **Antiviral Research**, v. 100, p. 151-158, 2013.

BIBIAN, M.; RAHAIM, R. J.; CHOI, J. Y.; NOGUCHI, Y.; SCHÜRER, S.; CHEN, W.; NAKANISHI, S.; LICHT, K.; ROSENBERG, L. H.; LI, L.; FENG, Y.; CAMERON, M. D.; DUCKETT, D. R.; CLEVELAND, J. L.; ROUSH, W. R. Development of highly selective casein kinase 1 δ /1 ϵ (CK1 δ /1 ϵ) inhibitors with potent antiproliferative properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, p. 4374-4380, 2013.

BISCEGLIE, F.; PINELLI, S.; ALINOVI, R.; GOLDONI, M.; MUTTI, A.; CAMERINI, A.; PIOLA, L.; TARASCONI, P.; PELOSI, G. Cinnamaldehyde and cuminaldehyde thiosemicarbazones and their copper (II) and nickel (II) complexes: A study to understand their biological activity. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 140, p. 111-125, 2014.

BLAU, L.; MENEGON, R. F.; TROSSINI, G. H.; MOLINO, J. V. D.; VITAL, D. G.; CICARELLI, R. M. B.; CHIN, C. M. Design, synthesis and biological evaluation of new aryl-thiosemicarbazone as antichagasic candidates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 67, p. 142-151, 2013.

BRANDMAIER, A.; HOU, S. Q.; SHEN, W. H. Cell Cycle Control by PTEN. **Journal of Molecular Biology**, v. 429, p. 2265-2277, 2017.

BROCKMAN, R. W.; THOMSON, J. R.; BELL, M. J.; SKIPPER, H. E. Observations on the antileukemic activity of pyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone and thiocarbohydrazone. **Cancer Research**, v. 16, p. 167-170, 1956.

BRONDANI, D. J.; CAETANO, N.; MOREIRA, D. R. M.; SOARES, R. R.; LIMA, V. T.; ARAUJO, J. M.; ABREU, F. C.; OLIVEIRA, B. G.; HERNANDES, M. Z.; LEITE, A. C. L. Novel nitrofurazone derivatives endowed with antimicrobial activity. **Archiv der Pharmazie Chemistry in Life Sciences**, v. 341, p. 655-660, 2008.

BRONDANI, D. J.; MOREIRA, D. R. M.; FARIAS, M. P. A.; SOUZA, F. R. S.; BARBOSA, F. F.; LEITE, A. C. L. A new and efficient N-alkylation procedure for semicarbazides/semicarbazones derivatives. **Tetrahedron Letters**, v. 48, p. 3919-3923, 2007.

BUYEL, J. F. Plants as sources of natural and recombinant anti-cancer agents. **Biotechnology Advances**, v. 36, p. 506-520, 2018.

BURQUE, C. D.; MILITÃO, G. C. G.; LIMA, D. J. B.; LOTUFO, L. V. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. O. Pterocarpanquinones, aza-pterocarpanquinone and derivatives: Synthesis, antineoplastic activity on human malignant cell lines and antileishmanial activity on *Leishmania amazonensis*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 6885-6891, 2011.

BURKE, P. J. Mitochondria, bioenergetics and apoptosis in cancer. **Trends Cancer**, v. 3, p. 857-870, 2017.

CANTREAT, I. Scaling up cancer diagnosis and treatment in developing countries: what can we learn from the HIV/AIDS epidemic?. **Annals of Oncology**, v. 21, p. 680-682, 2010.

CHAABANE, W.; USER, S. D.; EL-GAZZAH, M.; JAKSIK, R.; SAJJADI, E.; RZESZOWSKA-WOLNY, J.; LOS, M. J. Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer. **Archivum Immunologiae et Therapia e Experimentalis**, v. 61, p. 43-58, 2013.

CHANDRA, S.; GUPTA, L. K. Spectroscopic and biological studies on newly synthesized nickel (II) complexes of semicarbazones and thiosemicarbazones. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 62, p. 1089-1094, 2005.

CHANDRA, S.; PARMAR, S.; KUMAR, Y. Synthesis, spectroscopic and antimicrobial studies on bivalent zinc and mercury complexes of 2-formylpyridine thiosemicarbazone. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v. 2009, p. 1-6, 2009.

CHARLTON, P.; SPICER, J. Targeted therapy in cancer. **Medicine**, v. 44, p. 34-38, 2016.

CHEN, Y. L.; CHANG, M. C.; CHENG, W. F. Metronomic chemotherapy and immunotherapy in cancer treatment. **Cancer Letters**, v. 400, p. 282-292, 2017.

CHEN, Y.; CHEN, S.; LIANG, H.; YANG, H.; LIU, L.; ZHOU, K.; XU, L.; LIU, J.; YUN, L.; LAI, B.; SONG, L.; LUO, H.; PENG, J.; LIU, Z.; XIAO, Y.; CHEN, W.; TANG, H. Bcl-2 protects TK6 cells against hydroquinone-induced apoptosis through parp-1 cytoplasm translocation and stabilizing mitochondrial membrane potential. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 59, p. 49-59, 2018.

CHEONG, J. K.; VIRSHUP, D. M. Casein kinase 1: Complexity in the family. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 43, p. 465-469, 2011.

CHRISTENSEN, M. E.; JANSEN, E. S.; SANCHEZ, W.; WATERHOUSE, N. J. Flow cytometry based assays for the measurement of apoptosis-associated mitochondrial membrane depolarisation and cytochrome c release. **Methods**, v. 61, n. 2, p. 138-145, 2013.

CHUPRAJOB, T.; CHANGTAM, C.; CHOKCHASIRI, R.; CHUNGLOK, W.; SORNKAEW, N.; SUKSAMRARN, A. Synthesis, cytotoxicity against human oral cancer KB cells and structure-activity relationship studies of trienone analogues of curcuminoids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, p. 2839-2844, 2014.

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. N. S. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon**, v. 40, p. 231-234, 2002.

CRAFTON, S. M.; SALANI, R. Beyond chemotherapy: an overview and review of targeted therapy in cervical cancer. **Clinical Therapeutics**, v. 38, p. 449-458, 2016.

CROCE, C. M. Oncogenes and cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 5, p. 502-511, 2008.

CZUBATY, A.; PIEKIEKO-WITKOWSKA, A. Protein kinases that phosphorylate splicing factors: Roles in cancer development, progression and possible therapeutic options. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 91, p. 102-115, 2017.

DAS, T. P.; SUMAN, S.; JOHN, A. M. S. P.; PAL, D. EDWARDS, A.; ALATASSI, H.; ANKEM, M. K.; DAMODARAN, C. Activation of AKT negatively regulates the proapoptotic function of death-associated protein kinase 3 (DAPK3) in prostate cancer. **Cancer Letters**, v. 377, p. 134-139, 2016.

DESANTIS, C. E.; LIN, C. C.; MARIOTTO, A. B.; SIEGEL, R. L.; STEIN, K. D.; KRAMER, J. L.; ALTERI, R.; ROBBINS, A. S.; JEMAL, A. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 64, p. 252-271, 2014.

DICKENS, E.; AHMED, S. Principles of cancer treatment by chemotherapy. **Surgery**, v. 36, p. 134-138, 2018.

DU, X.; GUO, C.; HANSELL, E.; DOYLE, P. S.; CAFFREY, C. R.; HOLLER, T. P.; COHEN, F. E. Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thiosemicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 2695-2707, 2002.

DZIERZAK, E.; PHILIPSEN, S. Erythropoiesis: development and differentiation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, p. a011601, 2013

EHRlich, P.; APOLANT, H. Experimentelle carcinomstudien an Mäusen. **Fischer**, v.1, p. 78-80, 1906.

EMAMI, S.; DADASHPOUR, S. Current developments of coumarin-based anticancer agents in medicinal chemistry. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 102, p. 611-630, 2015.

ENYEDY, É. A.; BOGNÁR, G. M.; NAGY, N. V.; JAKUSCH, T.; KISS, T.; GAMBINO, D. Solution speciation of potential anticancer metal complexes of salicyl aldehyde semicarbazone and its bromo derivative. **Polyhedron**, v. 67, p. 242-252, 2014.

ESPÍNDOLA, J. W. P.; OLIVEIRA CARDOSO, M. V.; OLIVEIRA FILHO, G. B.; SILVA, D. A. O.; MOREIRA, D. R. M.; BASTOS, T. M.; CASTRO, M. C. A. B. Synthesis and structure–activity relationship study of a new series of antiparasiti caryloxyl thiosemicarbazones inhibiting *Trypanosoma cruzi* cruzain. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 101, p. 818-835, 2015.

Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2015.

EVANS, H. J.; NEARY, G. J.; WILLIAMSON, F. S. The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen: Part II. Chromosome damage: the production of micronuclei. **International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine**, v. 1, n. 3, p. 216-229, 1959.

FADEEL, B.; ORRENIUS, S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide- ranging implications in human disease. **Journal of Internal Medicine**, v. 258, p. 479-517, 2005.

FAN, Y.; LUA, H.; ANA, L.; WANG, C.; ZHOU, Z.; FENG, F.; MA, H.; XU, Y.; ZHAO, Q. Effect of active fraction of *Eriocaulon sieboldianum* on human leukemia K562 cells via proliferation inhibition, cell cycle arrest and apoptosis induction. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 43, p. 13-20, 2015.

FEINBERG, A. P.; OHLSSON, R.; HENIKOFF, S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, n. 1, p. 21-33, 2006.

FITZMAURICE, C.; DICKER, D.; DOR, A.; HAMAVI, H.; MORADI-LAKEH, M.; MACINTYRE, M. F.; HAMADEH, R. R. The global burden of cancer 2013. **JAMA Oncology**, v. 1, p. 505-527, 2015.

FLUSBERG, D. A.; PETER, K. S. Surviving apoptosis: life-death signaling in single cells. **Trends in Cell Biology**, v. 25, p. 446-458, 2015.

FRENCH, F. A.; BLANZ JR, E. J. The carcinostatic activity of thiosemicarbazones of formyl heteroaromatic compounds. III. Primary correlation. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 585–589, 1966.

FORTES, M. P.; SILVA, P. B. N.; SILVA, T. G.; KAUFMAN, T. S.; MILITÃO, G. C. G.; SILVEIRA, C. C. Synthesis and preliminary evaluation of 3-thiocyanato-1H-indoles as potential anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 118, p. 21-26, 2016.

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.

FULDA, S. Targeting extrinsic apoptosis in cancer: Challenges and opportunities. **In Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 39, p. 20-25, 2015.

GAMBINO, D.; FERNANDEZ, M.; SANTOS, D.; ETCHEVERRIA, G. A.; PIRO, O. E.; PAVAN, F. R.; MARQUES, F. Searching for gallium bioactive compounds: Gallium (III) complexes of tridentate salicyl aldehyde semicarbazone derivatives. **Polyhedron**, v. 30, p. 1360-1366, 2011.

GAN, C.; CUI, J.; SU, S.; LIN, Q.; JIA, L.; FAN, L.; HUANG, Y. Synthesis and antiproliferative activity of some steroidal thiosemicarbazones, semicarbazones and hydrozones. **Steroids**, v. 87, p. 99-107, 2014.

GANAPATHY-KANNIAPPAN, S. Linking tumor glycolysis and immune evasion in cancer: emerging concepts and therapeutic opportunities. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1868, p. 212-220, 2017.

GENOVA, P.; VARADINOVA, T.; MATESANZ, A. I.; MARINOVA, D.; SOUZA, P. Toxic effects of bis (thiosemicarbazone) compounds and its palladium (II) complexes on herpes simplex virus growth. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 197, p. 107-112, 2004.

GERHARDS, N. M.; ROTTENBERG, S. New tools for old drugs: Functional genetic screens to optimize current chemotherapy. **Drug Resistance Updates**, v. 36, p. 30-46, 2018.

GIANCOTTI, F. G. Deregulation of cell signaling in cancer. **FEBS Letters**, v. 588, p. 2558-2570, 2014.

GIORGIO, V.; GUO, L.; BASSOT, C.; PETRONILLI, V.; BERNARDI, P. Calcium and regulation of the mitochondrial permeability transition. **Cell calcium**, v. 70, p. 56-63, 2018.

GILES, F. J. A new era for ribonucleoside reductase inhibition. **Leukemia Research**, v. 31, p. 1163-1164, 2007.

GOMES, M. A. G.; CARREIRA, G. M.; SOUZA, D. P.; NOGUEIRA, P. M. R.; MELO, E. J.; MARIA, E. J. Étude de l'effet des thiosemicarbazones sur *Toxoplasma gondii*. **Comptes Rendus Biologies**, v. 336, p. 203-206, 2013.

GONÇALVES, B. M.; SALVADOR, J. A.; MARÍN, S.; CASCANTE, M. Synthesis and anticancer activity of novel fluorinated asiatic acid derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 114, p. 101-117, 2016.

GU, W.; MIAO, T. T.; HUA, D. W.; JIN, X. Y.; TAO, X. B.; HUANG, C. B.; WANG, S. F. Synthesis and *in vitro* cytotoxic evaluation of new 1H-benzo[d]imidazole derivatives of dehydroabiatic acid. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, p. 1296-1300, 2017.

HEIDEN, M. G. V.; DEBERARDINIS, R. J. Understanding the intersections between metabolism and cancer biology. **Cell**, v. 168, p. 657-669, 2017.

HEMALATHA, T.; IMRAN, P. K. M.; GNANAMANI, A.; NAGARAJAN, S. QSAR and evaluation of molecular electrostatic potential for N-nitrosopiperidinone semicarbazones. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 116, p. 87-93, 2012.

HESS, J. A.; KHASAWNEH, M. K. Cancer metabolism and oxidative stress: Insights into carcinogenesis and chemotherapy via the non-dihydrofolate reductase effects of methotrexate. **BBA Clinical**, v. 3, p. 152-161, 2015.

HINTZSCHE, H.; HEMMANN, U.; POTH, A.; UTESCH, D.; LOTT, J.; STOPPER, H. Fate of micronuclei and micronucleated cells. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 771, p. 85-98, 2017.

HO, J.; LEE, W. Y.; KOH, K. J. T.; LEE, P. P. F.; YAN, Y. K. Rhenium (I) tricarbonyl complexes of salicyl aldehyde semicarbazones: synthesis, crystal structures and cytotoxicity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 119, p. 10-20, 2013.

HSU, Y. N.; SHYU, H. W.; HU, T. W.; YEH, J. P.; LIN, Y. W.; LEE, L. Y.; YEH, Y. T.; DAI, H. Y.; PERNG, D. S.; SU, S. H.; HUANG, Y. H.; SU, S. J. Anti-proliferative activity of biochanin A in human osteosarcoma cells via mitochondrial-involved apoptosis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 112, p. 194-204, 2018.

HUART, A. S.; SAXTY, B.; MERRITT, A.; NEKULOVA, M.; LEWIS, S.; HUANG, Y.; VOJTESEK, B.; KETTLEBOROUGH, C.; HUPP, T. R. A Casein kinase 1/Checkpoint kinase 1 pyrazolo-pyridine protein kinase inhibitor as novel activator of the p53 pathway. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, p. 5578-5585, 2013.

HUART, A. S.; MACLAINE, N. J.; MEEK, D. W.; HUPP, T. R. CK1 α plays a central role in mediating MDM2 control of p53 and E2F-1 protein stability. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 32384-32394, 2009.

IVANOVIĆ, I.; GLIGORIJEVIĆ, N.; ARANĐELOVIĆ, S.; RADULOVIĆ, S.; ROLLER, A.; KEPPLER, B. K.; GRGURIĆ-ŠIPKA, S. New ruthenium (II)-arene complexes bearing hydrazides and the corresponding (thio) semicarbazones of 3-and 4-acetylpyridine: Synthesis, characterization, crystal structure determination and antiproliferative activity. **Polyhedron**, v. 61, p. 112-118, 2013.

INUZUKA, H.; TSENG, A.; GAO, D.; ZHAI, B.; ZHANG, Q.; SHAIK, S.; WAN, L.; ANG, X. L.; MOCK, C.; YIN, H.; STOMMEL, J. M.; GYGI, S.; LAHAV, G.; ASARA, J.; XIAO, Z. J.; KAELEN, W. G.; JR. HARPER, J.W.; WEI, W. Phosphorylation by Casein Kinase I Promotes the turnover of the Mdm2 oncoprotein via the SCF ^{β -TRCP} ubiquitin ligase. **Cancer cell**, v. 18, p. 147-159, 2010.

ISAKOV, N. Protein kinase C (PKC) isoforms in cancer, tumor promotion and tumor suppression. **Seminars in Cancer Biology**, v. 48, p. 36-52, 2018.

JAGADEESH, M.; KALANGI, S. K.; KRISHNA, L. S.; REDDY, A. V. Halo-substituted thiosemicarbazones and their copper (II), nickel (II) complexes: detailed spectroscopic characterization and study of antitumour activity against HepG2 human hepatoblastoma

cells. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 118, p. 552-556, 2014.

JANSSON, P. J.; KALINOWSKI, D. S.; LANE, D. J.; KOVACEVIC, Z.; SEEBACHER, N. A.; FOUANI, L.; RICHARDSON, D. R. The renaissance of polypharmacology in the development of anti-cancer therapeutics: Inhibition of the "Triad of Death" in cancer by Di-2-pyridylketone thiosemicarbazones. **Pharmacological Research**, v. 100, p. 255-260, 2015.

JEVTIĆ, P.; EDENS, L. J.; VUKOVIĆ, L. D.; LEVY, D. L. Sizing and shaping the nucleus: mechanisms and significance. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 28, p. 16-27, 2014.

JIMENEZ, P. C.; FORTIER, S. C.; LOTUFO, T. M. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Biological activity in extracts of ascidians (Tunicata, Ascidiacea) from then or the astern Braziliam coast. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 287, n. 1, p. 93-101, 2003.

JONES, P. A.; ISSA, J. P. J.; BAYLIN, S. Targeting the cancer epigenome for therapy. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, p. 630-641, 2016.

JOHN, R.; CHAND, V.; CHAKRABORTY, S.; JAISWAL, N.; NAG, A. DNA damage induced activation of Cygb stabilizes p53 and mediates G1 arrest. **DNA Repair**, v. 24, p. 107-112, 2014.

JOSHI, G.; SINGH, P. K.; NEGI, A.; RANA, A.; SINGH, S.; KUMAR, R. Growth factors mediated cell signalling in prostate cancer progression: implications in discovery of anti-prostate cancer agents. **Chemico-Biological Interactions**, v. 240, p. 120-133, 2015.

JU, H.; YU, K.; CHO, S.; CHEONG, S. H.; KWON, K. H. Anti-cancer effects of traditional Korean wild vegetablesin complementary and alternative medicine. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 24, p. 47-54, 2016.

KABEL, A.M. Tumor protein p53: Novel aspects of anold tumor marker. **Journal of Cancer Research and Treatment**, v. 3, p. 25-27, 2015.

KALAIVANI, P.; SARANYA, S.; POORNIMA, P.; PRABHAKARAN, R.; DALLEMER, F.; PADMA, V. V.; NATARAJAN, K. Biological evaluation of new nickel (II) metallates: Synthesis, DNA/protein binding and mitochondrial mediated apoptosis in human lung cancer cells (A549) via ROS hypergeneration and depletion of cellular antioxidant pool. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 82, p. 584-599, 2014.

KAUR, S.; GURDEEP S.; KIRANDEEP K. Cancer stem cells: An insight and future perspective. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 10 p. 846-852, 2014.

KERR, J. F. R.; 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.

KHAN, I.; GURU, S. K.; RATH, S. K.;CHINTHAKINDI, P. K.;SINGH, B.; KOUL, S.; BHUSHAN, S.;SANGWAN, P. L. A novel triazole derivative of betulinic acid induces extrinsic and intrinsic apoptosis in human leukemia HL-60 cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 108, p. 104-116, 2006.

KLAUNIG, J. E.; LISA, M. K.; BARBARA, A. H. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. **Toxicologic Pathology**, v. 38, p. 96-109, 2010.

KOFF, J. L.; RAMACHANDIRAN, S.; BERNAL-MIZRACHI, L. A time tokill: targeting apoptosis in cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 2942-2955, 2015.

KOHRMAN, A. Q.; MATUS, D. Q. Divide or conquer: cell cycle regulation of invasive behavior. **Trends in Cell Biology**, v. 27, p. 12-25, 2017.

KRUKIEWICZ, K.; ZAK, J. K. Biomaterial-based regional chemotherapy: Local anticancer drug delivery to enhance chemotherapy and minimize its side-effects. **Materials Science and Engineering: C**, v. 62, p. 927-942, 2016.

KUMAR, K.; SHARMA, S.; KUMAR, A.; BHARDWAJ, P.; BARHWAL, K.; HOTA, S. K. Acute and sub-acute toxicological evaluation of lyophilized *Nymphaea x rubra* Roxb. ex Andrews rhizome extract. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 88, p. 12-21, 2017.

LATIF, N. A. A.; BATRAN, R. Z.; KHEDR, M. A.; ABDALLA, M. M. 3-Substituted-4-hydroxycoumarin as a new scaffold with potent CDK inhibition and promising anticancer effect: Synthesis, molecular modeling and QSAR studies. **Bioorganic Chemistry**, v. 67, p. 116–129, 2016.

LAZO, P. A. Reverting p53 activation after recovery of cellular stress to resume with cell cycle progression. **Cell Signaling Technology**, v. 33, p. 49-58, 2017.

LEE, G.; OH, T. I.; UM, K. B.; YOON, H.; SON, J.; KIM, H. I.; KIM, H.; KIM, Y. J.; LEE, C. S.; LIM, J. H. Small-molecule inhibitor sof USP7 induce apoptosis through oxidative and endoplasmic reticulum stress in cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 470, p. 181-186, 2016.

LHEUREUX, S.; OZA, A. M. Endometrial cancer-targeted therapies myth or reality? Review of current targeted treatments. **European Journal of Cancer**, v. 59, p. 99-108, 2016.

LI, J.; LUO, X.; WANG, Q.; ZHENG, L. M.; KING, I.; DOYLE, T. W.; CHEN, S. H. Synthesis and biological evaluation of a water soluble phosphate prodrug of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.8, p. 3159-3164, 1998.

LIU, J.; ZHOU, F.; ZHANG, L.; WANG, H.; ZHANG, J.; ZHANG, C.; JIANG, Z.; LI, Y.; LIU, Z.; CHEN, H. DMXAA-pyranoxanthone hybrids enhance inhibition activities against human cancer cells with multi-target functions. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 1768-1778, 2018.

LI, W.; HAN, W.; MA, Y.; CUI, L.; TIAN, Y.; ZHOU, Z.; WANG, H. P53-dependent miRNAs mediate nitric oxide-induced apoptosis in colonic carcinogenesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 85, p. 105-113, 2015.

LIPPI, G.; PAVESI, F.; CATTABIANI, C.; AVANZINI, P.; PIPITONE, S. Influence of *in vitro* hemolysis on nucleated red blood cells and reticulocyte counts. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 35, p. 225-228, 2013.

LIU, B; XUE, Q; TANG, Y; CAO, J; GUENGERICH, F. P; ZHANG, H. Mechanisms of mutagenesis: DNA replication in the presence of DNA damage. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 768, p. 53-67, 2016.

LIU, M. C.; LIN, T. S.; SARTORELLI, A. C. Synthesis and antitumor activity of amino derivatives of pyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, p. 3672-3677, 1992.

LIU, Z. C.; WANG, B. D.; YANG, Z. Y.; LI, Y.; QIN, D. D.; LI, T. R. Synthesis, crystal structure, DNA interaction and antioxidant activities of two novel water-soluble Cu(2+) complexes derivated from 2-oxo-quinoline-3-carbaldehyde Schiff-bases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 4477-4484, 2009.

LIU, Z.; WU, S.; WANG, Y.; LI, R.; WANG, J.; WANG, L.; GONG, P. Design, synthesis and biological evaluation of novel thieno[3, 2-d] pyrimidine derivatives possessing diaryl semicarbazone scaffold as potent antitumor agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 87, p. 782-793, 2014.

LOIDREAU, Y.; MARCHAND, P.; DUBOUILH-BENARD, C.; NOURRISSON, M. R.; DUFLOS, M.; LOZACH, O.; LOAËC, N.; MEIJER, L.; BESSON, T. Synthesis and biological evaluation of N-arylbenzo[b]thieno[3,2-d]pyrimidin-4-amines and their pyrido and pyrazino analogues as Ser/Thr kinase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, p. 171-183, 2012.

LOIDREAU, Y.; DEAU, E.; MARCHAND, P.; NOURRISSON, M. R.; LOGÉ, C.; COADOU, G.; LOAËC, N.; MEIJER, L.; BESSON, T. Synthesis and molecular modelling studies of 8-arylpyrido[3',2':4,5]thieno[3,2-d]pyrimidin-4-amines as multitarget Ser/Thr kinases inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 92, p. 124-134, 2015.

LÓPEZ-LÁZARO, M. Two preclinical tests to evaluate anticancer activity and to help validate drug candidates for clinical trials. **Oncoscience**, v. 7, p. 91-98, 2015.

LUO, X. J.; QIN, Q. P.; LI, Y. L.; LIU, Y. C.; CHEN, Z. F.; LIANG, H. Three platinum(II) complexes of 2-(methoxy-phenyl)-imidazo-[4,5-f]-[1,10] phenanthroline: cell apoptosis induction by sub-G1 phase cell cycle arrest and G-quadruplex binding properties. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 46, p. 176-179, 2014.

LUZZATI, T.; PARENTI, A.; RUGHI, T. Economic growth and cancer incidence. **Ecological Economics**, v. 146, p. 381-396, 2018.

MA, J. W.; TSAO, T. C. Y.; HSI, Y. T.; LIN, Y. C.; CHEN, Y.; CHEN, Y.; HO, C. T.; KAO, J. Y.; WAY, T. D. Essential oil of *Curcuma aromatica* induces apoptosis in human non-small-cell lung carcinoma cells. **Journal of Functional Foods**, v. 22, p. 101-112, 2016.

MA, Z. J.; LU, L.; YANG, J. J.; WANG, X. X.; SU, G.; WANG, Z. L.; CHEN, G. H.; SUN, H. M.; WANG, M. Y.; YANG, Y. Lariciresinol induces apoptosis in HepG2 cells via

mitochondrial-mediated apoptosis pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 821, p. 1–10, 2018.

MAKIN, G. Principles of chemotherapy. **Journal of Paediatrics and Child Health**, v. 28, p. 183-188, 2018.

MELOS, J. L. R.; TORRES-SANTOS, E. C.; FAIÕES, V. D. S.; DEL CISTIA, C. D. N.; 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.

METZ, G. E.; GALINDO, I.; ABEYA, M. M.; ECHEVERRÍA, M. G.; ALONSO, C. Intrinsic, extrinsic and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in RK13 cells infected with equine arteritis virus. **Virus Research**, v. 213, p. 219-223. 2016.

MOHAMED, H. M., ALY, M. S. Evaluation of genotoxicity of *Euphorbia triaculeata* Forssk. extract on Mice Bone Marrow Cells *in vivo*. **Toxicology reports**, v. 5, p. 625-631, 2018.

MONASTYRSKYI, A.; NILCHAN, N.; QUEREDA, V.; NOGUCHI, Y.; RUIZ, C.; GRANT, W.; CAMERON, M.; DUCKETT, D.; ROUSH, W. Development of dual casein kinase 1 δ /1 ϵ (CK1 δ / ϵ) inhibitors for treatment of breast cancer. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, p. 590-602, 2018.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 16, p. 55-63, 1983.

NERSESYAN, A.; FENECH, M.; BOLOGNESI, C.; MIŠÍK, M.; SETAYESH, T.; WULTSCH, G.; BONASSI, S.; THOMAS, P.; KNASMÜLLER, S. Use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay in occupational biomonitoring of genome damage caused by *in vivo* exposure to chemical genotoxins: Past, present and future. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 770, p. 1-11, 2016.

NGUYEN, D. T.; LE, T. H.; BUI, T. T. T. Antioxidant activities of thiosemicarbazones from substituted benzaldehydes and N-(tetra-O-acetyl- β -d-galactopyranosyl) thiosemicarbazide. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, p. 199-207, 2013.

NOBLÍA, P.; VIEITES, M.; PARAJÓN-COSTA, B. S.; BARAN, E. J.; CERECETTO, H.; DRAPER, P.; CERÁIN, A. L. Vanadium (V) complexes with salicylaldehyde semicarbazone derivatives bearing *in vitro* anti-tumor activity toward kidney tumor cells (TK-10): crystal structure of [V^VO₂ (5-bromosalicylaldehyde semicarbazone)]. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, p. 443-451, 2005.

NORRIS, S. R.; OHI, R. Cell Division: Centrosomes Have Separation Anxiety. **Current Biology**, v. 27, p. R601-R603, 2017.

OLIVEIRA, J. F.; LIMA, T. S.; VENDRAMINI-COSTA, D. B.; LACERDA PEDROSA, S. C. B.; LAFAYETTE, E. A.; SILVA, R. M. F.; ALMEIDA, S. M. V.; MOURA, R. O. M.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; LIMA, M. D. C. A. Thiosemicarbazones and 4-thiazolidinones indole-based derivatives: Synthesis, evaluation of antiproliferative activity,

cell death mechanisms and topoisomerase inhibition assay. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 136, p. 305-314, 2017.

OLIVEIRA, J. F.; SILVA, A. L.; VENDRAMINI-COSTA, D. B.; AMORIM, C. A. C.; CAMPOS, J. F.; RIBEIRO, A. G.; MOURA, R. O.; NEVES, J. L.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; LIMA, M. C. A. Synthesis of thiophene-thiosemicarbazone derivatives and evaluation of their *in vitro* and *in vivo* antitumor activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 104, p. 104-156, 2015.

OLIVEIRA, R. B.; SOUZA-FAGUNDES, E. M.; SOARES, R. P.; ANDRADE, A. A.; KRETTLI, A.; ZANI, C. L. Synthesis and antimalarial activity of semicarbazone and thiosemicarbazone derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 1983-1988, 2008.

OYINLOYE, B. E.; ADENOWO, A. F.; KAPPO, A. P. Reactive oxygen species, apoptosis, antimicrobial peptides and human inflammatory diseases. **Pharmaceuticals**, v. 8, p. 151-175, 2015.

OUYANG, R.; YANG, Y.; TONG, X.; YANG, Y.; TAO, H.; ZONG, T.; FENG, K.; JIA, P.; CAO, P.; GUO, N.; CHANG, H.; ZHOU, S.; MIAO, Y.; CHANG, H. Potential anti-cancer activity of a novel Bi (III) containing thiosemicarbazone derivative. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 73, p. 138-141, 2016.

PAN, A. C.; BORHANI, D. W.; DROR, R. O.; SHAW, D. E. Molecular determinants of drug-receptor binding kinetics. **Drug Discovery Today**, v. 18, p. 667-673, 2013.

PAPE, V. F.; TÓTH, S.; FÜREDI, A.; SZEBÉNYI, K.; LOVRICS, A.; SZABÓ, P.; SZAKÁCS, G. Design, synthesis and biological evaluation of thiosemicarbazones, hydrazine benzothiazoles and arylhydrazones as anticancer agents with a potential to overcome multi drug resistance. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 117, p. 335-354, 2016.

PARK, M. R.; KIM, S. G.; CHO, I. A.; OH, D.; KANG, K. R.; LEE, S. Y.; MOON, S.; CHO, S. S.; YOON, G.; KIM, C. S.; OH, J. S.; YOU, J. S.; KIM, D. K.; SEO, Y. S.; IM, H. J.; KIM, J. S. Licochalcone-A induces intrinsic and extrinsic apoptosis via ERK1/2 and p38 phosphorylation-mediated TRAIL expression in head and neck squamous carcinoma FaDu cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 77, p. 34-43, 2015.

PAVAN, F. R.; MAIA, P. I. D. S.; LEITE, S. R.; DEFLON, V. M.; BATISTA, A. A.; SATO, D. N.; LEITE, C. Q. Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: Anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity and cytotoxicity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 1898-1905, 2010.

PAVLOVA, N. N.; THOMPSON, C. B. The emerging hallmarks of cancer metabolism. **Cell Metabolism**, v. 23, p. 27-47, 2016.

PEREIRA, F. C.; LIMA, B. A. V.; LIMA, A. P.; PIRES, W. C.; MONTEIRO, T. M.; MAGALHÃES, L. F.; COSTA, W.; GRAMINHA, A. E.; BATISTA, A. A.; ELLENA, J.; SIVEIRA-LACERDA, E. P. Cis-[RuCl(BzCN)(N-N)(P-P)]PF₆ complexes: Synthesis and *in vitro* antitumor activity (BzCN = benzonitrile; N-N = 2,2'-bipyridine; 1,10-phenanthroline; P-P = 1,4-bis(diphenylphosphino) butane, 1,2-bis(diphenylphosphino)ethane, or 1,1'-(diphenylphosphino)ferrocene). **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 149, p. 91-101, 2015.

PIETKIEWICZ, J.; ZIELIŃSKA, K.; SACZKO, J.; KULBACKA, J.; MAJKOWSKI, M.; WILK, K. A. New approach to hydrophobic cyanine-type photosensitizer delivery using polymeric oil-cored nanocarriers: hemolytic activity, *in vitro* cytotoxicity and localization in cancer cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, p. 322-335, 2010.

PIETKIEWICZ, S.; SCHMIDT, J. H.; LAVRIK, I. N. Quantification of apoptosis and necroptosis at the single cell level by a combination of Imaging Flow Cytometry with classical Annexin V/ propidium iodide staining. **Journal of Immunological Methods**, v. 423, p. 99-103, 2015.

PIETKIEWICZ, S.; SCHMIDT, J. H.; LAVRIK, I. N. Quantification of apoptosis and necroptosis at the single cell level by a combination of imaging flow cytometry with classical annexin v/propidium iodide staining. **Journal of Immunological Methods**, v. 423, n. 99-103, 2015.

POONIA, K.; SIDDIQUI, S.; ARSHAD, M.; KUMAR, D. *In vitro* anticancer activities of Schiff base and its lanthanum complex. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 155, 146-154, 2016.

POPAT, K.; MCQUEEN, K.; FEELEY, T. W. The global burden of cancer. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 27, p. 399-408, 2013.

POPOVIĆ-BIJELIĆ, A.; KOWOL, C. R.; LIND, M. E.; LUO, J.; HIMO, F.; ENYEDY, É. A.; GRÄSLUND, A. Ribonucleotide reductase inhibition by metal complexes of Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone): A combined experimental and theoretical study. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 105, p. 1422-1431, 2011.

PORTT, L.; NORMAN, G.; CLAPP, C.; GREENWOOD, M.; GREENWOOD, M. T. Anti-apoptosis and cell survival: a review. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1813, p. 238-259, 2011.

PRAKASH, A.; ADHIKARI, D. Application of Schiff bases and their metal complexes-A Review. **International Journal Chemical Technology Research**, v. 3, 1891-1896, 2011.

PRINCIVAL, I. M. R. G.; FERREIRA, J. G.; SILVA, T. G.; AGUIAR, J. S.; PRINCIVAL, J. L. Synthesis and *in vitro* evaluation of (R), (S) and (R/S)-2-hexyne-1,4-diol, a natural product produced by fungus *Clitocybe catinus*, and related analogs as potential anticancer agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, p. 2839-2842, 2016.

PROHL, M.; SCHUBERT, U. S.; WEIGAND, W.; GOTTSCHALDT, M. Metal complexes of curcumin and curcumin derivatives for molecular imaging and anticancer therapy. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 307, p. 32-41, 2016.

QI, B.; MI, B.; ZHAI, X.; XU, Z.; ZHANG, X.; TIAN, Z.; GONG, P. Discovery and optimization of novel 4-phenoxy-6, 7-disubstituted quinolines possessing semicarbazones as c-Metkinase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 5246-5260, 2013.

QIU, B.; SIMON, M. C. Oncogenes strike a balance between cellular growth and homeostasis. **In Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 43, p. 3-10, 2015.

QI, J.; DENG, J.; QIAN, K.; TIAN, L.; LI, J.; HE, K.; WANG, Y. Novel 2-pyridinecarboxaldehyde thiosemicarbazones Ga (III) complexes with a high antiproliferative activity by promoting apoptosis and inhibiting cell cycle. **European journal of medicinal chemistry**, v. 134, p. 34-42, 2017.

QUATTRONE, F.; DINI, V.; BARBANERA, S.; ZERBINATI, N.; ROMANELLI, M. Cutaneous ulcers associated with hydroxyurea therapy. **Journal of Tissue Viability**, v. 22, p. 112-121, 2013.

QUIROGA, A. G.; RANNINGER, C. N. Contribution to the SAR Field of metallated and coordination complexes: studies of the palladium and platinum derivatives with selected thiosemicarbazones as antitumoral drugs. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 248, p. 119-133, 2004.

REGGI, E.; DIVIANI, D. The role of A-kinase anchoring proteins in cancer development. **Cellular Signalling**, v. 40, p. 143-155, 2017.

RAJAK, H.; DESHMUKH, R.; VEERASAMY, R.; SHARMA, A. K.; MISHRA, P.; KHARYA, M. D. Novel semicarbazones based 2, 5-disubstituted-1, 3, 4-oxadiazoles: One more step towards establishing four binding site pharmacophoric model hypothesis for anticonvulsant activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 4168-4172, 2010.

RAJAK, H.; THAKUR, B. S.; SINGH, A.; RAGHUVANSHI, K.; SAH, A. K.; VEERASAMY, R.; KHARYA, M. D. Novel limonene and citral based 2, 5-disubstituted-1, 3, 4-oxadiazoles: A natural product coupled approach to semicarbazones for antiepileptic activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, p. 864-868, 2013.

REN, S.; WANG, R.; KOMATSU, K.; BONAZ-KRAUSE, P.; ZYRIANOV, Y.; MCKENNA, C. E.; LIEN, E. J. Synthesis, biological evaluation, and quantitative structure-activity relationship analysis of new Schiff bases of hydroxysemicarbazide as potential antitumor agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 410-419, 2002.

RIVERA, M. C. A. 4NQO carcinogenesis: a model of oral squamous cell carcinoma. **International Journal of Morphology**, v. 30, p. 309-314, 2012.

RIVLIN, N.; BROSH, R.; OREN, M.; ROTTER, V. Mutations in the p53 tumor suppressor gene important milestones at the various steps of tumorigenesis. **Genes & Cancer**, v. 2, p. 466-474, 2011.

ROCHA, L. T. S.; COSTA, K. A.; OLIVEIRA, A. C. P.; NASCIMENTO, E. B.; BERTOLLO, C. M.; ARAÚJO, F.; COELHO, M. M. Antinociceptive, antiedematogenic and antiangiogenic effects of benzaldehyde semicarbazone. **Life Sciences**, v. 79, p. 499-505, 2006.

RODRIGUES, B. S.; ÁVILA, R. I.; BENFICA, P. L.; BRINGEL, L. P.; OLIVEIRA, C. M. A.; VANDRESEN, F.; VALADARES, M. C. 4-fluorobenzaldehyde limonene-based thiosemicarbazone induces apoptosis in Pc-3 human prostate cancer cells. **Life Sciences**, v. 203, p. 141-149, 2018.

ROMERO, N.; CASTRO, E. Inherited mutations in DNA repair genes and cancer risk. **Current Problems in Cancer**, v. 41, p. 251-264, 2017.

ROTTENBERG, Y.; NAEIM, A.; UZIELY, B.; PERETZ, T.; JACOBS, J. M. Breast cancer among older women: The influence of age and cancer stage on survival. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 76, p. 60-64, 2018.

SABHARWAL, R.; VERMA, P.; SYED, M. A.; SHARMA, T.; SUBUDHI, S. K.; MOHANTY, S.; GUPTA, S. Emergence of micronuclei as a genomic biomarker. **Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology**, v. 36, p. 212, 2015.

SALEM, A. A.; MACKENZIE, G. G. Pancreatic cancer: a critical review of dietary risk. **Nutrition Research**, v. 52, p. 1-13, 2018.

SAMPATH, K.; SATHIYARAJ, S.; JAYABALAKRISHNAN, C. Evaluation of DNA-binding, DNA cleavage, antioxidant and cytotoxic activity of mononuclear ruthenium(II) carbonyl complexes of benzaldehyde 4-phenyl-3-thiosemicarbazones. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 115, p. 287-296, 2013.

SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, C.; GELBERT, L. M.; LALLENA, M. J.; DIOS, A. Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors as anticancer drugs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, p. 3420-3435, 2015.

SANTANA, T. I.; BARBOSA, M. O.; GOMES, P. A. T. M.; CRUZ, A. C. N.; SILVA, T. G.; LEITE, A. C. L. Synthesis, anticancer activity and mechanism of action of new thiazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 144, p. 874-886, 2018.

SANTOS, J. A. M.; SANTOS, C. S.; ALMEIDA, C. L. A.; SILVA, T. D. S.; FILHO, J. R. F.; MILITÃO, G. C. G.; SILVA, T. G.; CRUZ, C. H. B.; FREITAS, J. C. R.; MENEZES, P. H. Structure-based design, synthesis and antitumoral evaluation of enulosides. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 128, p. 192-201, 2017.

SARTORELLI, A. C.; AGRAWAL, K. C.; MOORE, E. C. Mechanism of inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by α -(n)-heterocyclic aldehyde thiosemicarbazones. **Biochemical Pharmacology**, v. 20, p. 3119-3123, 1971.

SCHELLHAUS, A. K.; MAGISTRIS, P.; ANTONIN, W. Nuclear reformation at the end of mitosis. **Journal of Molecular Biology**, v. 428, p. 1962-1985, 2016.

SCHUG, Z. T.; VOORDE, J. V.; GOTTLIEB, Eyal. The nurture of tumors can drive their metabolic phenotype. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 3, p. 391-392, 2016.

SHALINI, M.; YOGESHWARI, P.; SRIRAM, D.; STABLES, J. P. Cyclization of the semicarbazone template faryl semicarbazones: synthesis and anticonvulsant activity of 4,5-diphenyl-2H-1,2,4-triazol-3(4H)-one. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 63, p. 187-193, 2009.

SHAO, H.; SHI, S.; FOLEY, D. W.; LAM, F.; ABBAS, A. Y.; LIU, X.; HUANG, S.; JIANG, X.; BAHARIN, N.; FISCHER, P. M. WANG, S. Synthesis, structure-activity relationship and biological evaluation of 2,4,5-trisubstituted pyrimidine CDK inhibitors as potential anti-tumour agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 70, p. 447-455, 2013.

SHARMA, S.; KELLY, T. K.; JONES, P. A. Epigenetics in cancer. **Carcinogenesis**, v. 31, p. 27-36, 2010.

SHEIKH, B. Y.; SARKER, M. M. R.; KAMARUDIN, M. N. A.; MOHAND, G. Antiproliferative and apoptosis inducing effects of citral via p53 and ROS-induced mitochondrial-mediated apoptosis in human colorectal HCT116 and HT29 cell lines. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 834-846, 2017.

SHINODA, W. Permeability across lipid membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1858, p. 2254-2265, 2016.

SHUKLA, S.; SRIVASTAVA, R. S.; SHRIVASTAVA, S. K.; SODHI, A.; KUMAR, P. Synthesis, molecular docking and biological evaluation of 4-cycloalkylideneamino 1, 2-naphthoquinone semicarbazones as anticancer agents. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, p. S1040-S1046, 2012.

SIDDIQUI, W. A.; AHAD, A.; AHSAN, H. The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. **Archives of Toxicology**, v. 89, p. 289-317, 2015.

SINHA, S. K.; SHRIVASTAVA, S. K. Synthesis, evaluation and molecular dynamics study of some new 4-aminopyridine semicarbazones as an anti-amnesic and cognition enhancing agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 5451-5460, 2013.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, p. 1107-1112, 1990.

SMITH, B. D.; KARP, J. E. Ribonucleotide reductase: an old target with new potential. **Leukemia Research**, v. 27, p. 1075-1076, 2003.

SOARES, M. A.; LESSA, J. A.; MENDES, I. C.; SILVA, J. G.; SANTOS, R. G.; SALUM, L. B.; PESQUERO, J. L. *N*⁴-Phenyl-substituted 2-acetylpyridine thiosemicarbazones: Cytotoxicity against human tumor cells, structure–activity relationship studies and investigation on the mechanism of action. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 3396-3409, 2012.

SOARES, R. O.; ECHEVARRIA, A.; BELLINENY, M. S.; PINHO, R. T.; LEO, R. M.; SEGUINS, W. S.; LEON, L. L. Evaluation of thiosemicarbazones and semicarbazones as potential agents anti-*Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v. 129, p. 381-387, 2011.

SUDHAKAR, A. History of cancer, ancient and modern treatment methods. **Journal of Cancer Science & Therapy**, v. 1, p. 1-4, 2009.

STEWART, B.W.; WILD, C.P. World Cancer Report 2014. Lyon: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, 2014.

SUNIL, D.; ISLOOR, A. M.; SHETTY, P.; NAYAK, P. G.; PAI, K. S. R. *In vivo* anticancer and histopathology studies of Schiff bases on Ehrlich ascitic carcinoma cells: 1st cancer update. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 6, p. 25-33, 2013.

SUN, H.; TSAI, Y.; NOWAK, I.; DERTINGER, S. D.; WU, J. D.; CHEN, Y. Response kinetics of radiation-induced micronucleated reticulocytes in human bone marrow culture. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 718, p. 38-43, 2011.

SZTANKE, K.; MAZIARKA, A.; OSINKA, A.; SZTANKE, M. An insight into synthetic Schiff bases revealing antiproliferative activities *in vitro*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 3648-3666, 2013.

TARRICONE, R.; RICCA, G.; NYANZI-WAKHOLI, B.; MEDINA-LARA, A. Impact of cancer anorexia-cachexia syndrome on health-related quality of life and resource utilisation: A systematic review. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 99, p. 49-62, 2016.

TEMRAZ, M. G.; ELZAHAR, P. A.; BEKHIT, A. E. D. A.; BEKHIT, A. A.; LABIB, H. F.; BELAL, A. S. Anti-leishmanial click modifiable thiosemicarbazones: Design, synthesis, biological evaluation and *in silico* studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 151, p. 585-600, 2018.

TOWER, J. Programmed cell death in aging. **Ageingrese Archreviews**, v. 23, p. 90-100, 2015.

TU, Y.; WANG, C.; XU, S.; LAN, Z.; LI, W.; HAN, J.; ZHOU, Y.; ZHENG, P.; ZHU, W. Design, synthesis, and docking studies of quinazoline analogues bearing aryl semicarbazone scaffolds as potent EGFR inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, p. 3148-3157, 2017.

TUTONE, M.; ALMERICO, A. M. Recent advances on CDK inhibitors: An insight by means of *in silico* methods. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 142, p. 300-315, 2017.

VARTHOLOMATOS, G.; ALEXIOU, G. A.; STEFANAKI, K.; LYKOUDIS, E. G.; TSEKA, G.; TZOUFI, M.; SFAKIANOS, G.; PRODROMOU, N. The value of cell cycle analysis by propidium-iodine staining of CD56⁺ cells in pediatric brain tumors. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 133, p. 70-74, 2015.

VELEZHEVA, V.; BRENNAN, P.; IVANOV, P.; KORNIENKO, A.; LYUBIMOV, S.; KAZARIAN, K.; APT, A. Synthesis and antituberculosis activity of indole-pyridine derived hydrazides, hydrazide-hydrazones, and thiosemicarbazones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, p. 978-985, 2016.

VENKATACHALAM, T. K.; BERNHARDT, P. V.; NOBLE, C. J.; FLETCHER, N.; PIERENS, G. K.; THURECHT, K. J.; REUTENS, D. C. Synthesis, characterization and biological activities of semicarbazones and their copper complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 162, p. 295-308, 2016.

VERAS, M. L.; BEZERRA, M. Z. B.; LEMOS, T.; LIN, G.; UCHOA, D. E. A.; BRAZFILHO, R.; CHAI, H. B.; CORDEL, G. A.; PESSOA, O. D. Cytotoxic Withaphysalins from the leaves of *Acnistus arborescens*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 4, p. 710-713, 2004.

VIDYASAGAR, M. Probabilistic methods in cancer biology. **European Journal of Control**, v. 5, p. 483-511, 2011.

VIEIRA, A. E. D.; ARAUJO, G. L.; GALASSI, C. M.; RODRIGUES, R. F.; CASSALLI, G. D.; KAISER, M.; TAGLIATI, C. A. Toxicological, toxicokinetic and gastroprotective evaluation of the benz aldehyde semicarbazone. **Food and Chemical Toxicology**, v. 55, p. 434-443, 2013.

VIEIRA, R. P.; LESSA, J. A.; FERREIRA, W. C.; COSTA, F. B.; BASTOS, L. F.; ROCHA, W. R.; BERALDO, H. Influence of susceptibility to hydrolysis and hydrophobicity of arylsemicarbazones on their anti-nociceptive and anti-inflammatory activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, p. 140-148, 2012.

WALLER, A.; FORSHAW, K.; BRYANT, J.; CAREY, M.; BOYES, A.; SANSON-FISHER, R. Preparatory education for cancer patient sun der going surgery: A systematic review of volume and quality of research output over time. **Patient Education and Counseling**, v. 98, p. 1540-1549, 2015.

WALTER, H. S.; AHMED, S. Targeted therapies in cancer. **Surgery**, v. 36, p. 122-127, 2018.

WANG, X.; XU, W.; FAN, M.; MENG, T.; CHEN, X.; JIANG, Y.; ZHU, D.; HU, W.; GONG, J.; FENG, S.; WU, J.; LI, Y. Deoxynivalenol induces apoptosis in PC12 cells via the mitochondrial pathway. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 43, p. 193-202, 2016.

WANI, W. A.; BAIG, U.; SHREAZ, S.; SHIEKH, R. A.; IQBAL, P. F.; JAMEEL, E.; HUN, L. T. Recent advances in iron complexes as potential anticancer agents. **New Journal of Chemistry**, v. 40, p. 1063-1090, 2016.

WENPING, X.; WANG, B.; YANG, M.; ZHANG, Y.; XU, Z.; YANG, Y.; CAO, H.; TAO, L. Tebufenozide induces G1/S cell cycle arrest and apoptosis in human cells. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 49, p. 89-96, 2017.

WHITTAKER, S. R.; MALLINGER, A.; WORKMAN, P.; CLARKE, P. A. Inhibitors of cyclin-dependent kinases as cancer therapeutics. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 173, p. 83-105, 2017.

WU, S.; LIU, X.; ZHOU, X.; LIANG, X. M.; GAO, D.; LIU, H.; ZHAO, G.; ZHANG, Q.; WU, X. Quantification of cell viability and rapid screening anti-cancer drug utilizing nanomechanical fluctuation. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 77, p. 164-173, 2016.

XU, X. L.; DAN, L.; CHEN, W.; ZHU, S. M.; MAO, W. M. Neoadjuvant chemoradiotherapy or chemotherapy followed by surgeryis superior to that followed by definitive chemoradiation or radiotherapy in stage IIIA (N2) nonsmall-cell lung cancer: a meta-analysisand system review. **Onco Targets and Therapy**, v. 16, p. 845-853, 2016.

YALOWICH, J. C.; WU, X.; ZHANG, R.; KANAGASABAI, R.; HORNBAKER, M.; HASINOFF, B. B. The anticancer thiosemicarbazones Dp44mT and triapine lack inhibitory effects as catalytic inhibitors or poisons of DNA topoisomerase II α . **Biochemical pharmacology**, v. 84, p. 52-58, 2012.

YOGEE SWARI, P.; SRIRAM, D.; VEENA, V.; KAVYA, R.; RAKHRA, K.; RAGAVENDRAN, J. V.; STABLES, J. P. Synthesis of aryl-semicarbazones as potential anticonvulsant agents. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 59, p. 51-55, 2005.

YI, Q. Y.; WAN, D.; TANG, B.; WANG, Y. J.; ZHANG, W. Y.; DU, F.; HE, M.; LIU, Y. J. Synthesis, characterization and anticancer activity *in vitro* and *in vivo* evaluation of an iridium (III) polypyridyl complex. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 145, p. 338-349, 2018.

YU, Y.; KALINOWSKI, D. S.; KOVACEVIC, Z.; SIAFAKAS, A. R.; JANSSON, P. J.; STEFANI, C.; RICHARDSON, D. R. Thiosemicarbazones from the old to new: iron chelators that are more than just ribonucleotide reductase inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, p. 5271-5294, 2009.

ZABERNIGG, A.; GIESINGER, J. M.; PALL, G.; GAMPER, E. M.; GATTRINGER, K.; WINTNER, L. M.; SZTANKAY, M. J.; HOLZNER, B. Quality of life across chemotherapy lines in patients with cancers of the pancreas and biliary tract. **BMC Cancer**, v. 12, p. 1-8, 2012.

ZHAI, X.; BAO, G.; WANG, L.; CHENG, M.; ZHAO, M.; ZHAO, S.; ZHOU, H.; GONG, P. Design, synthesis and biological evaluation of novel 4-phenoxy-6,7-disubstituted quinolines possessing (thio)semicarbazones as c-Met kinase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, p. 1331-1345, 2016.

ZHANG, Z.; CHENG, X.; GUI, T.; TAO, J.; HUANG, M.; ZHU, L.; LUO, M.; CAO, P.; WAN, G. Wenshen Xiaozheng Tang induces apoptosis and inhibits migration of ectopic endometriotic stromal cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, p. 386-394, 2016.

ZHAO, Y.; GUO, C.; WANG, L.; WANG, S.; LI, X.; JIANG, B.; WU, N.; GUO, S.; ZHANG, R.; LIU, K.; SHI, D. A novel fluorinated thiosemicarbazone derivative-2-(3, 4-difluorobenzylidene) hydrazinecarbothioamide induces apoptosis in human A549 lung cancer cells via ROS-mediated mitochondria-dependent pathway. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 491, p. 65-71, 2017.

ZHAO, M.; JINGCHUN, S.; ZHONGMING, Z. TSGene: a web resource for tumor suppressor genes. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. D970-D976, 2013.

ZHU, L.; ZHOU, B.; CHEN, X.; JIANG, H.; SHAO, J.; YEN, Y. Inhibitory mechanisms of heterocyclic carboxaldehyde thiosemicarbazones for two forms of human ribonucleotide reductase. **Biochemical Pharmacology**, v. 78, p. 1178-1185, 2009.

ZHU, X. H.; SUN, J.; WANG, S.; BU, W.; YAO, M. N.; GAO, K.; SONG, Y.; ZHAO, J. Y.; LU, C. T.; ZHANG, E. H.; YANG, Z. F.; WEN, A. D. Synthesis, crystal structure, superoxide scavenging activity, anticancer and docking studies of novel adamantyl nitroxide derivatives. **Journal of Molecular Structure**, v. 1108, p. 611-617, 2016.

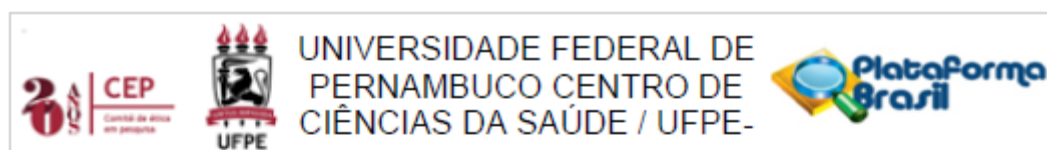
ZHU, Z.; LIU, W.; GOTLIEB, V. The rapidly evolving therapies for advanced melanoma-Towards immunotherapy, molecular targeted therapy, and beyond. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 99, p. 91-99, 2016.

ZIJIAN, L.; CHENXUE, Y. A mathematical model of cancer treatment by radiotherapy followed by chemotherapy. **Mathematics and Computers in Simulation**, v. 124, p. 1-15, 2016.

ZIVNY, J.; KLENER JR, P.; PYTLIK, R.; ANDERA, L. The role of apoptosis in cancer development and treatment: focusing on the development and treatment of hematologic malignancies. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, p.11-33, 2010.

ZONGA, A.; CAO, H.; WANG, F. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 1395-1410, 2012.

ANEXO A - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da citotoxicidade, mutagenicidade e do potencial anticâncer de novos derivados aril-semicarbazônicos e aril-tiossemicarbazônicos.

Pesquisador: Anne Cecília Nascimento da Cruz

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 67004017.3.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Final

Detalhe:

Justificativa: Envio de Relatório Final.

Data do Envio: 20/04/2018

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.625.080

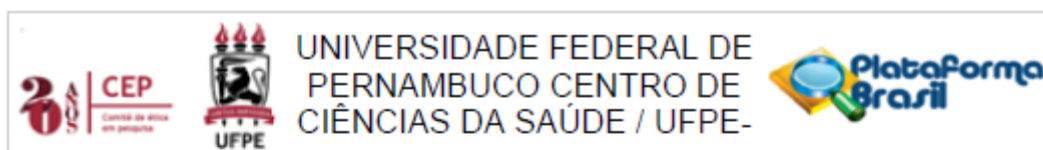
Apresentação da Notificação:

Trata-se do relatório final de pesquisa realizado pela pesquisadora Anne Cecília Nascimento da Cruz sob a orientação da Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silveira, do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco. A temática desenvolvida é a avaliação da toxicidade e potencial farmacológico de novos derivados aril-semicarbazônicos e aril-tiossemicarbazônicos. O mesmo teve como objetivo geral determinar o potencial anticâncer de novos derivados aril-semicarbazônicos e aril-tiossemicarbazônicos.

Objetivo da Notificação:

Apresentar relatório final da pesquisa "Avaliação da citotoxicidade, mutagenicidade e do potencial anticâncer de novos derivados aril-semicarbazônicos e aril-tiossemicarbazônicos".

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-800
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2128-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.625.080

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios foram apresentados no projeto inicial e estão em consonância com o que foi desenvolvido no estudo.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

O relatório está bem escrito, segue o que foi determinado no projeto e discute os pontos principais e resultados do estudo em questão.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O relatório apresentado segue o modelo do CEP/UFPE, apresentando dados gerais dos voluntários, metodologia desenvolvida e conclusões do estudo.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Relatório Final foi analisado e APROVADO pelo colegiado do CEP.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Final	RelatorioFinal.docx	20/04/2018 11:14:52	Anne Cecília Nascimento da Cruz	Postado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 27 de Abril de 2018

Assinado por:
Gisele Cristina Sena da Silva Pinho
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br

ANEXO B – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 01 de setembro de 2017.

Ofício nº 90/17

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof.^a Teresinha Gonçalves da Silva**

Departamento de Antibióticos

Centro de Biociências

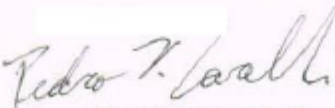
Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 23076.015286/2017-04

Certificamos que a proposta intitulada “Avaliação da citotoxicidade, mutagenicidade e do potencial anticâncer de novos derivados aril-semicarbazônicos e aril-tiossemicarbazônicos”, registrada com o nº 23076.015286/2017-04, sob a responsabilidade de Prof.^a Teresinha Gonçalves da Silva - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 30/08/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/09/2017 a 30/01/2018
Espécie/linhagem/raça	Camundongos heterogênicos Swiss
Nº de animais	102
Peso/Idade	25-30g/60 dias
Sexo	Machos (65) e fêmeas (37)
Origem	Biotério do Departamento de Antibióticos – CB/UFPE

Atenciosamente,


Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPE 1801584