

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

THIAGO ANDRÉ RAMOS DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICÂNCER E IMUNOMODULADORA DE
DERIVADOS DA FTALIMIDA:
*abordagens in vitro e in silico***

Recife
2018

THIAGO ANDRÉ RAMOS DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICÂNCER E IMUNOMODULADORA DE
DERIVADOS DA FTALIMIDA:
*abordagens in vitro e in silico***

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

Área de concentração: Fármacos, medicamentos e insumos essenciais para a saúde.

Orientadora: Dr.^a Valéria Rêgo Alves Pereira

Coorientador: Dr. Marcelo Zaldini Hernandez

Coorientador: Dr. Marcelo Montenegro Rabello

Recife

2018

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

Santos, Thiago André Ramos dos

Avaliação da atividade anticâncer e imunomoduladora de derivados da ftalimida :
abordagens *in vitro* e *in silico* / Thiago André Ramos dos Santos. – 2018.

104 f. : il.

Orientadora: Dr^a. Valéria Rêgo Alves Pereira.

Coorientador: Dr. Marcelo Zaldini Hernandez.

Coorientador: Dr. Marcelo Montenegro Rabello.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências.
Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2018.

Inclui referências e anexos.

1. Câncer. 2. Cólon (Anatomia) - Câncer 3. Química medicinal. I. Pereira, Valéria Rêgo Alves (Orientadora). II. Hernandez, Marcelo Zaldini (Coorientador). III. Rabello, Marcelo Montenegro (Coorientador). IV. Título.

616.994

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 439

THIAGO ANDRÉ RAMOS DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICÂNCER E IMUNOMODULADORA DE
DERIVADOS DA FTALIMIDA:
*abordagens in vitro e in silico***

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

Aprovada em: 16 / 05 / 2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. ^a Dr.^a Valéria Pereira Hernandez (Presidente e examinadora interna)
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Prof. ^a Dr.^a Máira Galdino da Rocha Pitta (Examinadora interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Mardonny Bruno O. Chagas (Examinador externo)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dr. Klaus Ribeiro Cavalcante (Examinador externo)
Centro Universitário dos Guararapes (UniFG)

Dr. ^a Sílvia Maria Lucena Montenegro (Examinadora externa)
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Dedico este trabalho à Aline Santos, Isabel Viana, Letícia Scorsi e Valéria Pereira, sem o suporte das quais ele não estaria finalizado.

AGRADECIMENTOS

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

A meu Pai Heleno, minha mãe Nair e meu irmão Lucas, por todo o apoio durante a execução desse trabalho e sempre;

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

Aos orientadores Dr. Marcelo Montenegro e Dr. Marcelo Zaldini, por todo o suporte e aprendizado nos ensaios *in silico*;

À orientadora extra-oficial e esposa Aline Santos por toda a paciência e suporte;

À professora Dr^a Ana Cristina Lima Leite, bem como a todo o time do Laboratório de Planejamento em Química Medicinal (LPQM/UFPE), pela colaboração neste (e em outros) trabalhos;

Aos amigos do Laboratório de Imunogenética (LIImg);

Aos amigos do Laboratório de Química Teórica Medicinal (LQTM/UFPE);

Ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica (PPGIT), na pessoa de sua coordenadora, prof.^a Dr^a Máira Galdino da Rocha Pitta, pela oportunidade e apoio em tudo. Ao secretário do PPGIT, Paulo Germano, pela ajuda e presteza sempre que houve necessidade;

À FACEPE pelo período de bolsa de doutorado concedida;

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

RESUMO

O câncer continua sendo uma das principais causas de morte em todo o mundo, tendo causado 8,8 milhões de mortes apenas em 2015, sendo o câncer colorretal o terceiro mais prevalente. A talidomida é um composto sintético mais conhecido pelo seu envolvimento em um grande desastre farmacológico, após a sua indicação para o enjoo matinal em gestantes. Apesar desse notório episódio envolvendo efeitos teratogênicos, a talidomida foi redescoberta e atualmente está sendo utilizada para o tratamento de algumas doenças. Notavelmente, a estrutura da talidomida pode servir como um interessante esqueleto molecular para o desenvolvimento de novos derivados ftalimídicos, que podem apresentar uma vasta gama de efeitos farmacológicos, incluindo propriedade antineoplásica, epigenética, antiangiogênica e anti-inflamatória. O objetivo deste trabalho foi avaliar uma série de compostos análogos à talidomida quanto aos seus efeitos antitumoral e imunomodulatório através de abordagens *in vitro* e *in silico*. A série é constituída por 14 compostos, contendo um núcleo ftalimídico comum e variando em alguns substituintes. Os efeitos citotóxicos foram avaliados com três linhagens tumorais de câncer de cólon e em células Vero. A seletividade dos compostos para as células das linhagens tumorais também foi determinada. O ensaio por citometria com *beads* (CBA) foi utilizado para quantificação de citocinas dos perfis Th1, Th2 e Th17 em sobrenadantes de esplenócitos de camundongo estimulados com cada composto, nas respectivas CC₅₀, após 24 h, 48 h, 72 h e seis dias de incubação. Os compostos testados revelaram toxicidade e seletividade para as células das linhagens tumorais quando comparados à Talidomida, com valores de CC₅₀ variando entre 25 µL e 274,9 µL. Os compostos testados também demonstraram marcantes efeitos imunomodulatórios, especialmente na modulação de TNF e IL-10, citocinas chave no desenvolvimento e progressão do câncer colorretal. Para avaliar a possível correlação entre os efeitos *in vitro* e a proteína IKKβ, importante participante da rota de sinalização de NF-κB, foram realizados ensaios *in silico*. Através do método de *docking* molecular, foi possível descrever as interações moleculares entre os compostos da série AS e resíduos de aminoácidos no sítio ativo da proteína IKKβ, que demonstraram boa correlação com os resultados obtidos *in vitro*. Após análise de todos os resultados, o composto AS-11 destacou-se, apresentando melhor toxicidade, seletividade e elevada indução da redução da produção de TNF quando

comparada aos demais compostos da série. Os resultados corroboram as atividades anticâncer e imunomodulatória dos análogos da talidomida, com uma possível interação com a proteína IKK β , que necessitará ser melhor investigada.

Palavras-chave: Câncer de cólon. Ftalimida. IKK β . Imunomodulação.

ABSTRACT

Cancer remains a major cause of death worldwide and was the cause of 8.8 million deaths in 2015, and colorectal cancer is the third most prevalent. Thalidomide is a synthetic compound most known for its involvement in a big pharmacological disaster, after its use for morning sickness by pregnant women. Despite this notorious episode involving teratogenesis, thalidomide was rediscovered, and now is used for the treatment of many diseases. Notably, thalidomide structure may serve as an interesting scaffold for development of new phthalimide derivatives that may present a diverse amount of pharmacologic effects, including anti-neoplastic, epigenetic, anti-angiogenic and anti-inflammatory properties. The aim of this work was to evaluate a series of thalidomide analogs for its antitumor effects and immunomodulatory properties through *in vitro* and *in silico* approaches. The series concerns 14 molecules, which have a common phthalimide core and vary in some substituents. Cytotoxic effects were assessed with three colon cancer cell lines and Vero cells. Compounds selectivity for colon cancer cell was also determined. Cytometric Bead Array (CBA) was used to detect Th1, Th2 and Th17 cytokine profiles in supernatants of mice splenocytes stimulated with each compound at CC₅₀ after 24h, 48h, 72h and six days of incubation. Compounds tested revealed toxicity and selectivity to tumor cells when compared to thalidomide, with CC₅₀ values between 25 μ L e 274.9 μ L. Compounds also shown remarkable immunomodulatory effects, specially in the modulation of TNF and IL-10, key cytokines in development and progression of colorectal cancer. In order to evaluate a possible correlation between *in vitro* effects and the IKK β protein, an important player in NF- κ B signaling pathway, we performed molecular docking calculations with IKK β as target. Through molecular docking was possible to describe the molecular interactions between compounds from AS series and aminoacid residues in the active site of the protein IKK β , which demonstrated good correlation with *in vitro* results. After analyzing all results, compound AS-11 stood out, with the better toxicity, high selectivity and high induction of decrease TNF production when compared to the other series compounds. Results corroborate the expected anticancer and immunomodulatory activities of thalidomide analogs, with a possible interaction with IKK β protein.

Keywords: Colon Cancer. IKK β . Immunomodulation. Phthalimide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação espacial das taxas ajustadas de incidência por 100 mil homens (em A) e 100 mil mulheres (em B), estimadas para o ano de 2018, segundo Unidade da Federação (todas as neoplasias malignas, exceto as de pele não melanoma).	20
Figura 2. Características do câncer: seis capacidades características das células cancerígenas.....	22
Figura 3. As principais vias de sinalização que conduzem o desenvolvimento do câncer colorretal são mostradas entre as transições de cada estágio tumoral. Um dos vários genes controladores em cada via de sinalização pode estar alterado em um tumor individual. As idades dos paciente estão mostradas acima das setas vermelhas, e indicam o intervalo de tempo durante o qual os genes são usualmente mutados.....	24
Figura 4. Porcentagem dos tipos de tratamento utilizados no câncer de cólon nos Estados Unidos, em 2013.	24
Figura 5. Tumores como tecidos complexos. A – Visão reducionista. B – Concepção atual, considerando tanto as células tumorais como seu microambiente.....	26
Figura 6. Estrutura química representativa dos dois enantiômeros possíveis da talidomida.	28
Figura 7. Representação esquemática do mecanismo de ativação (A) e inibição (B) do fator de transcrição NF-κB.....	30
Figura 8. Imagem representativa de <i>docking</i> molecular. Um segmento da proteína humana Cereblon (em verde) em complexo com molécula Lenalidomida, mostrada isoladamente à direita. PDB ID: 4TZ4.	32
Figura 9. Produção da citocina TNF, detectada por CBA após 24 h, 48 h, 72 h e seis dias de incubação com os compostos AS-01 a AS-07 e no controle Basal.	44
Figura 10. Produção da citocina TNF, detectada por CBA após 24 h, 48 h, 72 h e seis dias de incubação com os compostos AS-08 a AS-14 e no controle basal.	45
Figura 11. Produção da citocina TNF, detectada por CBA após 24 h, 48 h, 72 h e seis dias de incubação com Lipopolissacarídeo (LPS), Talidomida (THA) e no controle Basal.....	46

Figura 12. Produção da citocina IL-10, detectada por CBA nos tempos de 24 h, 48 h, 72 h e seis dias.	47
Figura 13. Produção da citocina IL-4, detectada por CBA após incubação por 24 h, 48 h, 72 h e seis dias com os compostos e no controle Basal.	48
Figura 14. Possível alvo para os compostos da série AS.	49
Figura 15. Correlação observada entre os resultados de atividade antitumoral e resultados <i>in silico</i> (Scores de <i>docking</i>) para a linhagem tumoral HT-29.....	51
Figura 16. Correlação observada entre os resultados de atividade antitumoral e resultados <i>in silico</i> (Scores de <i>docking</i>) para a linhagem tumoral T84.....	51
Figura 17. Correlação observada entre os resultados de atividade antitumoral e resultados <i>in silico</i> (Scores de <i>docking</i>) para a linhagem tumoral Caco-2.	52
Figura 18. Imagens ilustrativas da estrutura do composto AS-01 (A) e das interações entre a molécula AS-01 e resíduos do sítio ativo da proteína IKK β (B) que interagem por contatos hidrofóbicos (em laranja).	54
Figura 19. Imagens ilustrativas da estrutura do composto AS-08 (A) e das interações entre a molécula AS-08 e resíduos do sítio ativo da proteína IKK β (B) por contatos hidrofóbicos (em laranja), cátion- π (em magenta) e ligação de hidrogênio (em verde).	55
Figura 20. Imagens ilustrativas da estrutura do composto AS-10 (A) e das interações entre a molécula AS-10 e resíduos do sítio ativo da proteína IKK β (B) por contatos hidrofóbicos (em laranja) e ligação de hidrogênio (em verde).....	56
Figura 21. Imagens ilustrativas da estrutura do composto AS-11 (A) e das interações entre a molécula AS-11 e resíduos do sítio ativo da proteína IKK β (B) por contatos hidrofóbicos (em laranja), cátion- π (em magenta) e ligação de hidrogênio (em verde).	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 entre homens, exceto pele não melanoma.	21
Tabela 2. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 entre mulheres, exceto pele não melanoma.	21
Tabela 3- Compostos da série AS e seus respectivos Pesos Moleculares (PM) em g/mol.	35
Tabela 4 - Valores de CC ₅₀ , após 72 horas de incubação, para cada composto da série AS sobre as linhagens tumorais T84, HT-29 e Caco-2; e sobre a linhagem controle Vero.	41
Tabela 5. Valores de seletividade para cada composto, relacionando cada linhagem tumoral com o a linhagem não tumoral (Vero).	43
Tabela 6. Valores de <i>score</i> obtidos após cálculo de <i>docking molecular</i> no alvo IKK β	50
Tabela 7. Interações moleculares previstas <i>in silico</i> entre o receptor IKK β e os compostos AS-01, AS-08, AS-10 e AS-11.	53

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

Å	Angstrom, unidade de medida do sistema métrico
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
APS	Gene APS (do inglês, <i>Adenomatous Polyposis Coli</i>)
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
Binana	Software de análise de ligações moleculares (do inglês, <i>Binding Analyzer</i>)
CBA	Ensaio Citométrico baseado em Beads (do inglês, <i>Cytometric Bead Array</i>)
CC ₅₀	Concentração Citotóxica para 50% da população celular
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CRC	Câncer Colorretal (do inglês, <i>Colorectal Cancer</i>)
DMEM	Meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco (do inglês, <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)
DMSO	Dimetilsulfoxido
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico (do inglês, <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>)
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (do inglês, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
FasL	Fas Ligante
FDA	Do inglês <i>Food and Drug Administration</i> (Agência Norte Americana de regulação de alimentos e medicamentos)
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
IFN-γ	Interferon γ
IKKβ	Inibidor do fator nuclear κB quinase subunidade beta (do inglês, <i>Inhibitor of Nuclear Factor κB Kinase subunit beta</i>)
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional de Câncer

LIMG	Laboratório de Imunogenética
LPS	Lipopolissacarídeo
LQTM	Laboratório de Química Teórica Medicinal
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade (do inglês, <i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
NF-κB	Fator Nuclear κB
NK	Células matadoras naturais (do inglês, <i>Natural Killer</i>)
NO	Óxido Nítrico (do inglês <i>Nitric Oxid</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDB	Banco de dados de proteínas (do inglês, <i>Protein Data Bank</i>)
PI3K	Via metabólica importante em diversos tipos de câncer
PPGIT	Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica
RAS	Família gênica RAS (do inglês, <i>Rat sarcoma</i> , tumor onde o primeiro membro da família gênica foi identificado)
RPMI	Do inglês <i>Roswell Park Memorial Institute</i>)
SBF	Soro Bovino Fetal
TGF-β	Fator de crescimento tumoral (do inglês, <i>Transforming Growth Factor</i>)
THA	Abreviação para Talidomida (do inglês, <i>Thalidomide</i>)
TNF	Fator de necrose tumoral (do inglês, <i>Tumor Necrosis Factor</i>)
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (do inglês, <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>)
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial (do inglês, <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVOS	18
1.1.1 Objetivo geral	18
1.1.2 Objetivos específicos.....	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 TERAPÊUTICA NO CÂNCER.....	19
2.2 CÂNCER – ASPECTOS GERAIS	20
2.3 CÂNCER DE CÓLON.....	23
2.4 CITOCINAS E IMUNOMODULAÇÃO	26
2.5 TALIDOMIDA: ESTRUTURA, HISTÓRIA E EFEITOS BIOLÓGICOS.....	28
2.6 METODOS COMPUTACIONAIS EM QUÍMICA MEDICINAL.....	30
3 METODOLOGIA	34
3.1 ABORDAGENS <i>IN VITRO</i>	34
3.1.1 Compostos Sintéticos.....	34
3.1.2 Linhagens Celulares	36
3.1.3 Obtenção de células esplênicas de camundongos BALB/c.....	36
3.1.4 Avaliação da citotoxicidade e atividade anticâncer pelo ensaio de MTT ..	37
3.1.5 Cálculo de seletividade.....	38
3.1.6 Dosagem de citocinas no sobrenadante de células.....	38
3.1.7 Análises estatísticas	38
3.2 ABORDAGENS <i>IN SILICO</i>	39
3.2.1 Obtenção dos compostos <i>in silico</i>	39
3.2.2 Seleção de possível receptor-alvo.....	39
3.2.3 Cálculos de <i>docking</i> molecular.....	39
3.2.4 Construção das figuras de <i>docking</i> molecular.....	40

4 RESULTADOS.....	41
4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTICÂNCER PELO ENSAIO DE MTT.....	41
4.2 ANÁLISE DE SELETIVIDADE.....	42
4.3 DOSAGEM DE CITOCINAS EM SOBRENADANTE DE CULTURA DE ESPLÊNOCITOS	43
4.3.1 Fator de Necrose Tumoral (TNF).....	43
4.3.2 Interleucina-10 (IL-10)	46
4.3.3 Interleucina-4 (IL-4)	47
4.3.4 Interleucina-2, interleucina-6, interleucina-17A e Interferon- γ (IL-2, IL-6, IL-17A e IFN- γ)	48
4.4 SCORE DE <i>DOCKING</i> MOLECULAR.....	48
4.5 CORRELAÇÕES ENTRE RESULTADOS <i>IN VITRO</i> E <i>IN SILICO</i>	50
4.6 INTERAÇÕES MOLECULARES <i>IN SILICO</i>	52
5 DISCUSSÃO	57
6 CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS.....	64
APÊNDICE A – MANUSCRITO SUBMETIDO.....	73
APÊNDICE B – MANUSCRITO PUBLICADO	99
ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO CEUA	105

1 INTRODUÇÃO

O câncer é a segunda principal causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo, com aproximadamente 8,8 milhões de mortes em 2015, sendo o câncer colorretal o terceiro mais comum (WHO, 2018).

A doença surge de um processo mutagênico que ocorre em múltiplas etapas, no qual as células cancerosas adquirem um conjunto comum de propriedades: potencial de proliferação ilimitado, auto-suficiência em sinais de crescimento, e resistência a sinais anti-proliferativos e de apoptose (LUO; SOLIMINI; ELLEDGE, 2009). Estas propriedades adquiridas podem ser causadas por erros de replicação, exposição a fatores ambientais e oncovírus, que conduzem a alterações genéticas e epigenéticas, bem como aberrações cromossômicas e interações heterotípicas alteradas (FOUAD; AANEI, 2017).

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

Ainda no contexto da química medicinal, há o conceito do reposicionamento de drogas, onde, com auxílio de métodos computacionais, são procurados novos usos para drogas já existentes, numa forma de “reciclagem” que pode ser centrada em diferentes paradigmas. Usualmente, as drogas utilizadas para este fim são medicamentos ainda presentes no mercado, ou que foram descontinuados (LIU *et al.*, 2013b). Exemplos como o sildenafil e a talidomida reforçam esta estratégia como uma abordagem promissora no desenvolvimento racional de novas formas terapêuticas (LIU *et al.*, 2013b).

Diversos trabalhos tem mostrado a ação de análogos da talidomida em variadas patologias, como as hematológicas, parasitárias, inflamatórias, vasculares e do trato gastro-intestinal, incluindo câncer (ALIABADI *et al.*, 2015; ALIANÇA *et al.*, 2017; DE MORAES GOMES *et al.*, 2016; DE OLIVEIRA CARDOSO *et al.*, 2015; FUMIAN *et al.*, 2016; HORVAT *et al.*, 2012; LINDNER; KRÖNKE, 2016). A ação antitumoral da talidomida tem recebido destaque entre os variados efeitos biológicos da molécula, juntamente com seu notável efeito imunomodulatório (LIU *et al.*, 2017; MORI *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2015).

A imunomodulação produzida por certos compostos sintéticos é de especial relevância neste sentido (FRIDMAN *et al.*, 2012). Pela ação direta sobre certos receptores de membrana, ou mesmo ao atingir proteínas citoplasmáticas envolvidas em cascatas de sinalização, tais moléculas podem agir na maquinaria que dirige o processo de produção de citocinas, interferindo diretamente no contexto imunológico do microambiente tumoral (BINDEA *et al.*, 2010; LIN; ZHANG, 2017).

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

Estas citocinas são produzidas tanto por células tumorais, como por células ativadas do estroma e células do sistema imune inato e adaptativo, em resposta a uma série de estresses celulares, incluindo danos induzidos por carcinógenos, infecção e inflamação (DRANOFF, 2004; MCLEAN *et al.*, 2011). Sendo assim, o uso de estratégias para modular o microambiente tumoral no hospedeiro, associadas a uma atividade antitumoral direta, constitui-se uma abordagem promissora (BAUDINO, 2015; GERMANO; ALLAVENA; MANTOVANI, 2008).

Neste trabalho, foram avaliados 14 compostos sintéticos com estrutura análoga à talidomida frente a três linhagens de câncer de cólon, HT-29, T84 e Caco-2, representando diferentes estágios de progressão tumoral. Além de sua atividade antitumoral direta, os compostos foram avaliados quanto à sua seletividade para as células tumorais, e quanto a seus efeitos imunomodulatórios através da quantificação de citocinas importantes no contexto do câncer: IL-2, -4, -6, -10, -17, TNF e IFN. Após os ensaios *in vitro*, foram realizados ensaios *in silico* visando estabelecer os mecanismos de interação entre os compostos e um possível alvo molecular, a proteína humana I κ B Cinase β (IKK β).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Investigar a atividade antitumoral e imunomoduladora de derivados da ftalimida.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade citotóxica dos compostos derivados da ftalimida sobre células Vero, determinando a CC_{50} (concentração citotóxica para 50% da cultura);
- Avaliar o efeito antitumoral dos compostos sobre três linhagens de câncer de cólon humano: HT-29, T84 e Caco-2, determinando a CC_{50} ;
- Determinar, a partir dos valores de CC_{50} obtidos em células tumorais e células Vero, o índice de seletividade;
- Quantificar, em sobrenadantes de esplenócitos estimulados com os compostos, a indução da produção das citocinas IL-2, -4, -6, -10, -17, TNF e IFN;
- Realizar, através de abordagens *in silico*, cálculos de *docking molecular*, utilizando como alvo a estrutura da proteína humana I κ B Kinase β (IKK β).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TERAPÊUTICA NO CÂNCER

Até a década de 1990, o desenvolvimento de drogas anticâncer foi baseado no teste de compostos derivados de uma variedade de fontes, incluindo análogos de substratos, produtos naturais e síntese combinatória, tipicamente usando ensaios de citotoxicidade *in vitro* seguidos de avaliação de toxicidade e eficácia *in vivo* (HAMBLEY, 2009).

Durante os últimos anos, houve avanços na terapêutica, através da utilização de agentes antitumorais projetados para interferir com um alvo molecular específico, tipicamente uma proteína, que se acredita ter um papel crítico no crescimento ou progressão tumoral (DRANITSARIS *et al.*, 2011; SAWYERS, 2004).

A chamada terapia alvo-específica (do inglês, *targeted therapy*) é uma abordagem recente e com efeitos positivos no tratamento do câncer. Essa terapia tem como objetivo a atuação da droga em determinados genes ou proteínas específicas de células tumorais ou dos tecidos vizinhos que promovem a proliferação (BAUDINO, 2015). Com essa atuação do quimioterápico de forma localizada, os efeitos colaterais podem ser minimizados. Esse modelo pode envolver o desenvolvimento de drogas que bloqueiam a proliferação celular ou promovam a regulação do ciclo celular, induzindo apoptose ou autofagia, de modo direcionado para as células tumorais (PADMA, 2015; ZENG *et al.*, 2016). Há três tipos principais de terapia direcionada: 1) anticorpos monoclonais, 2) pequenas moléculas inibidoras e 3) imunotoxinas (BAUDINO, 2015). Essas abordagens tem se mostrado bastante promissoras em vários tipos de câncer, incluindo o colorretal, além do câncer de pulmão, mama, linfomas e leucemias (BAUDINO, 2015).

O direcionamento molecular no tratamento do câncer é baseado na premissa de que as bases moleculares do câncer são associadas a uma ou mais anormalidades que dão origem a produção aumentada ou ativação de algumas moléculas e/ou produção diminuída ou inativação de outras (COLLINS; WORKMAN, 2006; COUSSENS *et al.*, 2017). Tem sido relatado algum sucesso na utilização desta estratégia, mas os casos são de pequeno número e também apresentam limitações significativas, tais como o rápido surgimento de resistência ao tratamento (HAMBLEY, 2009; PADMA, 2015). Além disso, o custo de todas essas novas

terapias alvo-específicas tem sido fixado a níveis que são várias vezes maiores do que quimioterapia tradicional (DRANITSARIS *et al.*, 2011; HAMBLEY, 2009).

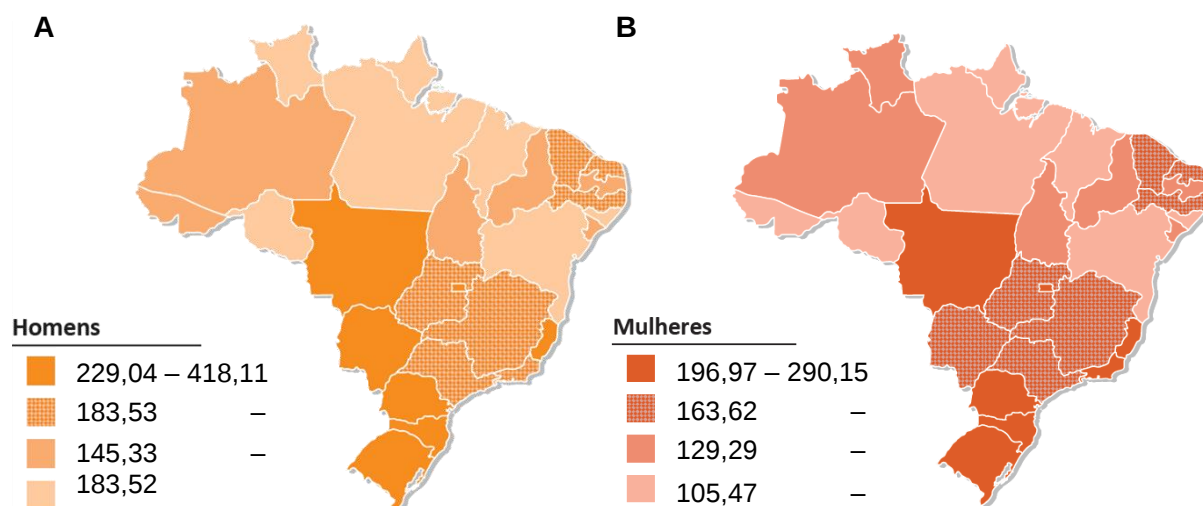
2.2 CÂNCER – ASPECTOS GERAIS

Câncer é o termo genérico para denominar um vasto grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento descontrolado e disseminado das células. Estas doenças podem afetar praticamente qualquer parte do corpo, e as células em crescimento desordenado podem atingir tecidos circundantes e metastatizar para locais distantes (PAGE *et al.*, 2017; WHO, 2011, 2018).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, com aproximadamente 14 milhões de novos casos apenas no ano de 2012, e responsável por 8,8 milhões de mortes em 2015. Dentre os tipos de câncer mais comuns, destacam-se: câncer de pulmão (1,69 milhões de mortes), câncer de fígado (788.000 mortes), câncer colorretal (774.000 mortes), câncer de estômago (754.000 mortes) e câncer mama (571.000 mortes).

No Brasil, o câncer tem sido uma das doenças responsáveis por um fenômeno chamado transição epidemiológica ou mudança do perfil epidemiológico, evidenciado nas últimas décadas. São forças propulsoras deste fenômeno as mudanças nas causas de mortalidade e morbidade, além de outras transformações demográficas, sociais e econômicas. Por se tratar de um país com dimensões continentais, o Brasil apresenta diferenças regionais marcantes quanto à incidência de casos de câncer (**Figura 1**).

Figura 1. Representação espacial das taxas ajustadas de incidência por 100 mil homens (em A) e 100 mil mulheres (em B), estimadas para o ano de 2018, segundo Unidade da



Federação (todas as neoplasias malignas, exceto as de pele não melanoma).

Fonte: INCA, 2017. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>.

As **tabelas 1 e 2** mostram a distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais comuns em homens e mulheres, respectivamente, estimados para o ano de 2018 de acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA).

Especificamente para casos novos de câncer de cólon e reto no Brasil, estima-se um número de 36.360 para cada ano do biênio 2018-2019 (INCA, 2017). Este é o terceiro tipo de câncer mais frequente entre os homens e o segundo entre as mulheres, sem considerar os tumores de pele não melanoma (INCA, 2017).

Tabela 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 entre homens, exceto pele não melanoma.

Localização primária	Casos	%	Homens
Próstata	68.220	31,7	
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7	
Cólon e Reto	17.389	8,1	
Estômago	13.540	6,3	
Cavidade Oral	11.200	5,2	
Esôfago	8.240	3,8	
Bexiga	6.690	3,1	
Laringe	6.390	3,0	
Leucemias	5.940	2,8	
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7	

Fonte: INCA, 2017.

Nota: Números arredondados para múltiplos de 10.

Tabela 2. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 entre mulheres, exceto pele não melanoma.

Localização primária	Casos	%	Mulheres
Mama Feminina	59.700	29,5	
Cólon e Reto	18.980	9,4	
Colo do Útero	16.370	8,1	
Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2	
Glândula Tireoide	8.040	4,0	
Estômago	7.750	3,8	
Corpo do Útero	6.600	3,3	
Ovário	6.150	3,0	
Sistema Nervoso Central	5.510	2,7	
Leucemias	4.860	2,4	

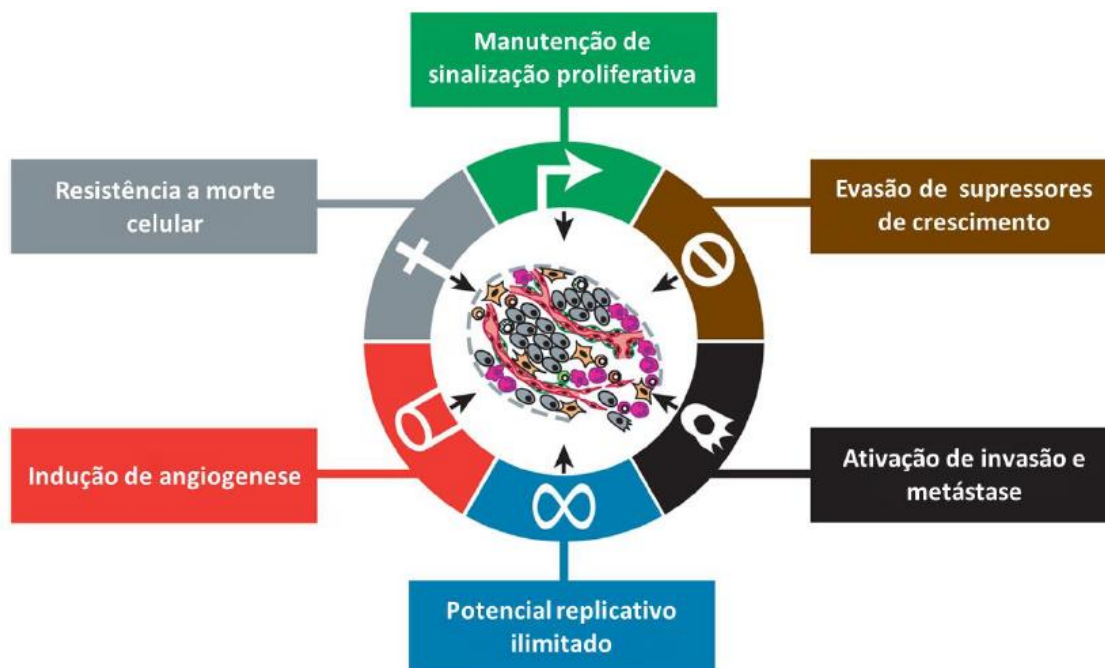
Fonte: INCA, 2017.

Nota: Números arredondados para múltiplos de 10.

O câncer surge de um processo mutagênico que ocorre em múltiplas etapas, no qual as células cancerosas adquirem um conjunto comum de propriedades: potencial de proliferação ilimitado, autossuficiência em sinais de crescimento, e resistência a sinais anti-proliferativos e de apoptose (LUO; SOLIMINI; ELLEDGE, 2009). Estas propriedades adquiridas podem ser causadas por erros de replicação, exposição a fatores ambientais e oncovírus, que conduzem a alterações genéticas e epigenéticas, bem como aberrações cromossômicas e interações heterotípicas alteradas (FOUAD; AANEI, 2017). Uma vez que essas células passam por ciclos de seleção clonal, há a aquisição de características cancerígenas, conhecidas como marcos do câncer (do inglês, “*Hallmarks of câncer*”) (FOUAD; AANEI, 2017).

Com o marcante progresso nas pesquisas envolvendo a biologia tumoral, esse conceito foi solidificado e estendido, tendo sido revisado em 2011 (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011). As características do câncer incluem: 1) manutenção de sinalização proliferativa, 2) evasão de supressores de crescimento, 3) ativação de invasão e metástase, 4) potencial replicativo ilimitado, 5) indução de angiogênese, 6) resistência à morte celular, 7) instabilidade genômica e mutação, 8) Inflamação promotora de tumor. Outras características, também foram descritas, incluindo: reprogramação do metabolismo energético e evasão da destruição pelo sistema imune (**Figura 2**) (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011).

Figura 2. Características do câncer: seis capacidades características das células cancerígenas.



Fonte: Adaptado de Hanahan; Weinberg, 2011.

2.3 CÂNCER DE CÓLON

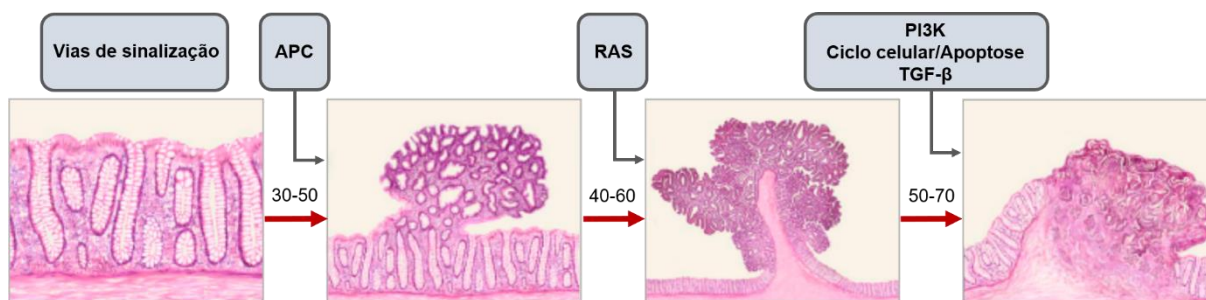
O câncer colorretal (CCR) afeta cerca de 250 mil pessoas por ano (QIN *et al.*, 2017). Em países industrializados, as chances de desenvolvimento dessa forma de câncer são de aproximadamente 5 % e o risco ao longo da vida de desenvolver um adenoma, um tumor não cancerígeno que pode evoluir em CCR, é de 20%. O intestino grosso humano é um local comum para o desenvolvimento desses adenocarcinomas e um dos ecossistemas microbianos mais densamente povoados do planeta (SEARS; GARRETT, 2014).

Apesar de sua elevada taxa de cura (70 – 90 %) quando devidamente diagnosticado e estando confinado, sem metástase, apresenta uma alta taxa de mortalidade. Tem crescido o interesse no estudo do papel da microbiota no desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais, bem como no desenvolvimento de CCR (LUO *et al.*, 2016; SEARS; GARRETT, 2014).

O CCR tem origem essencialmente genética, onde o acúmulo de mutações em oncogenes leva à alterações e proliferação das células epiteliais do cólon. Esse processo é lento, durando entre 10 e 40 anos, resultando inicialmente em adenocarcinomas, e, posteriormente, em alguns indivíduos, no câncer (MCLEAN *et al.*, 2011; SEARS; GARRETT, 2014). Na **figura 3**, é possível observar

características fenotípicas das diferentes fases de desenvolvimento do câncer de cólon, associadas às principais vias de sinalização que conduzem a sua progressão.

Figura 3. As principais vias de sinalização que conduzem o desenvolvimento do câncer colorretal são mostradas entre as transições de cada estágio tumoral. Um dos vários genes controladores em cada via de sinalização pode estar alterado em um tumor individual. As idades dos paciente estão mostradas acima das setas vermelhas, e indicam o intervalo de tempo durante o qual os genes são usualmente mutados.



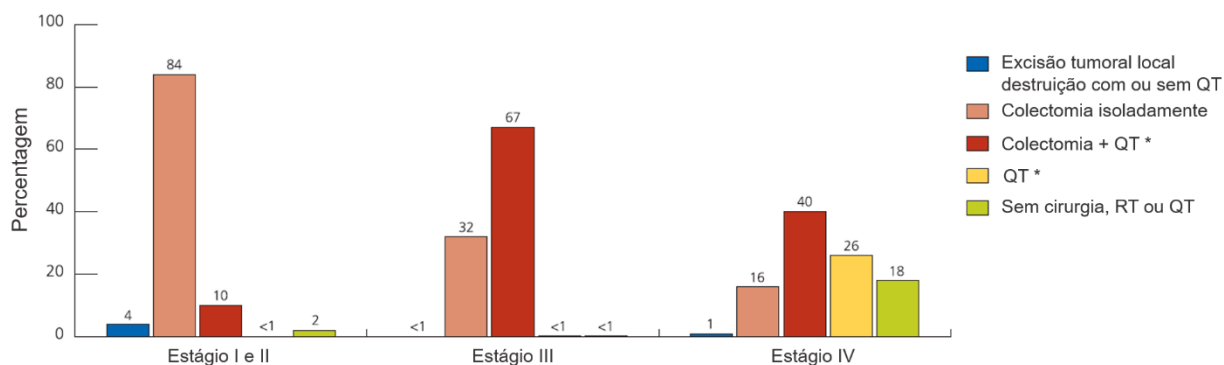
Fonte: Adaptado de SEARS; GARRETT, 2014.

Legenda: gene APC (do inglês, *adenomatous polyposis coli*); família gênica RAS (do inglês, Rat sarcoma, tumor onde o primeiro membro da família gênica foi identificado); PI3K, via metabólica importante em diversos tipos de câncer; TGF- β , fator de crescimento tumoral (do inglês, *transforming growth factor*).

Na colite crônica, uma das doenças inflamatórias intestinais cuja progressão está associada ao desenvolvimento de CCR, várias citocinas pró-inflamatórias são indicadas como promotoras da tumorigênese no cólon (LUO *et al.*, 2016; MCLEAN *et al.*, 2011; POPIVANOVA *et al.*, 2008).

O tratamento considerado mais eficiente e com menores chances de recidiva é a associação entre quimioterapia, imunoterapia e colectomia. A **figura 4** apresenta as porcentagens de tratamento do câncer de cólon por estágio de progressão tumoral em 2013, de acordo com números da Base de dados Nacional de Câncer (órgão dos Estados Unidos da América, *National Cancer Data Base*).

Figura 4. Porcentagem dos tipos de tratamento utilizados no câncer de cólon nos Estados Unidos, em 2013.



Fonte: Adaptado de Miller *et al.*, 2016.

Nota: QT significa quimioterapia (inclui imunoterapia e terapias alvo-específicas), RT significa radioterapia. * Um pequeno número destes pacientes recebeu RT. Os estágios apresentados (de I a IV) indicam fases de progressão tumoral: I- Tumor localizado, confinado; II- Tumor regional, mas com extensão unilateral; III- Comprometimento apenas dos linfonodos da região; IV- Tumor com extensão em ambas as direções e comprometimento dos linfonodos da região.

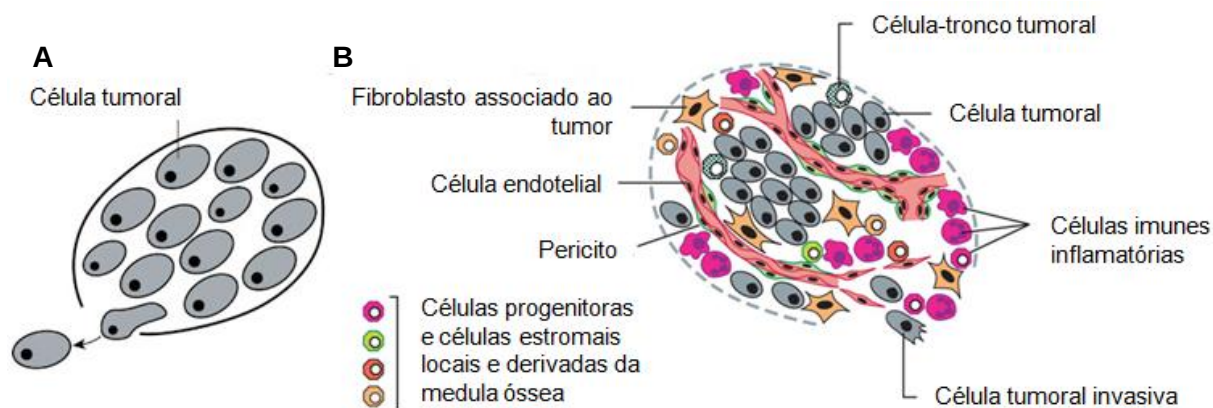
Os quimioterápicos utilizados, dependendo do estágio da doença, são combinações entre: oxiplatina, 5-fluorouracil, leucovorina, capecitabina e irinotecan. Além desses fármacos, na imunoterapia podem ser utilizados anticorpos monoclonais que têm como alvo o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF do inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor*) ou o Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR do inglês, *Epidermal Growth Fator Receptor*): bevacizumab, ramucirumab, cetuximab e panitumumab (MILLER *et al.*, 2016; TOPHAM *et al.*, 2004).

A imunoterapia de tumores sólidos, incluindo o câncer de cólon, apresenta uma série de desafios de maneira que a geração de uma resposta antitumoral eficaz ainda necessita de novas estratégias (QIN *et al.*, 2017). O sistema imunológico tem um papel chave no desenvolvimento de um vasto leque de tipos tumorais e, especialmente, no câncer de cólon (LUO; ZHANG, 2017; SERUGA *et al.*, 2008). Frequentemente, a presença de inflamação crônica nos tecidos intestinais, como no caso da colite crônica e da doença de Crohn, evolui para o câncer de cólon (LUO; ZHANG, 2017). Estratégias que bloqueiem a inflamação tem se mostrado promissoras no tratamento e prevenção destas condições (LUO; ZHANG, 2017; POPIVANOVA *et al.*, 2008). Nos últimos anos, abordagens utilizando compostos sintéticos e naturais tem sido desenvolvidas e testadas (AUGUSTIN *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2009; QIN *et al.*, 2017; REYES-ZURITA *et al.*, 2009).

2.4 CITOCINAS E IMUNOMODULAÇÃO

Diversos componentes do sistema imunológico desempenham papel chave tanto na patogênese como na terapêutica de variados tipos de câncer (FOUAD; AANEI, 2017; HANAHAN; WEINBERG, 2011; OGINO *et al.*, 2011). A ideia reducionista da massa tumoral como algo isolado do contexto do tecido que a abriga é cada vez mais refutada por descobertas científicas que demonstram que o tumor e o seu microambiente tem uma relação complexa e muitas vezes sensível (**Figura 5**) (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Figura 5. Tumores como tecidos complexos. A – Visão reducionista. B – Concepção atual, considerando tanto as células tumorais como seu microambiente.



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

Nota-se em muitos tumores sólidos que as células tumorais subvertem células do microambiente tumoral, notadamente os macrófagos, fazendo com que eles exerçam um papel protetor para o tumor (HANAHAN; COUSSENS, 2012; LUO; ZHANG, 2017; LUO *et al.*, 2016; TAN; COUSSENS, 2007). A inflamação crônica persistente presente em alguns tecidos, como o cólon, tem sido associada ao surgimento de tumores (SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011; TAN; COUSSENS, 2007). Não obstante, a progressão tumoral também é diretamente afetada pelo conjunto de componentes imunológicos presentes no microambiente tumoral (LUO; ZHANG, 2017; SOLINAS *et al.*, 2009).

Dentre os diversos elementos produzidos e secretados pelas células imunológicas presentes no tecido tumoral, uma atenção especial pode ser dada para as citocinas (FRIDMAN *et al.*, 2012; GERMANO; ALLAVENA; MANTOVANI, 2008;

NEURATH, 2014; SERUGA *et al.*, 2008). Estas proteínas podem ser entendidas como mensageiros moleculares que, ao serem reconhecidas por outras células, desencadeiam respostas mediadas por receptores. Não por acaso, abordagens utilizando citocinas tem sido implementadas no tratamento de certos tumores (DOUGAN; DRANOFF, 2009; LEE; MARGOLIN, 2011; VANNEMAN; DRANOFF, 2012). A imunomodulação produzida por certos compostos sintéticos é de especial relevância neste sentido (FRIDMAN *et al.*, 2012).

Pela ação direta sobre certos receptores de membrana, ou mesmo ao atingir proteínas citoplasmáticas envolvidas nas cascatas de sinalização, as citocinas podem agir nas maquinarias que dirigem o seu próprio processo de produção, interferindo diretamente no contexto imunológico do microambiente tumoral (BINDEA *et al.*, 2010; LIN; ZHANG, 2017).

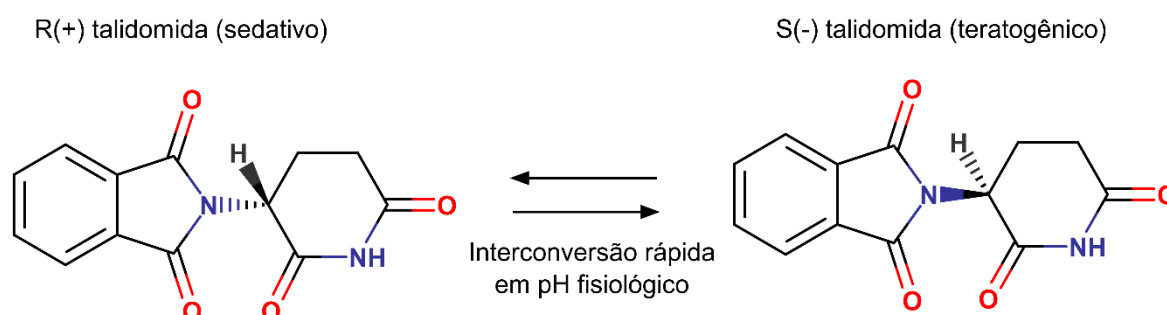
A imunoterapia já está estabelecida como um componente importante no esquema de tratamento de alguns tipos de câncer. Entre os tipos de imunoterapia estão a imunização parcial com anticorpos monoclonais, a introdução de adjuvantes no microambiente tumoral e a distribuição sistemática de citocinas (LESTERHUIS; HAANEN; PUNT, 2011; MILLER *et al.*, 2016).

A geração de uma imunidade anticâncer potente, específica e duradoura requer uma variedade de citocinas, que regulam importantes funções relacionadas ao balanço entre a rejeição do tumor por células efetoras antígeno-específicas e mecanismos de supressão que permitem que o tumor escape do sistema imunológico (DUNN; KOEBEL; SCHREIBER, 2006; LEE; MARGOLIN, 2011). Estas citocinas são produzidas tanto por células tumorais, como por células ativadas do estroma e células do sistema imune inato e adaptativo, em resposta a uma série de estresses celulares, incluindo danos induzidos por carcinógenos, infecção e inflamação (DRANOFF, 2004; LEE; MARGOLIN, 2011; LESTERHUIS; HAANEN; PUNT, 2011; MCLEAN *et al.*, 2011; MORVAN; LANIER, 2016). Sendo assim, o uso de estratégias para modular o microambiente tumoral no hospedeiro, associadas a uma atividade antitumoral direta, constitui uma abordagem interessante (BAUDINO, 2015; BINDEA *et al.*, 2014; GERMANO; ALLAVENA; MANTOVANI, 2008; KROEMER *et al.*, 2013; OGINO *et al.*, 2011).

2.5 TALIDOMIDA: ESTRUTURA, HISTÓRIA E EFEITOS BIOLÓGICOS

A talidomida consiste em uma bisimida, contendo um anel ftalimídico ligado à subunidade glutarimídica quiral, que foi originalmente lançado no final dos anos 1950 como sedativo não barbitúrico não viciante (MERCURIO *et al.*, 2017). Logo em seguida, também foi observada sua ação antiemética, sendo também utilizada para o tratamento de enjoo matinal em mulheres grávidas. (CASAL *et al.*, 2016; VARGESSON, 2015). A falta de conhecimento sobre os efeitos biológicos das duas formas enantioméricas (**Figura 6**) da talidomida levou a consequências devastadoras, com o surgimento de bebês com má-formação congênita após sua utilização. Não é possível estimar com precisão o alcance dos danos causados por esta droga (VARGESSON, 2015).

Figura 6. Estrutura química representativa dos dois enantiômeros possíveis da talidomida.



Fonte: Adaptado de Vargesson, 2015.

No início dos anos 1960, a talidomida foi finalmente removida do mercado, com exceção do Brasil (BERTOLINI; SUKHATME; BOUCHE, 2015; MERCURIO *et al.*, 2017). O desastre médico ocasionado pelo uso da talidomida mudou completamente a forma como as drogas são testadas (VARGESSON, 2015). Os primeiros casos de mal-formação associados a utilização da talidomida no Brasil foram reportados ainda na década de 1960 (VIANNA; SANSEVERINO; FACCINI, 2014). A catástrofe farmacológica causada pela talidomida continua sendo alarmante e, infelizmente, ainda acontece no Brasil (MORO; INVERNIZZI, 2017; VARGESSON, 2015; VIANNA; SANSEVERINO; FACCINI, 2014).

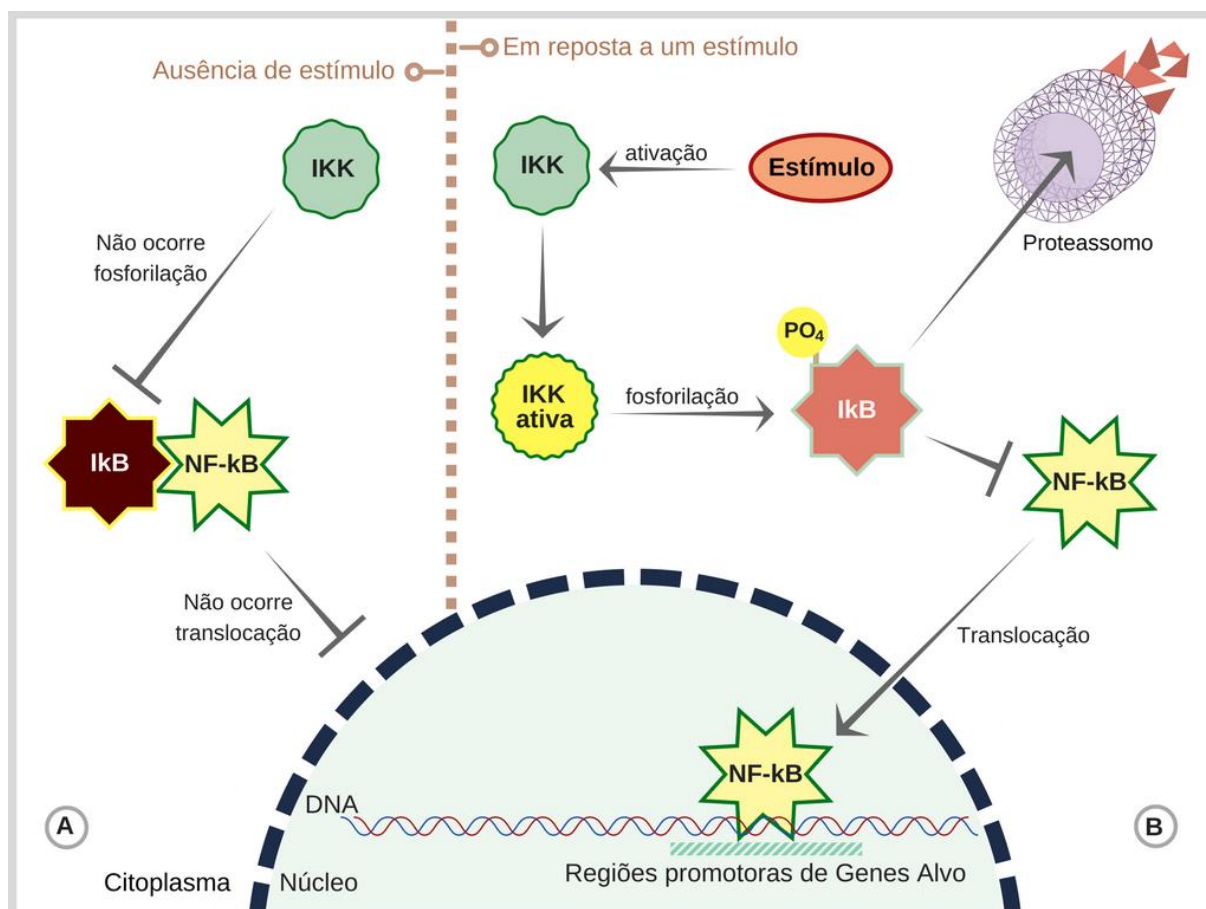
Apesar do efeito negativo causado pelos acontecimentos iniciais envolvendo a talidomida, observou-se já nos anos 1990 que este composto apresenta uma série

de efeitos biológicos que puderam ser aproveitados no tratamento de outras condições patológicas, como a hanseníase e o mieloma múltiplo (SHARMA *et al.*, 2010; VARGESSON, 2015). Outros efeitos farmacológicos foram amplamente investigados, como as atividades anti-inflamatória, antitumoral, antiangiogênica e antiviral (HASHIMOTO, 2008; SOUZA *et al.*, 2012). Dessa maneira, a talidomida é uma droga com diversos alvos, sendo considerado um modelo útil no desenvolvimento de vários tipos de medicamentos (HASHIMOTO, 2008).

Ao longo dos anos, vários grupos de pesquisa têm voltado seus esforços na síntese e triagem de compostos análogos à talidomida, que compartilham grupos farmacofóricos importantes para o desencadeamento de efeitos biológicos relevantes, bem como na sua influência em diversas rotas de sinalização intracelulares, notadamente pela influência na produção da citocina TNF (CHEN; DOHERTY; HSU, 2010; CHONG; CHAN, 2018; HASHIMOTO, 2008; SOUZA *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2015). Este processo, especificamente, tem sido creditado à ação destes derivados na rota de sinalização da molécula NF- κ B, especialmente na proteína cinase inibitória IKK β , uma I κ B cinase (KAMPMANN *et al.*, 2015).

De fato, a talidomida age não por interferência direta entre NF- κ B e sua ligação ao DNA, mas por inibir a molécula IKK β . Após a inibição de IKK β , a molécula inibitória endógena I κ B acaba por ligar-se fortemente a NF- κ B, impedindo sua translocação ao núcleo (ISRAEL, 2010b; KEIFER *et al.*, 2001). Uma representação simplificada deste processo pode ser visualizada na **figura 7**.

Figura 7. Representação esquemática do mecanismo de ativação (A) e inibição (B) do fator de transcrição NF- κ B.



Fonte: Elaborado pelo autor.

2.6 METODOS COMPUTACIONAIS EM QUÍMICA MEDICINAL

No processo de desenvolvimento e triagem de novos compostos bioativos, diversas abordagens são possíveis, entre elas as abordagens *in silico* (SLIWOSKI *et al.*, 2014). O termo *in silico* refere-se ao silício, componente presente nos chips de processamento dos computadores, e desta forma, remete a experimentos realizados através de métodos computacionais (LIU *et al.*, 2013b).

Estratégias *in silico* têm se mostrado muito úteis no processo de desenvolvimento de novas drogas, uma vez que permitem uma triagem de um grande número de moléculas sem a necessidade de síntese, o que reduz drasticamente os custos associados aos experimentos, quando comparado a métodos *in vitro* e *in vivo*, por exemplo (TIAN *et al.*, 2015).

O reposicionamento (ou reutilização) de drogas é uma estratégia na qual a utilização de métodos computacionais pode ser particularmente interessante. Nesta abordagem, são procurados novos usos para drogas já existentes, numa forma de “reciclagem” que pode ser centrada em diferentes paradigmas. Usualmente as drogas utilizadas para este fim são medicamentos já utilizados, ou que foram descontinuados (LIU *et al.*, 2013b; SANSEAU; KOEHLER, 2011; SHAMEER; READHEAD; DUDLEY, 2015). Exemplos como o sildenafil e a talidomida reforçam esta estratégia como uma abordagem promissora no desenvolvimento racional de novas alternativas terapêuticas (LIU *et al.*, 2013b; RASK-ANDERSEN; ALMÉN; SCHIÖTH, 2011). A estratégia de reposicionamento de drogas é especialmente importante no caso de doenças negligenciadas, uma vez que possibilita a chegada de fármacos aos pacientes de maneira mais rápida e barata (ANDREWS; FISHER; SKINNER-ADAMS, 2014; NWAKA *et al.*, 2009; SARDANA *et al.*, 2011).

No contexto de diversas doenças complexas, como o câncer, muitas vezes apenas terapias com uma eficácia limitada estão disponíveis, reforçando a necessidade do desenvolvimento rápido, seguro e barato de novas abordagens terapêuticas (LIU *et al.*, 2013b; WÜRTH *et al.*, 2015). O reposicionamento de drogas visando o tratamento de diversos tipos de câncer tem sido alvo de vários estudos, com um número crescente de casos de sucesso nessa abordagem (GUPTA *et al.*, 2013; WÜRTH *et al.*, 2015). De maneira similar, no caso de doenças de rápida emergência, como no caso do Zika, a velocidade na qual drogas de mercado podem ser reposicionadas, quando comparado ao processo de desenvolvimento tomado desde o início, torna as abordagens *in silico* muito úteis (KINCAID, 2016). O uso de estratégias *in silico* na triagem de compostos oriundos de plantas de uso tradicional também tem sido relatado na literatura, com foco em diversas patologias, como a psoríase e o câncer (LAGUNIN *et al.*, 2014; MAY *et al.*, 2015; SHI *et al.*, 2013).

Outro objetivo do uso de abordagens *in silico*, está na predição de atividade biológica, bem como de alvos biológicos, e tem obtido resultados cada vez mais realísticos e confiáveis (PARASURAMAN, 2011). Esse tipo de predição foi realizado neste trabalho com intuito de corroborar os resultados encontrados nos ensaios *in vitro*.

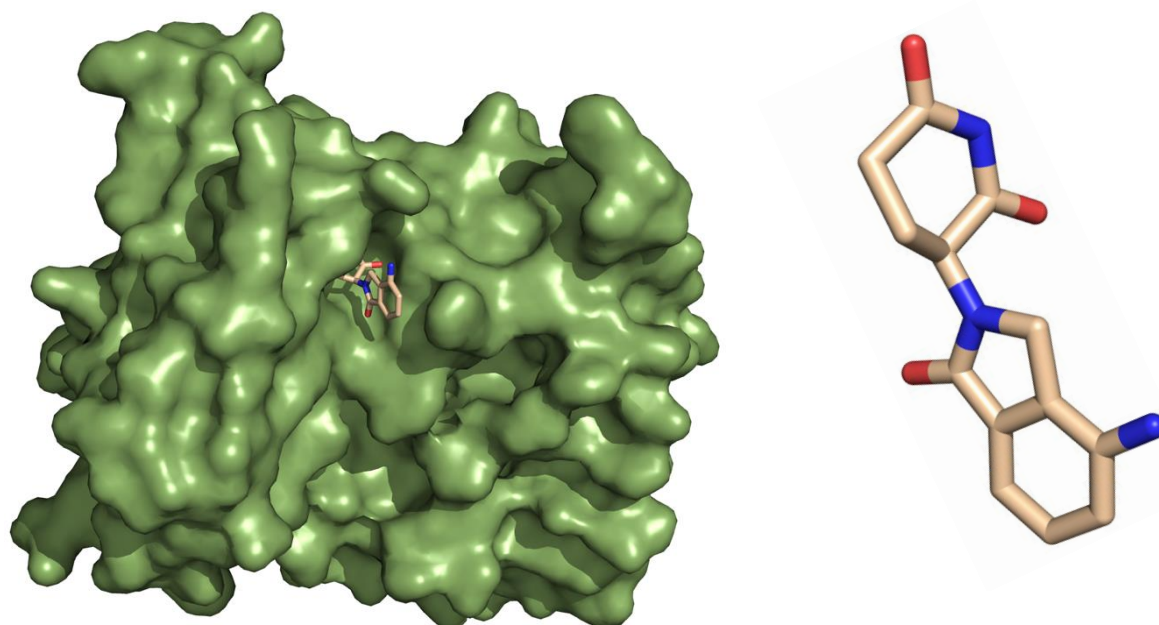
Diversas técnicas computacionais podem ser empregadas no planejamento, desenvolvimento e triagem de novas alternativas terapêuticas. No *docking* molecular, duas moléculas, tipicamente um ligante e um receptor, podem ser

“encaixadas” uma à outra. Desta forma, diferentes possibilidades de interação podem ser preditas *in silico*.

O termo *docking* vem da língua inglesa e faz alusão ao processo de ancoramento de um navio a um cais. De maneira análoga, este método é empregado para a avaliação do acoplamento de uma molécula ao sítio ativo de uma enzima, por exemplo (**Figura 8**). Diferentes tipos de moléculas podem ser utilizados no *docking* molecular, como proteínas, carboidratos, e ácidos nucleicos. Portanto, o *docking* molecular procura pela orientação que maximiza as interações moleculares (RABELLO, 2016).

A utilização de métodos de *docking* molecular pode ser observada na literatura para diversos fins (AZAM; ABBASI; TAHIR, 2014; BANERJEE; SAHOO; SAHU, 2016; BASU; SINHA, 2012; CHEN; SHOICHET, 2009; KARIM *et al.*, 2017; KATSILA *et al.*, 2016)

Figura 8. Imagem representativa de *docking* molecular. Um segmento da proteína humana Cereblon (em verde) em complexo com molécula Lenalidomida, mostrada isoladamente à



direita. PDB ID: 4TZ4.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Uma característica importante no *docking* molecular, é que é necessário possuir a estrutura tridimensional do receptor para a realização dos ensaios. Esses

modelos estruturais são tipicamente obtidos experimentalmente por ensaios de cristalografia de raios-X e, muitas vezes, depositados em bancos de dados.

O *Protein Data Bank* (PDB, *link* de acesso: <<https://www.rcsb.org>>) é um dos mais utilizados bancos de dados de estruturas de proteínas. O acesso às moléculas depositadas é aberto, e além das estruturas, são disponibilizadas também outras informações relevantes.

3 METODOLOGIA

As metodologias realizadas neste trabalho estão didaticamente classificadas em abordagens *in vitro* e abordagens *in silico*.

3.1 ABORDAGENS *IN VITRO*

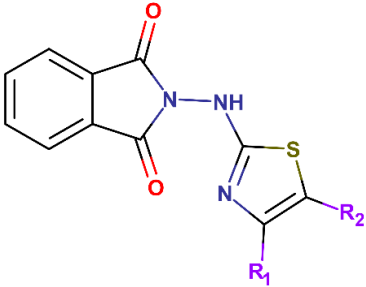
A presente seção apresenta os materiais e métodos utilizados para obtenção dos resultados experimentais deste trabalho. Os experimentos desta seção foram desenvolvidos no Departamento de Imunologia do Instituto Aggeu Magalhães (IAM).

3.1.1 Compostos Sintéticos

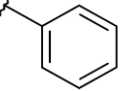
Os compostos avaliados no presente estudo foram obtidos através de colaboração com o Laboratório de Planejamento em Química Medicinal (LPQM) do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (OLIVEIRA, 2014). As caracterizações estruturais dos compostos foram realizadas por análise espectroscópica na região do infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C .

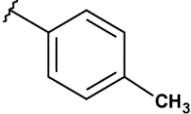
Foram testados 14 compostos, sendo todos ftalil-tiazóis, que receberam os códigos de AS-01 a AS-14 (**Tabela 3**).

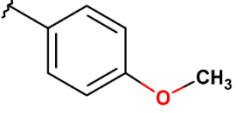
Tabela 3- Compostos da série AS e seus respectivos Pesos Moleculares (PM) em g/mol.

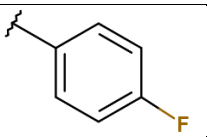
	AS-01	2-(4-(clorometil)tiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona
	AS-02	2-(4-feniltiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona
	AS-03	2-(4-p-toluiltiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona
	AS-04	2-(4-(4-metoxifenil)tiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona
	AS-05	2-(4-(4-fluorfenil)tiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona
	AS-06	2-(4-(4-clorofenil)tiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona
	AS-07	2-(4-(4-bromofenil)tiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona
	AS-08	2-(4-(4-nitrofenil)tiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona
	AS-09	2-(4-(bifenil-4-il)tiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona
	AS-10	2-(4-(naftalen-2-il)tiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona
	AS-11	2-(4-(3-nitrofenil)tiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona
	AS-12	2-(4-(3,4-diclorofenil)tiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona
	AS-13	2-(4-(2,4-diclorofenil)tiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona
	AS-14	2-(4-(4-bromofenil)-5metiltiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona

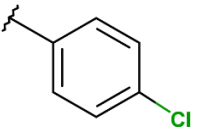
AS-01 PM: 293,73	R ₁	
	R ₂	H

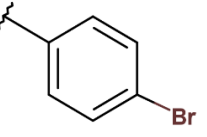
AS-02 PM: 321,35	R ₁	
	R ₂	H

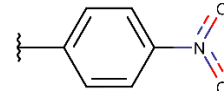
AS-03 PM: 335,38	R ₁	
	R ₂	H

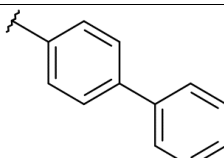
AS-04 PM: 351,38	R ₁	
	R ₂	H

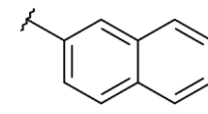
AS-05 PM: 339,34	R ₁	
	R ₂	H

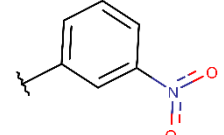
AS-06 PM: 355,80	R ₁	
	R ₂	H

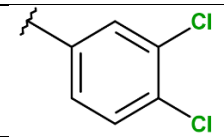
AS-07 PM: 400,25	R ₁	
	R ₂	H

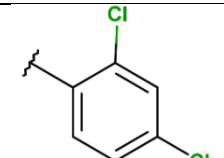
AS-08 PM: 366,35	R ₁	
	R ₂	H

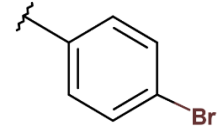
AS-09 PM: 397,45	R ₁	
	R ₂	H

AS-10 PM: 371,41	R ₁	
	R ₂	H

AS-11 PM: 366,35	R ₁	
	R ₂	H

AS-12 PM: 390,24	R ₁	
	R ₂	H

AS-13 PM: 390,24	R ₁	
	R ₂	H

AS-14 PM: 414,28	R ₁	
	R ₂	CH ₃

Fonte: Elaborado pelo autor.

Após o recebimento, os compostos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) e estocados a - 20 °C. Para a realização dos ensaios, cada composto foi diluído na concentração requerida utilizando-se o meio de cultura apropriado para cada célula (descritos no ponto 4.1.2), contendo 10 % de soro bovino fetal (SBF). A concentração final máxima de DMSO foi 1 %.

3.1.2 Linhagens Celulares

Para a realização de ensaios *in vitro* foram utilizadas três linhagens de células de tumor de cólon humano: HT-29, T84 e Caco-2. Além destas linhagens, foram utilizadas, também nos experimentos *in vitro*, a linhagem Vero, cujo tecido de origem é o rim de Macaco Verde Africano. Estas linhagens foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Todas as linhagens celulares foram conservadas em nitrogênio líquido, a - 196 °C. Inicialmente, as células foram expandidas e cultivadas em garrafas de cultura contendo o meio de cultura apropriado para cada linhagem: HT-29 e Vero: RPMI 1640; Caco-2: DMEM e T84: DMEM/F-12. Todos os meios de cultura utilizados foram suplementados com 10 % de soro bovino fetal (SBF), e 1 % de solução de antibióticos (estreptomicina – 100 µg/ml e penicilina – 100 U/ml). Todas as culturas foram mantidas a 37 °C em estufa com 5 % de CO₂.

3.1.3 Obtenção de células esplênicas de camundongos BALB/c

Foram utilizados camundongos *Mus musculus* das linhagens isogênicas BALB/c, machos, com 6 a 8 semanas de idade, pesando 20 ± 2 g, provenientes do biotério da Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro. O protocolo de experimentação animal utilizado no presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ com registro 26/2011 (**Anexo 1**).

Os animais foram eutanasiados por asfixia em câmara de CO₂, sendo realizada assepsia com álcool a 70 %. Na cabine de fluxo laminar foi realizada incisão xifo-pubiana sob condições assépticas, retirando-se o baço, que foi imediatamente imergido em tubos cônicos contendo 40 mL de meio RPMI suplementado com 10 % de SFB. Cada baço foi transferido para placas de petri e macerado, com o auxílio de lâminas de vidro de superfície porosa.

A suspensão celular obtida da maceração foi transferida para tubos cônicos contendo 10 mL de meio RPMI e centrifugada a 4 °C, 200 x g durante 5 minutos. Após o descarte do sobrenadante, o sedimento, contendo as células, foi ressuspenso em meio RPMI completo. Uma alíquota de cada suspensão celular foi diluída em azul de tripan para quantificação e verificação da viabilidade celular, em câmara de Neubauer. Em seguida, foi realizado o ajuste do número de células em meio de cultura ($6 \times 10^5/\text{mL}$). Esses esplenócitos isolados foram utilizados para a avaliação da produção de citocinas.

3.1.4 Avaliação da citotoxicidade e atividade anticâncer pelo ensaio de MTT

Células da linhagem Vero, além das linhagens tumorais previamente descritas, foram utilizadas para avaliação do efeito citotóxico dos compostos. Para tal, placas de 96 poços foram utilizadas. Em cada poço foi adicionado 1×10^5 células, sendo em seguida, incubadas por 24 horas em atmosfera úmida, com 5 % de CO_2 a 37 °C. Diferentes concentrações dos compostos (400, 200, 100, 50, 25 e 12,5 μM) foram adicionadas, seguindo-se uma nova incubação por 72 horas. O controle positivo foi realizado com a talidomida em 12 diferentes concentrações (400 a 0,19 μM). As células nos poços utilizados como controle negativo receberam apenas veículo.

Após o período de incubação de 72 horas, 25 μL de MTT - brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] em PBS (5 mg/mL, p/v) foram adicionados a cada poço, seguindo-se um período de 2 horas de incubação. O meio de cultura e o excesso de MTT não reduzido pelas células foram retirados dos poços, e na sequência foram adicionados 100 μL de DMSO, visando a dissolução dos cristais de formazan, formados pela metabolização do MTT nas células metabolicamente viáveis.

A quantificação dos resultados se deu pela leitura da densidade ótica em espectrofotômetro (THERMO SCIENTIFIC Multiskan FC) em absorvância de 570 nm. A média da densidade ótica dos poços teste foi comparada com a média da densidade ótica dos poços sem tratamento para a determinação da concentração citotóxica para 50 % da cultura (CC_{50}), utilizando o software Graph Pad Prism. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.1.5 Cálculo de seletividade

Com o objetivo de melhor elucidar comparativamente o efeito dos compostos testados, foram realizados cálculos de seletividade. Estes cálculos consistiram na realização do quociente entre os valores de CC_{50} obtidos com os experimentos nas células tumorais pelos valores de CC_{50} obtidos com a linhagem de células Vero. A equação abaixo descreve matematicamente este cálculo:

$$\text{SELETIVIDADE} = CC_{50} (\text{Vero}) / CC_{50} (\text{linhagem tumoral})$$

O cálculo da seletividade permite estimarmos o quão mais ativo um determinado composto é na linhagem tumoral quando comparado à linhagem não tumoral, que neste trabalho está representada pela linhagem Vero.

3.1.6 Dosagem de citocinas no sobrenadante de células

Citocinas dos perfis Th1, Th2 e Th17 foram dosadas nos sobrenadantes de esplenócitos murinos estimulados com cada composto em sua respectiva CC_{50} pelo método de CBA (do inglês, *Cytometric Bead Array*). Devido as diferentes dinâmicas de produção de cada citocina pelas células, foram utilizados quatro diferentes tempos de incubação (24 h, 48 h, 72 h e seis dias). Foram quantificadas por este método as citocinas IL-2, -4, -6, -10, -17, IFN- γ e TNF.

A aquisição e análise dos padrões e das amostras foi realizado utilizando citômetro de fluxo (FACScalibur, BD) e pelo software BD FCAP Array v3.0, respectivamente.

3.1.7 Análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Para as análises estatísticas, foi utilizada Análise de Variância (ANOVA) seguida de Teste de Dunnett com valor de $p < 0.05$. O software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, California, EUA) foi utilizado para as análises.

3.2 ABORDAGENS *IN SILICO*

Os materiais e métodos descritos nesta seção foram utilizados na obtenção dos resultados teóricos deste estudo, baseados em experimentos computacionais e conduzidos a partir dos resultados experimentais da seção anterior. As análises *in silico* foram desenvolvidas no Laboratório de Química Teórica Medicinal (LQTM) do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE.

3.2.1 Obtenção dos compostos *in silico*

Para a realização de cálculos computacionais, cada composto teve sua estrutura desenhada utilizando o *software* SPARTAN'08 (*link* de acesso:<https://www.wavefun.com/support/sp_win/support_winLV.html> (WAVEFUNCTION, 2008) e em seguida foi aplicado o método semi empírico RM1 (ROCHA *et al.*, 2006) e parâmetros padrão do *software* como critérios de convergência. As estruturas da molécula K252A (ligante co-cristalizado à proteína IKK β) e da talidomida (enantiômeros R e S) também foram utilizadas para os cálculos de *docking molecular*.

3.2.2 Seleção de possível receptor-alvo

A estrutura da proteína humana I κ B Kinase β (IKK β) foi utilizada como alvo nos cálculos de *docking molecular*. A referida estrutura foi obtida a partir do repositório virtual *Protein Data Bank* (PDB) (BERMAN *et al.*, 2000), onde se encontra registrada sob o código 4KIK, sendo composta pelo complexo co-cristalizado com um inibidor codificado como K252A (LIU *et al.*, 2013a). A definição do sítio ativo foi dada como todos os átomos em um raio de 6,0 Å a partir do ligante co-cristalizado. Os resíduos LEU21, THR23, LYS44, MET96, GLU97, TYR98, CYS99, ASP103, ILE165 e ASP166 foram tratados como flexíveis durante a realização dos ensaios.

3.2.3 Cálculos de *docking molecular*

Para a realização dos cálculos de *docking molecular* para cada estrutura, foi utilizado o *software* GOLD 5.2 (CAMBRIDGE STRUCTURAL DATABASE). Nesta etapa, diversas soluções de *docking*, cada uma representando uma possibilidade de acoplamento diferente, foram obtidas e ordenadas com base em seus valores de *score* de ligação. Em seguida, o *software* Binana (do inglês, *Binding Analyzer*) foi utilizado para análise das interações moleculares presentes na melhor solução de *docking* de cada molécula testada, utilizando todos os parâmetros padrão com exceção da distância de ligação de hidrogênio, que foi modificada para um máximo de 3,5 Å (DURRANT; MCCAMMON, 2011).

3.2.4 Construção das figuras de *docking molecular*

As figuras provenientes dos estudos de *docking molecular* foram geradas e renderizadas com a utilização do *software* Pymol.

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTICÂNCER PELO ENSAIO DE MTT

Com os ensaios de metabolização do MTT, foi avaliado o impacto sobre a viabilidade celular das linhagens tumorais de cólon e da linhagem não tumoral após o período de 72 horas de incubação com os compostos. Os valores de CC_{50} de cada composto sobre as linhagens celulares estão apresentados na **tabela 4**. O menor valor de CC_{50} para cada linhagem tumoral, em cada série de compostos, está marcado em vermelho, enquanto que o maior valor de CC_{50} para a linhagem não tumoral está apresentado em azul.

Tabela 4 - Valores de CC_{50} , após 72 horas de incubação, para cada composto da série AS sobre as linhagens tumorais T84, HT-29 e Caco-2; e sobre a linhagem controle Vero.

Composto	HT-29	T84	Caco-2	Vero
AS-01	111,4	229,0	227,1	124,9
AS-02	144,3	103,3	95,25	91,6
AS-03	122,0	66,72	138,2	75,2
AS-04	131,1	57,4	98,0	61,2
AS-05	106,1	88,7	107,7	75,8
AS-06	139,7	79,0	91,4	74,5
AS-07	147,3	76,0	89,8	54,0
AS-08	68,3	274,9	36,8	98,5
AS-09	109,8	57,6	44,5	82,3
AS-10	66,6	64,0	70,0	126,5
AS-11	68,8	25,0	69,8	179,3
AS-12	100,1	185,9	223,0	83,5
AS-13	126,3	89,1	114,6	55,1
AS-14	120,4	107,3	99,9	232,0
Talidomida	133,4	201,9	222,2	120,6

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Os valores marcados em verde indicam o menor valor de CC_{50} para a linhagem tumoral testada. O valor em azul sinaliza o maior valor de CC_{50} observado na linhagem não tumoral. Todos os resultados estão apresentados em micromolar(μ M).

A talidomida apresentou os valores de CC_{50} de 133,8 μ M para a linhagem HT-29, 201,9 μ M para a linhagem T84 e 222,2 μ M para a linhagem Caco-2, estando entre os valores mais elevados de CC_{50} comparativamente a série de compostos testados.

Quando comparados aos valores para a talidomida, os resultados dos compostos testados mostraram-se promissores para as três linhagens testadas.

Os resultados de CC_{50} obtidos, concomitantemente com outros achados apresentados à frente, nos levaram a selecionar o composto AS-11 como o melhor candidato da série de compostos.

4.2 ANÁLISE DE SELETIVIDADE

Com a finalidade de avaliar comparativamente a atividade citotóxica entre as linhagens tumorais e a linhagem controle foram realizados cálculos de seletividade. Os valores de seletividade, apresentados na **tabela 5**, expressam o quão mais seletivo cada um dos compostos é para a linhagem tumoral quando comparado à linhagem não tumoral. Para estes cálculos, foram utilizados os valores de CC_{50} obtidos nos ensaios de viabilidade celular pela metabolização do MTT.

Em termos de seletividade, após os cálculos baseados nas CC_{50} , o composto AS-11 destacou-se, apresentando os maiores valores de seletividade para duas, das três linhagens tumorais testadas. Apenas frente à linhagem Caco-2 o composto AS-08 mostrou-se mais seletivo, porém com índice de seletividade bem próximo ao obtido por AS-11.

Tabela 5. Valores de seletividade para cada composto, relacionando cada linhagem tumoral com o a linhagem não tumoral (Vero).

Composto	HT-29 x Vero	T84 x Vero	Caco-2 x Vero
AS-01	1,12	0,55	0,55
AS-02	0,63	0,89	0,96
AS-03	0,62	1,13	0,54
AS-04	0,47	1,07	0,62
AS-05	0,71	0,85	0,70
AS-06	0,53	0,94	0,81
AS-07	0,37	0,71	0,60
AS-08	1,44	0,36	2,68
AS-09	0,75	1,43	1,85
AS-10	1,90	1,98	1,81
AS-11	2,61	7,17	2,57
AS-12	0,83	0,45	0,37
AS-13	0,44	0,62	0,48
AS-14	1,93	2,16	2,32
Talidomida	0,95	1,43	1,58

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Os valores marcados em azul sinalizam os maiores valores de seletividade para cada linhagem tumoral, em comparação a linhagem não tumoral.

A talidomida, utilizada neste trabalho como uma droga de referência, apresentou valores de seletividade intermediários, quando em comparação ao conjunto dos compostos testados.

Os resultados de seletividade deste composto foram também utilizados como parâmetro para a seleção dos compostos AS-08, AS-10 e AS-11 nos ensaios *in silico*.

4.3 DOSAGEM DE CITOCINAS EM SOBRENADANTE DE CULTURA DE ESPLÊNÓCITOS

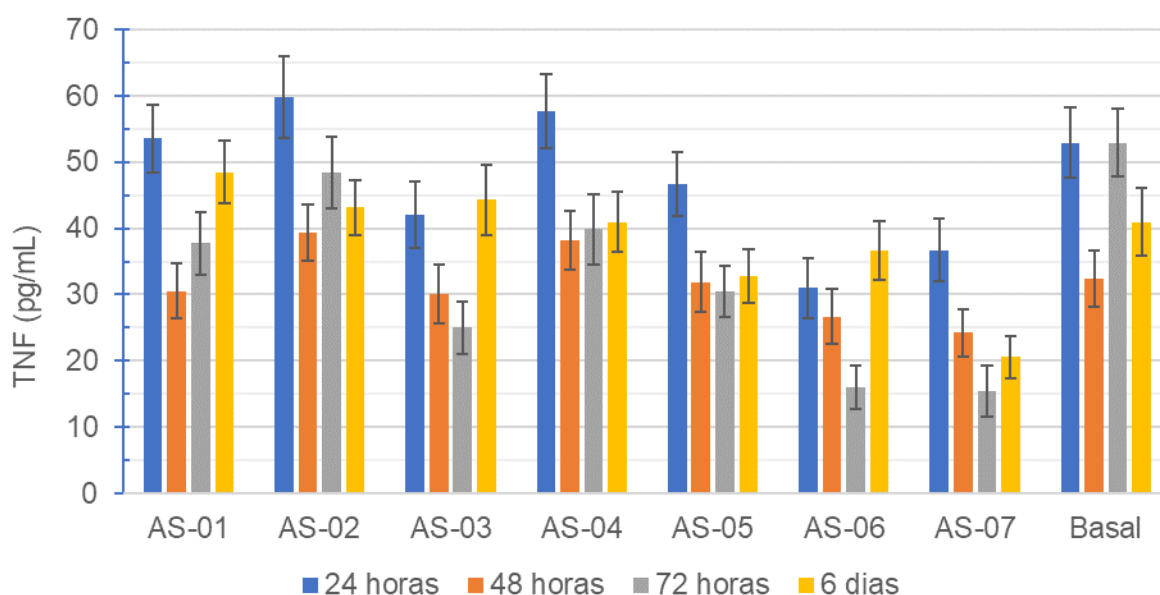
Sobrenadantes de cultura de esplenócitos murinos foram utilizados para a dosagem de citocinas, após a incubação com os compostos em quatro tempos distintos (24 h, 48 h, 72 h e seis dias). A seguir, serão apresentados os resultados para cada citocina em todos os tempos de incubação pesquisados.

4.3.1 Fator de Necrose Tumoral (TNF)

A concentração da citocina TNF, que possui uma vasta gama de ações pro-inflamatórias, foi analisada por CBA. Os resultados são apresentados a seguir.

A **figura 9** apresenta a produção da citocina TNF, em picogramas por mililitro (pg/mL), nos quatro tempos de incubação testados na presença dos compostos AS-01 a AS-07 e nas células que receberam apenas o veículo (controle basal). Houve detecção de TNF após incubação com os compostos citados, além do controle basal. Entretanto, essa produção foi significativamente reduzida, quando em comparação ao controle, para os compostos AS-01; 03; 04 e 05 apenas após 24 horas de incubação. O composto AS-06 induziu uma redução significativa da concentração de TNF após 24 e 72 horas de incubação. A incubação com o composto AS-07 reduziu significativamente a concentração de TNF após 24 h, 72 h e seis dias de incubação.

Figura 9. Produção da citocina TNF, detectada por CBA após 24 h, 48 h, 72 h e seis dias de incubação com os compostos AS-01 a AS-07 e no controle Basal.



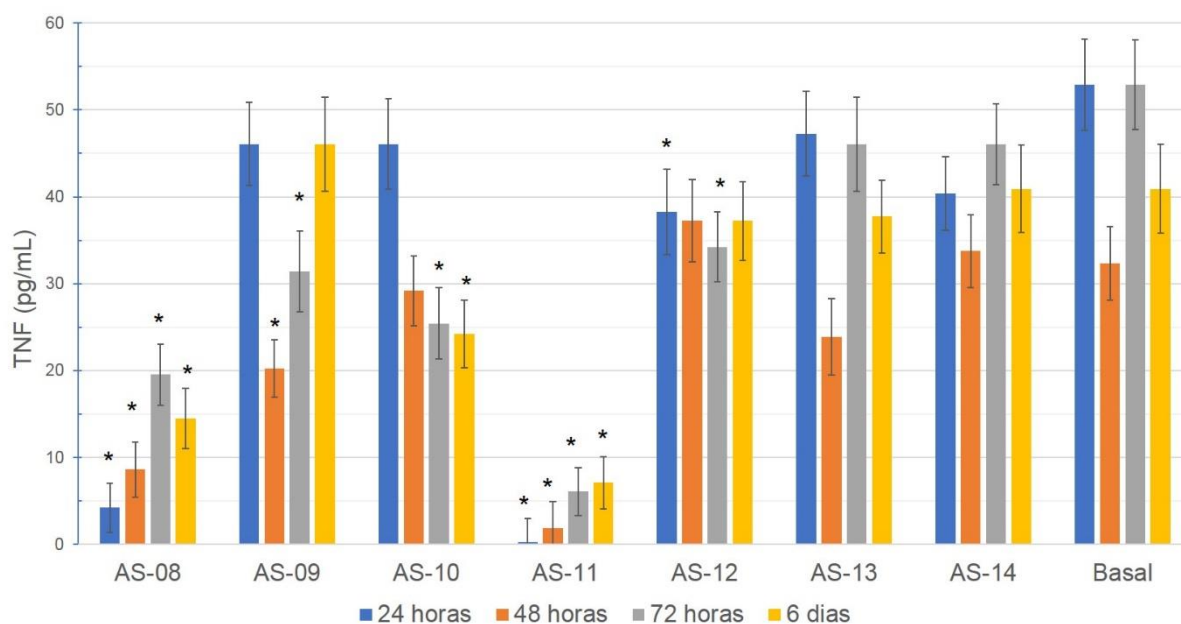
Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: (*) corresponde a redução significativa da concentração da citocina quando comparada à concentração no controle basal, $p < 0,0001$.

A **figura 10** apresenta os resultados da produção de TNF após incubação com os compostos AS-08 a AS-14. O composto AS-08 reduziu significativamente a produção de TNF em todos os tempos de incubação testados. Para o composto AS-09, esta redução foi significativa apenas após 48 e 72 horas. Para o compotos AS-10 apenas após 72 horas e seis dias de incubação foi verificada redução significativa

da produção de TNF. Uma redução significativa da produção de TNF após incubação com o composto AS-11 foi verificada em todos os tempos de incubação testados, de maneira similar a observada para o composto AS-08. AS-12 promoveu redução significativa da concentração de TNF após 24 e 72 horas.

Figura 10. Produção da citocina TNF, detectada por CBA após 24 h, 48 h, 72 h e seis dias de incubação com os compostos AS-08 a AS-14 e no controle basal.



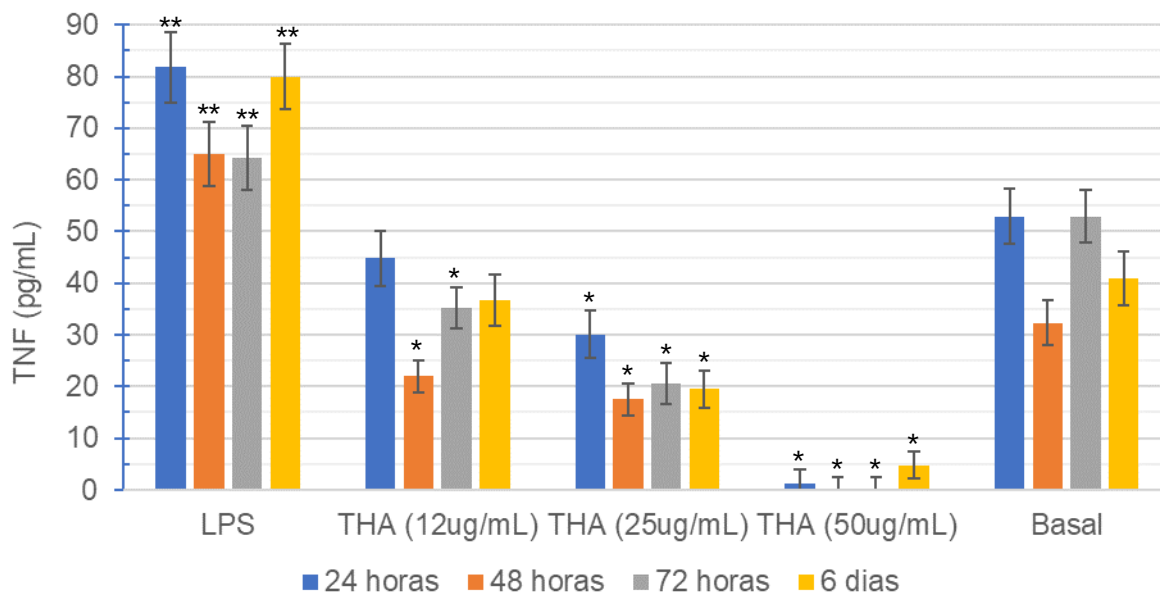
Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: (*) Corresponde a redução significativa da concentração da citocina quando comparada à concentração no controle basal, $p < 0,0001$.

Por fim, a **figura 11** apresenta os resultados após incubação com lipopolissacarídeo (LPS) e talidomida (THA). O LPS induziu um aumento significativo da produção de TNF em todos os tempos de incubação, com exceção do tempo de 48 horas.

THA, na concentração de 12 $\mu\text{g/mL}$ induziu uma redução significativa da produção de TNF apenas após 48 e 72 horas de incubação. As concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ induziram redução significativa da produção de TNF em todos os tempos de incubação testados.

Figura 11. Produção da citocina TNF, detectada por CBA após 24 h, 48 h, 72 h e seis dias de incubação com Lipopolissacarídeo (LPS), Talidomida (THA) e no controle Basal.



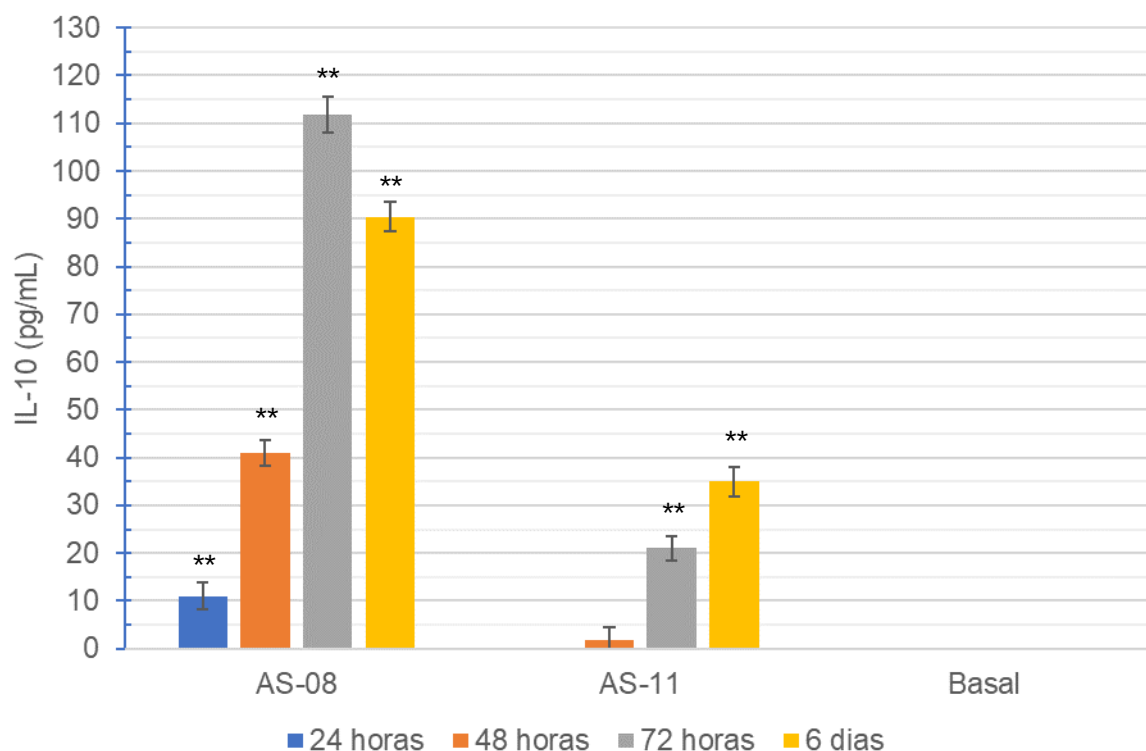
Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: (*) corresponde a redução significativa da concentração da citocina quando comparada à concentrat no controle basal, $p < 0,0001$. (**) corresponde a aumento significativo da concentração da citocina quando comparada à concentração no controle basal, $p < 0,0001$.

4.3.2 Interleucina-10 (IL-10)

Nesta seção, são apresentados os resultados referentes a citocina IL-10, que apresenta característica de ação anti-inflamatória. Foi detectado um aumento significativo da produção da citocina IL-10 nos quatro tempos testados após a incubação com o composto AS-08. O composto AS-11 induziu aumento significativo na concentração de IL-10 apenas após 72 horas e seis dias de incubação. Os demais compostos e o LPS não induziram a produção de IL-10 nas condições testadas. Nas células incubadas apenas com o veículo (grupo basal) também não foi detectada a produção de IL-10 em nenhum dos tempos de incubação testados. A **figura 12** ilustra graficamente os resultados obtidos.

Figura 12. Produção da citocina IL-10, detectada por CBA nos tempos de 24 h, 48 h, 72 h e seis dias.



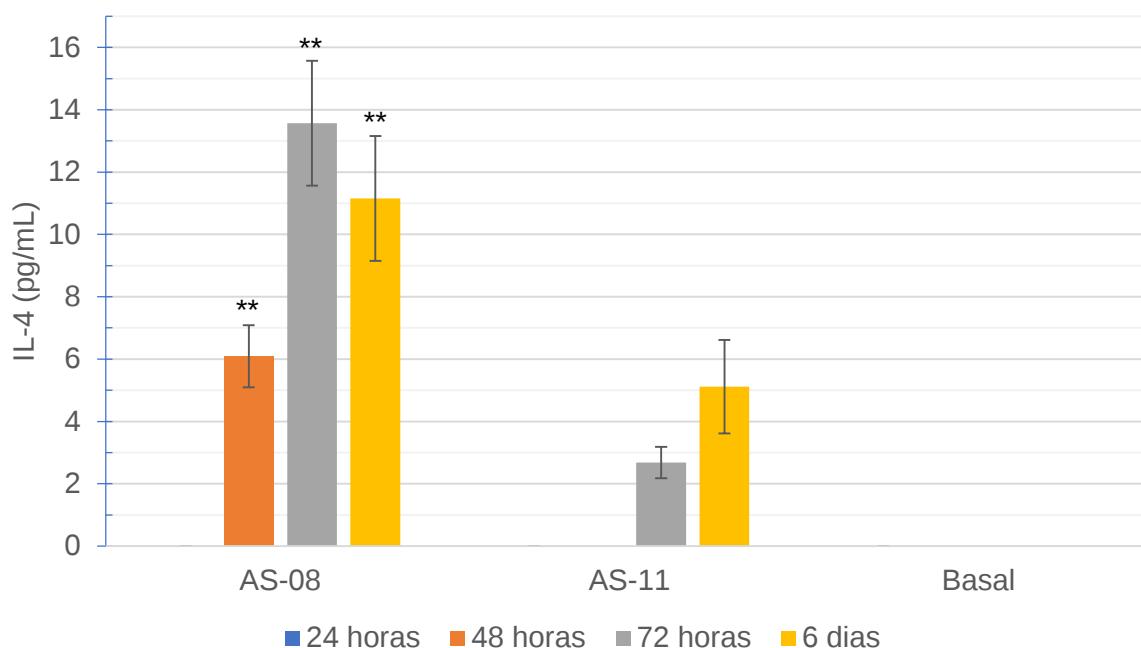
Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: (**) corresponde ao aumento significativo da concentração da citocina quando comparada à concentração no controle basal. 24h: $p=0,0063$; 48h, 72h e 6 dias: $p<0,0001$.

4.3.3 Interleucina-4 (IL-4)

A produção de IL-4, citocina de característica anti-inflamatória, não foi detectada após 24 horas de incubação sob nenhuma condição experimental. O composto AS-08, entretanto, induziu um aumento significativo na concentração de IL-4 após 48 h, 72 h e seis dias de incubação. A citocina IL-4 também foi observada após incubação com o composto AS-11, entretanto a concentração detectada não foi estatisticamente significativa como pode ser observado na **Figura 13**.

Figura 13. Produção da citocina IL-4, detectada por CBA após incubação por 24 h, 48 h, 72 h e seis dias com os compostos e no controle Basal.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: (**) corresponde a aumento significativo da concentração da citocina quando comparada à concentração no controle basal. 48h: $p=0,0426$; 72h: $p=0,0018$; 6dias: $p=0,0068$.

4.3.4 Interleucina-2, interleucina-6, interleucina-17A e Interferon- γ (IL-2, IL-6, IL-17A e IFN- γ)

A produção das citocinas IL-2, IL-6, IL-17A e IFN- γ não foi detectada em nenhuma das condições testadas.

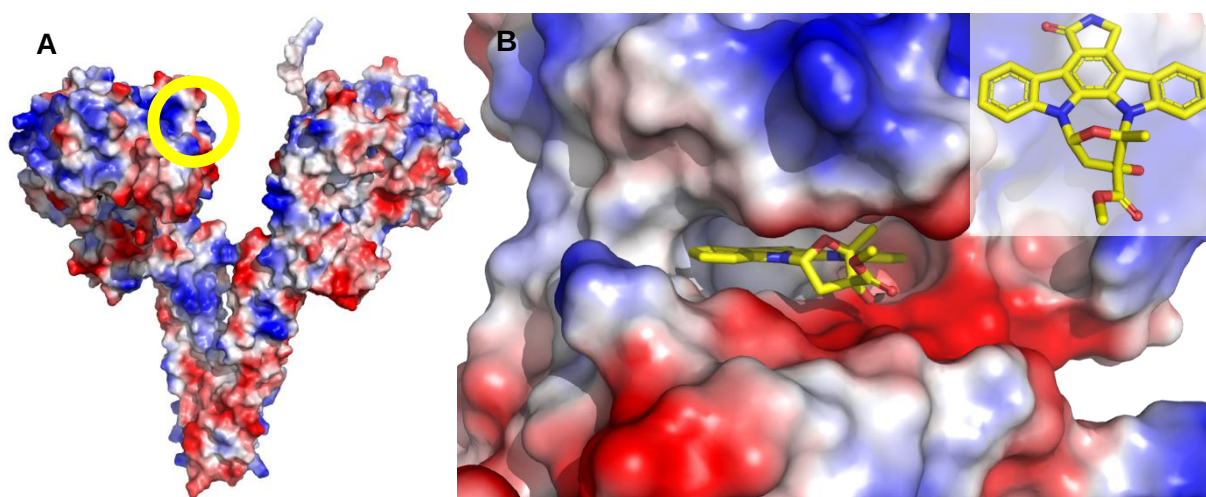
4.4 SCORE DE DOCKING MOLECULAR

Visando correlacionar os resultados obtidos *in vitro* a um possível alvo molecular, foram conduzidos ensaios por abordagens *in silico*. Uma vez que os derivados de ftalimidas apresentam notável ação imunomoduladora, especialmente na inibição da produção de TNF, uma possível molécula alvo foi pesquisada (BISWAS; BAGCHI, 2016; CASAL *et al.*, 2016; LEITE *et al.*, 2013; PESSOA *et al.*, 2010).

As análises dos resultados obtidos após experimentos *in vitro*, especialmente na modulação da citocina TNF, juntamente com os relatos da literatura quanto aos

alvos moleculares da talidomida e de outros derivados ftalimídicos nos levaram a cogitar uma possível interação entre os compostos testados e a proteína IKK β (HUANG *et al.*, 2013; KEIFER *et al.*, 2001; XU *et al.*, 2011). A estrutura da proteína IKK β co-cristalizada a molécula inibidora K252A (LIU *et al.*, 2013a), apresentada na **figura 14**, permitiu delimitar o sítio ativo no qual foram realizados os ensaios *in silico*.

Figura 14. Possível alvo para os compostos da série AS.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: (A) Imagem ilustrativa da superfície da proteína IKK β (Código PDB: 4KIK). As áreas vermelhas e azuis representam cargas positivas e negativas, respectivamente. O círculo em amarelo mostra a localização do sítio ativo da proteína. (B) Imagem da cavidade do sítio ativo da proteína, com a molécula inibidora K252A (presente na molécula co-cristalizada obtida no PDB). No canto superior direito, é apresentada em destaque a estrutura do inibidor K252A.

A disponibilidade de um modelo estrutural da proteína IKK β humana, ligada a um inibidor, permite utilizar este modelo em cálculos de *docking* molecular, que apresentam relevante valor preditivo nas análises de interação (LIU *et al.*, 2013a). Obviamente, para provar de maneira definitiva a interação molecular são necessários outros experimentos envolvendo, por exemplo, ensaios de ligação direta à enzima.

Após o estabelecimento da proteína IKK β como possível alvo molecular, mediando a ação imunomodulatória *in vitro* observada para os compostos testados, a construção e otimização da estrutura destes compostos foi produzida *in silico*. Posteriormente, cada composto foi triado frente ao sítio ativo da proteína IKK β , o que gerou resultados de *score*, apresentados na **tabela 6**.

Tabela 6. Valores de *score* obtidos após cálculo de *docking molecular* no alvo IKK β .

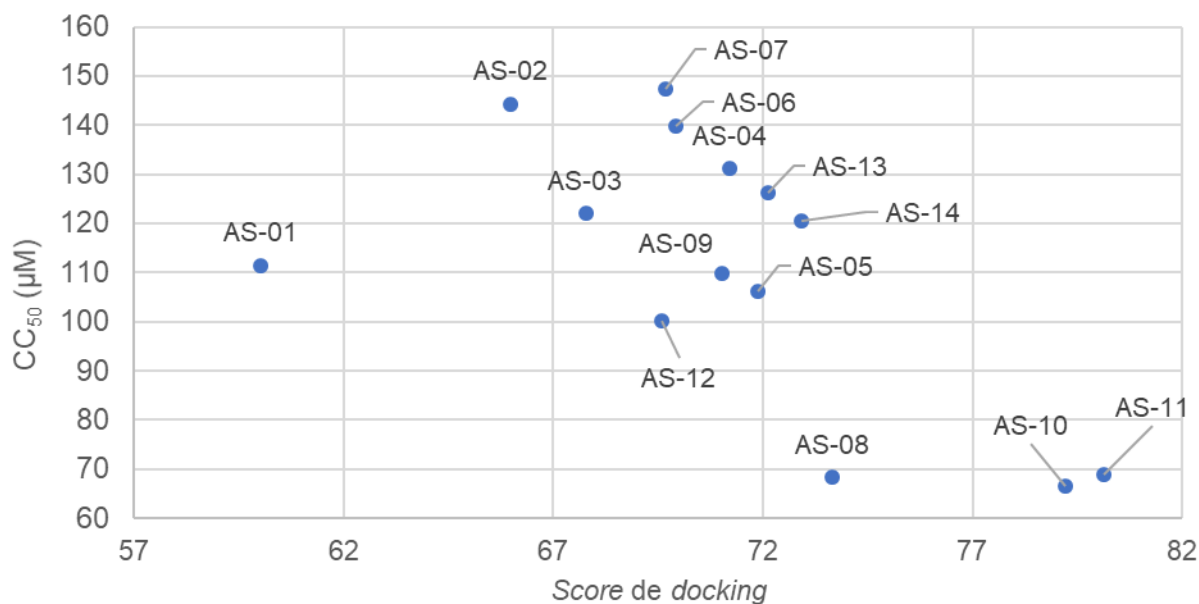
Composto	Score
AS-01	60,0
AS-02	66,0
AS-03	67,8
AS-04	71,2
AS-05	71,9
AS-06	69,9
AS-07	69,7
AS-08	73,7
AS-09	71,0
AS-10	79,2
AS-11	80,1
AS-12	69,6
AS-13	72,1
AS-14	72,9
Talidomida (enantiômero R)	53,48
Talidomida (enantiômero S)	52,32

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5 CORRELAÇÕES ENTRE RESULTADOS *IN VITRO* E *IN SILICO*

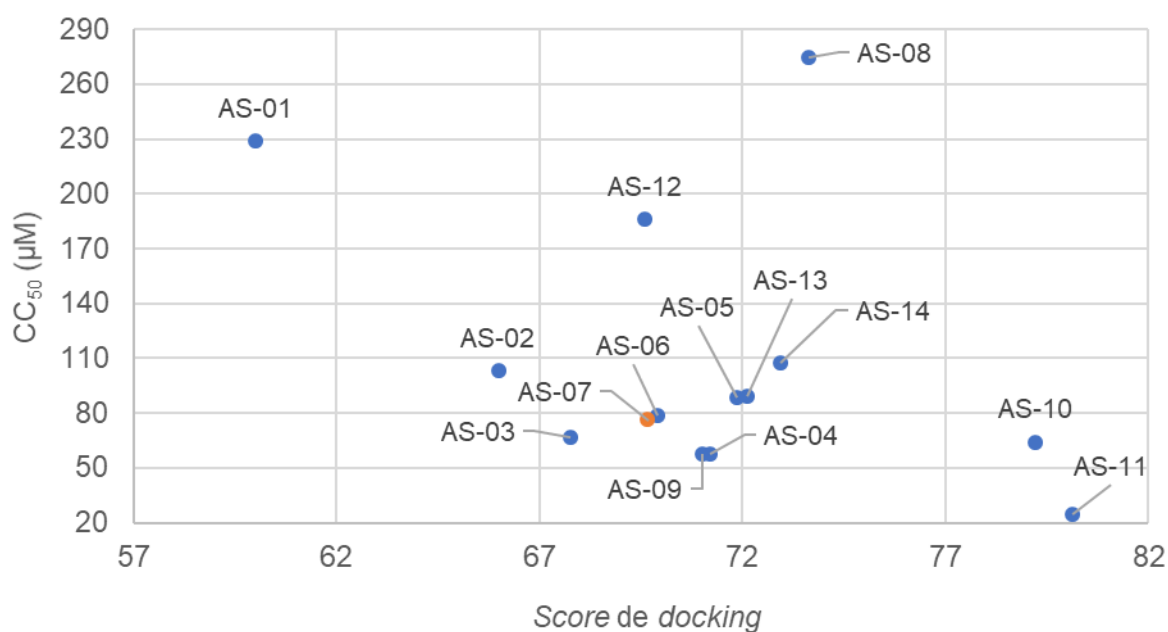
Uma vez que os cálculos de *docking molecular* foram concluídos, foi realizada uma avaliação da correlação entre os resultados de *score* e os resultados *in vitro* obtidos para as três linhagens tumorais estudadas. As **figuras 15, 16 e 17** apresentam gráficos de dispersão que facilitam a visualização dessa correlação.

Figura 15. Correlação observada entre os resultados de atividade antitumoral e resultados *in silico* (Scores de *docking*) para a linhagem tumoral HT-29.



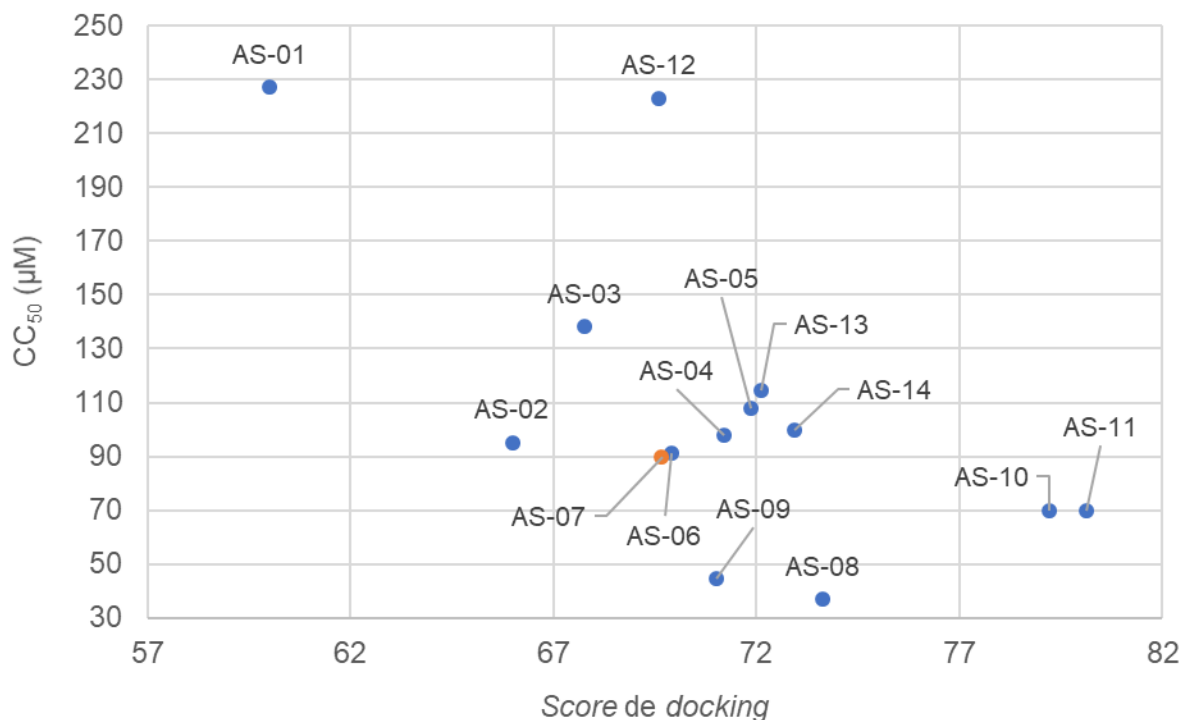
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 16. Correlação observada entre os resultados de atividade antitumoral e resultados *in silico* (Scores de *docking*) para a linhagem tumoral T84.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 17. Correlação observada entre os resultados de atividade antitumoral e resultados *in silico* (Scores de *docking*) para a linhagem tumoral Caco-2.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Após as análises de correlação *in vitro* versus *in silico*, o composto AS-01 foi elencado como tendo o resultado menos satisfatório entre todos os compostos da série AS. Os compostos AS-08, AS-10 e AS-11, por sua vez foram avaliados como os compostos que, de maneira geral, apresentaram as respostas mais promissoras. Os resultados apresentados a seguir focam apenas nestes quatro compostos. Para efeito comparativo das estruturas e suas formas de interação com o sítio ativo da proteína IKK β , o composto AS-01 foi incluído nas análises de interação *in silico*.

4.6 INTERAÇÕES MOLECULARES *IN SILICO*

Uma vez que os cálculos de *docking* molecular foram concluídos, foi iniciada a análise *in silico* da possível interação entre a proteína IKK β e as moléculas selecionadas (AS-01, AS-08, AS-10 e AS-11). Tal análise permitiu visualizar interações moleculares pelas quais a ligação à proteína inibidora poderia ocorrer. Utilizando o *software* Binana, foram localizados os resíduos de aminoácido do sítio ativo que interagiriam com as moléculas selecionadas. A **tabela 7** apresenta os

resíduos de aminoácidos do sítio ativo de IKK β que mostraram interação com as melhores soluções de *docking* molecular de cada composto selecionado.

Tabela 7. Interações moleculares previstas *in silico* entre o receptor IKK β e os compostos AS-01, AS-08, AS-10 e AS-11.

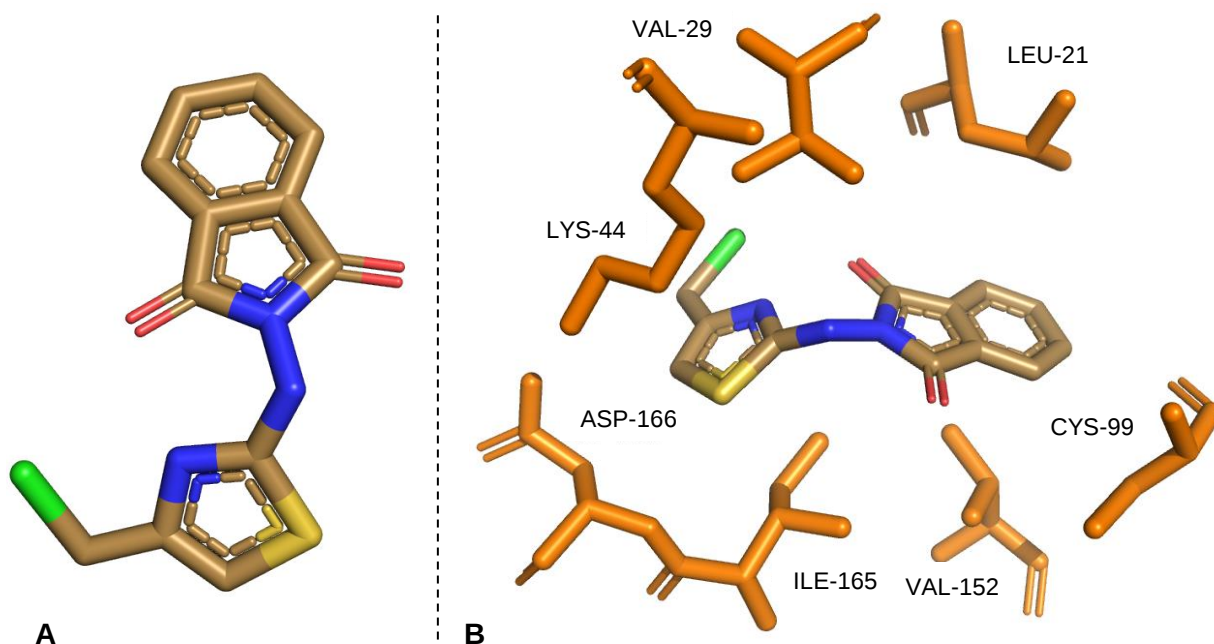
Resíduo	AS-01	AS-08	AS-10	AS-11
LEU-21	CH	CH	CH	CH
VAL-29	CH	CH	-	CH
ALA-42	-	CH	-	-
LYS-44	CH	CAT- π	-	CAT- π
MET-96	-	CH	CH	-
TYR-98	-	CH	CH	2,8
CYS-99	CH	-	-	CH
ASP-103	-	-	2,5	CH
LYS-106	-	3,0	-	3,0
VAL-152	CH	CH	CH	CH
ILE-165	CH	CH	CH	CH
ASP-166	CH	CH	-	CH

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: CH significa Contatos Hidrofóbicos. CAT- π significa Interação cátion- π . Os números descritos equivalem à distância entre o átomo doador e o aceptor de uma ligação de hidrogênio, em Angstroms.

Para o composto AS-01, selecionado como o composto menos promissor da série, foram identificados apenas resíduos de aminoácidos do sítio ativo da proteína IKK β interagindo através de contatos hidrofóbicos. Apenas sete resíduos de aminoácido apresentaram potencial para interação com este composto. Na **figura 18** estes resíduos são apresentados.

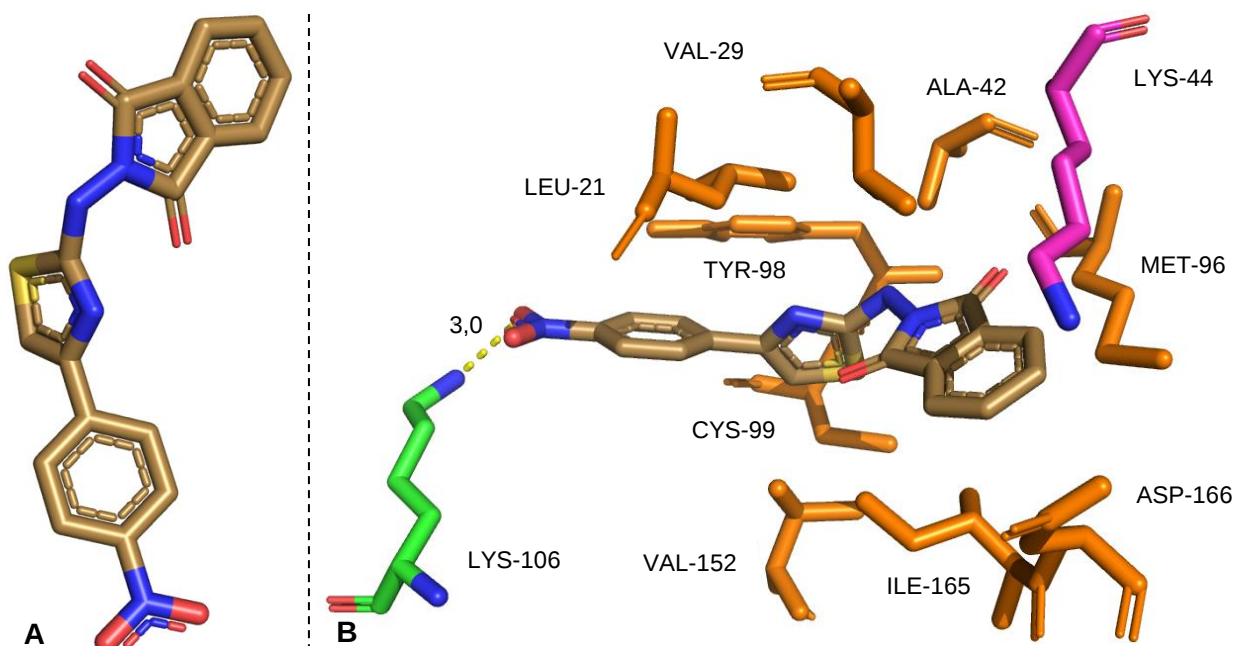
Figura 18. Imagens ilustrativas da estrutura do composto AS-01 (A) e das interações entre a molécula AS-01 e resíduos do sítio ativo da proteína IKK β (B) que interagem por contatos hidrofóbicos (em laranja).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os compostos AS-08, AS-10 e AS-11 foram selecionados como os três mais promissores da série, apresentando os maiores *scores* de *docking*. O composto AS-08 demonstrou interação *in silico* com 10 aminoácidos do sítio ativo da proteína IKK β . As interações ocorreram por ligação de hidrogênio (com apenas um resíduo de aminoácido), interação cátion- π e contatos hidrofóbicos. Na **figura 19** são apresentadas as interações *in silico* entre a molécula AS-08 e os resíduos de aminoácido do sítio ativo da proteína IKK β .

Figura 19. Imagens ilustrativas da estrutura do composto AS-08 (A) e das interações entre a molécula AS-08 e resíduos do sítio ativo da proteína IKK β (B) por contatos hidrofóbicos (em laranja), cátion- π (em magenta) e ligação de hidrogênio (em verde).



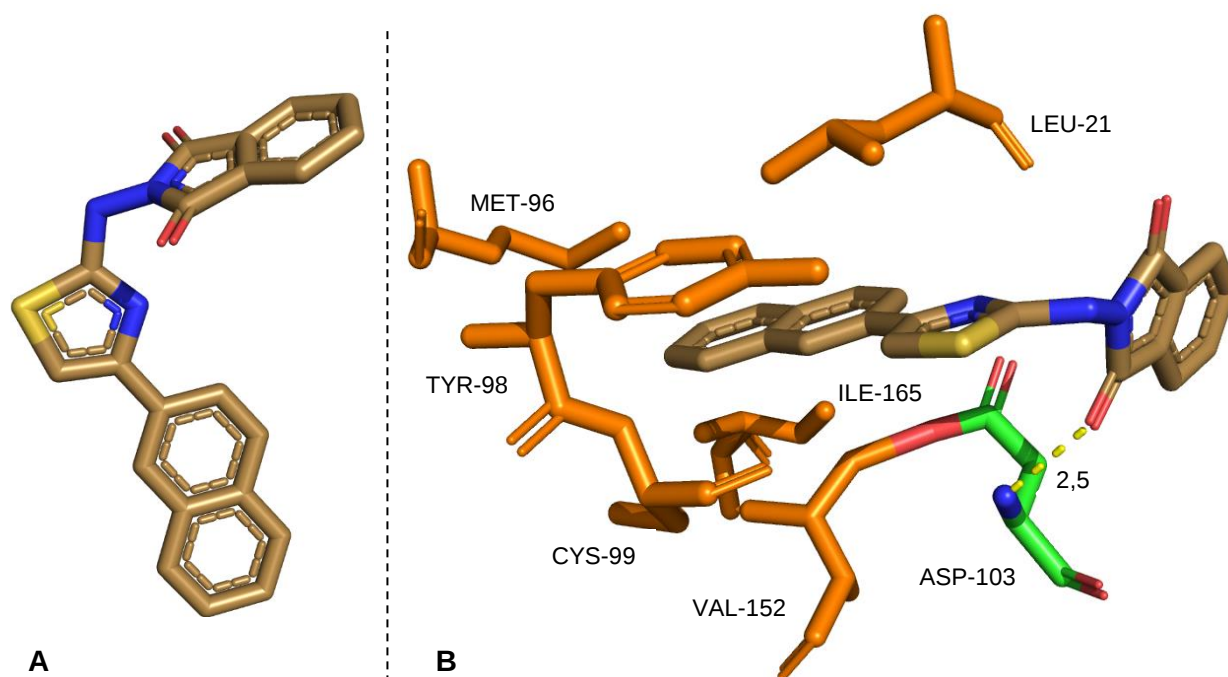
Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: A distância da ligação de hidrogênio é apresentada em Angstrom.

A molécula AS-10 apresentou interação com 6 resíduos de aminoácido presentes no sítio ativo da proteína IKK β , sendo que a interação com um desses resíduos foi através de uma ligação de hidrogênio. Também foi identificada, para a molécula AS-10, a interação por contatos hidrofóbicos. As interações entre a molécula AS-10 e a proteína IKK β podem ser observadas na **figura 20**.

Para o composto AS-11, que apresentou o maior valor de *score* de *docking* molecular para toda a série AS, as interações com resíduos de aminoácidos do sítio ativo da proteína IKK β ocorreram através de duas ligações de hidrogênio (com dois resíduos de aminoácido), interação cátion- π (com um resíduo de aminoácido) e contatos hidrofóbicos, totalizando 10 resíduos de aminoácidos envolvidos em alguma interação com o composto. A **figura 21** apresenta as interações entre o composto AS-11 e os resíduos de aminoácido do sítio ativo da proteína IKK β .

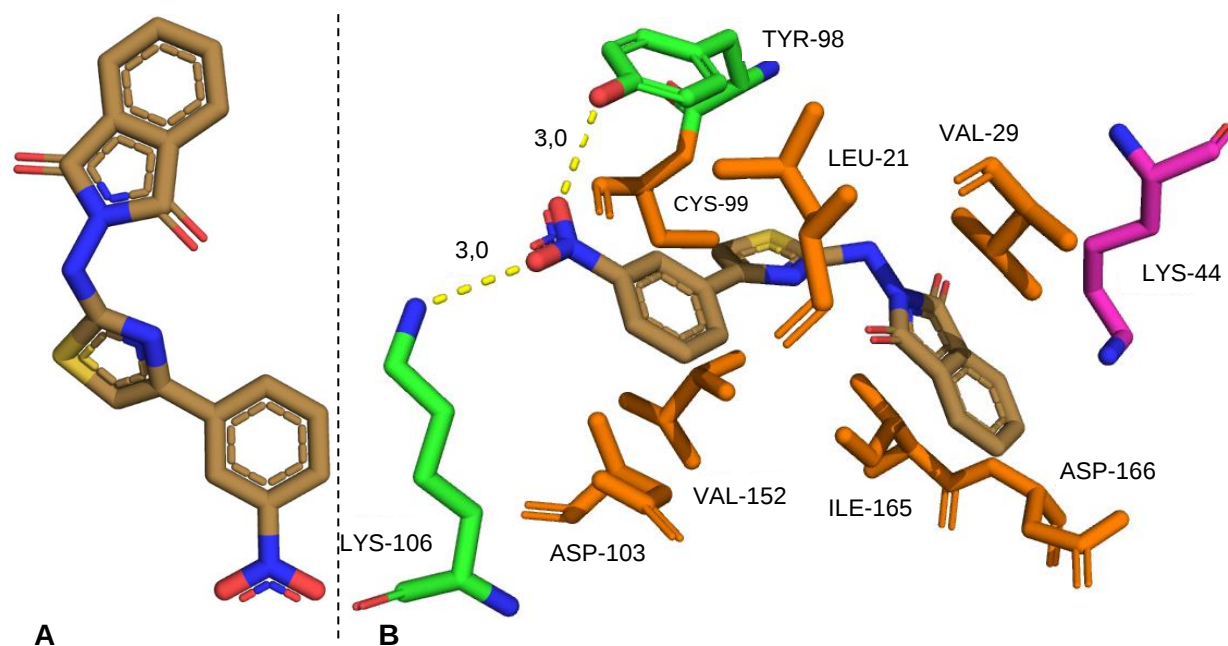
Figura 20. Imagens ilustrativas da estrutura do composto AS-10 (A) e das interações entre a molécula AS-10 e resíduos do sítio ativo da proteína IKK β (B) por contatos hidrofóbicos (em laranja) e ligação de hidrogênio (em verde).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: A distância da ligação de hidrogênio é apresentada em Angstrom.

Figura 21. Imagens ilustrativas da estrutura do composto AS-11 (A) e das interações entre a molécula AS-11 e resíduos do sítio ativo da proteína IKK β (B) por contatos hidrofóbicos (em laranja), cátion- π (em magenta) e ligação de hidrogênio (em verde).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: As distâncias das ligações de hidrogênio são apresentadas em Angstrom.

5 DISCUSSÃO

Os diversos efeitos biológicos associados à estrutura da talidomida apresentam especial importância na química medicinal, apesar dos trágicos eventos associados ao seu uso por gestantes, após seu lançamento na década de 1950. Isto se tornou claro quando, nas últimas décadas, o interesse pela talidomida ressurgiu (GUPTA *et al.*, 2013; MERCURIO *et al.*, 2017; MILLRINE; KISHIMOTO, 2017; VARGESSON, 2015). A talidomida é um notável exemplo da adoção de novos usos para velhas drogas (*New uses for old drugs*), estratégia também conhecida como reposicionamento de drogas (*drug repositioning*), reutilização de drogas (*drug repurposing*) ou mudança terapêutica (*therapeutic switching*) (GUPTA *et al.*, 2013; MERCURIO *et al.*, 2017; MILLRINE; KISHIMOTO, 2017).

Atualmente, a talidomida é aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*, agência reguladora norte americana) para o tratamento de eritema nodoso leproso e do mieloma múltiplo. A ação antitumoral da talidomida tem recebido especial destaque dentre os variados efeitos biológicos da molécula, juntamente com seu notável efeito imunomodulatório (LIU *et al.*, 2017; MORI *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2015).

Por apresentar uma variedade de efeitos biológicos associados à sua estrutura, diversos análogos da talidomida têm sido sintetizados e testados, visando potencializar sua atividade. A estrutura da talidomida é composta por dois anéis heterocíclicos, a ftalimida e a glutaramida. Modificações nestas estruturas têm sido feitas por diversos grupos de pesquisa visando incrementar o potencial terapêutico das moléculas (KUSHWAHA; KAUSHIK, 2016).

Diversos trabalhos tem mostrado a ação de análogos da talidomida em variadas patologias, como as hematológicas, parasitárias, inflamatórias, vasculares e do trato gastro-intestinal, incluindo câncer (ALIABADI *et al.*, 2015; ALIANÇA *et al.*, 2017; DE MORAES GOMES *et al.*, 2016; DE OLIVEIRA CARDOSO *et al.*, 2015; FUMIAN *et al.*, 2016; HORVAT *et al.*, 2012; LINDNER; KRÖNKE, 2016).

Numa estratégia de planejamento estrutural conduzida pelo Laboratório de Planejamento em Química Medicina (LPQM), liderado pela Prof.^a Dr.^a Ana Cristina Lima Leite, diversos derivados ftalil-tiazóis foram sintetizados nos últimos anos (ALIANÇA *et al.*, 2017; DA COSTA *et al.*, 2015; DE MORAES GOMES *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2015; LEITE *et al.*, 2013; PACCA *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*,

2016). Os compostos avaliados neste trabalho são o produto de uma série de melhoramentos estruturais, com base em moléculas sintetizadas e testadas previamente, através de uma estratégia de síntese utilizando a ferramenta do bioisosterismo. Suas estruturas partiram da hibridação molecular entre os anéis heterocíclicos ftalimida e 1,3-tiazol.

Compostos sintetizados pelo grupo de pesquisa do LPQM já foram testados quanto a seu efeito sobre o crescimento e morfologia de *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas (DE MORAES GOMES *et al.*, 2016). Em outro trabalho, a atividade de derivados ftalil-tiazóis sobre *Leishmania* spp. também foi demonstrada (ALIANÇA *et al.*, 2017). A ação imunomodulatória de derivados ftalimídicos, bem como efeitos sobre a apoptose também são resultados relacionados a esta classe de compostos (COELHO *et al.*, 2014).

Os compostos testados neste trabalho não apresentam um centro quiral suscetível a racemização em suas estruturas, o que ocorre com a talidomida. Desta forma, sob o prisma de possíveis formas enantioméricas, os compostos da série AS têm um potencial reduzido para possíveis efeitos colaterais associados a estas misturas racêmicas.

Neste trabalho, três linhagens tumorais de cólon humano tiveram seu crescimento avaliado na presença dos derivados ftalil-tiazóis. A seleção destas linhagens para o estudo se deu por representarem estágios diferentes de progressão tumoral no câncer de colon (ATCC, 2004; BAMFORD *et al.*, 2004). Um processo de triagem inicialmente realizado também demonstrou resultados promissores para esta classe de compostos com a linhagem HT-29, de cólon humano (SANTOS *et al.*, 2016).

Os valores de CC₅₀ obtidos para todas as linhagens após incubação com a maior parte dos compostos testados foi comparativamente melhor do que os valores obtidos após a incubação com a talidomida. Obviamente, estes resultados apenas sugerem um potencial terapêutico para estes compostos e precisarão ser corroborados com outros experimentos envolvendo modelos *in vivo*. Quando analisados em função de cada linhagem especificamente houve destaque para os seguintes compostos: Linhagem HT-29 apresentou AS-10 < AS-08 < AS-11 < ... < THA. Na linhagem T84, os valores de CC₅₀ apresentaram a seguinte ordem: AS-11 < AS-04 < AS-09 < ... < THA. Finalmente, na linhagem Caco-2 observou-se para os valores de CC₅₀ que AS-08 < AS-09 < AS-11 < ... < THA.

A talidomida apresentou, para as três linhagens testadas, valores de CC_{50} que variaram entre 133,8 μ M e 222,2 μ M. Ao compararmos os valores de CC_{50} nas linhagens tumorais com os valores de CC_{50} para a linhagem não tumoral (Vero) foi possível calcularmos um índice de seletividade para cada composto. Neste quesito, os compostos AS-08 (para a linhagem Caco-2) e AS-11 (para as linhagens HT-29 e T84) destacaram-se, apresentando citotoxicidade potente e seletiva quando comparadas aos demais compostos da série e à talidomida.

Outros estudos mostram derivados ftalimídicos com ação seletiva para o tumor de cólon, além de outros tipos tumorais (KOK *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2016). Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos de seletividade envolvidos na ação dos compostos testados.

Além dessa associação de citotoxicidade e seletividade, os compostos AS-08 e AS-11 destacaram-se na imunomodulação de citocinas importantes no contexto do câncer de cólon.

A exposição de esplenócitos murinos aos derivados ftalimídicos testados revelou uma tendência a redução na concentração de TNF. Este resultado é esperado para derivados da talidomida, bem como para a própria talidomida (CASAL *et al.*, 2016; CORRAL *et al.*, 1996). Notadamente, o composto AS-11 apresentou uma forte e significativa redução na concentração de TNF em todos os tempos testados quando comparada as células sem tratamento (grupo basal).

A inibição da produção de TNF por análogos da talidomida tem sido observada em diversos modelos de estudo (CASAL *et al.*, 2016; COELHO *et al.*, 2014; FAKHOURY *et al.*, 2014; MAZZOCCOLI *et al.*, 2012; SHORTT; HSU; JOHNSTONE, 2013; SOUZA *et al.*, 2012).

Estudos demonstraram que uma maior quantidade de espaçadores entre os dois anéis heterocíclicos e também a presença de grupos nitro como substituintes aumentam a ação imunomodulatória de derivados da talidomida (FERREIRA *et al.*, 2015; GODIN *et al.*, 2017; MAZZOCCOLI *et al.*, 2012). Interessantemente, apenas dois compostos da série testada neste trabalho, AS-11 e AS-08, apresentam o grupo nitro como substituinte, e esses dois compostos inibiram fortemente a produção de TNF pelos esplenócitos em todos os tempos de incubação testados.

Os compostos AS-08 e AS-11 também demonstraram induzir um aumento significativo na produção da citocina IL-10. A redução de TNF, associada a um aumento da produção IL-10, também foi observada por Mazzocchi *et al.* (2012) em

seu trabalho envolvendo derivados da talidomida. A citocina IL-10 tem um papel essencial na manutenção da homeostase gastrointestinal, apresentando predominantemente uma ação anti-inflamatória (LI *et al.*, 2014). O aumento de IL-10 induzido pelos derivados ftalimídicos testados pode ser explorado em doenças inflamatórias intestinais, inibindo a inflamação intestinal e suprimindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (LI *et al.*, 2014).

Juntamente com o aumento da produção de IL-10, houve indução da produção de IL-4 por AS-08 e, em menor quantidade, por AS-11. A IL-4 também é uma citocina de perfil Th2, anti-inflamatória e importante no controle da exarcebação da resposta de células de perfil Th1 que ocorre na mucosa do intestino na doença inflamatória intestinal (SILVA *et al.*, 2016).

Estes resultados sugerem haver uma relação estrutural entre a citotoxicidade induzida e os efeitos imunomodulatórios observados. Esta relação entre citotoxicidade e imunomodulação precisa ser alvo de novos estudos para um maior entendimento de como isto se processa molecularmente. Tomados em conjunto, os resultados apresentados demonstram que os compostos AS-08 e AS-11 seletivamente inibiram o crescimento das linhagens Caco-2, HT-29 e T84, sugerindo um potencial para a terapêutica do câncer de cólon.

O desenvolvimento e triagem de novos fármacos é um processo por vezes demorado e de custo elevado. Os altos custos de desenvolvimento associados a uma redução no número de novas drogas aprovadas para uso ressaltam a necessidade de abordagens inovadoras no planejamento estrutural, desenvolvimento e triagem de novos compostos (TIAN *et al.*, 2015).

Abordagens *in silico* têm se mostrado promissoras no desenvolvimento e triagem de novas alternativas terapêuticas. Cálculos computacionais permitem uma triagem de um número muito grande de moléculas em um período de tempo curto, com um custo associado relativamente baixo e com um grau de confiabilidade cada vez mais elevado (TIAN *et al.*, 2015). Uma vez que os compostos testados neste trabalho apresentam uma forte característica imunomodulatória, notadamente sobre a citocina TNF, ensaios computacionais foram planejados para os compostos mais promissores.

A talidomida apresenta uma série de alvos descritos na literatura, dentre eles está a proteína IKK β . Esta proteína é uma enzima importante na regulação da sinalização celular realizada por NF- κ B (BISWAS; BAGCHI, 2016). A transcrição do

fator NF- κ B e os fatores reguladores associados (como a IKK β e Bcl-3) são fortemente relacionados a uma variedade de tumores sólidos e hematológicos. O papel do NF- κ B está atrelado à regulação da proliferação celular, controle da apoptose, promoção da angiogênese e estímulo de metástases. A inibição de NF- κ B sozinha, ou em combinação com terapias antitumorais conduzem à morte celular ou inibição do crescimento das células tumorais, sendo assim, uma abordagem terapêutica promissora (KIM; HAWKE; BALDWIN, 2006; TSOLOU *et al.*, 2017). A correlação entre a sinalização IKK β /NF- κ B e a tumorigênese tem sido relatada em recentes publicações, bem como os efeitos da inibição desta rota de sinalização como uma estratégia terapêutica a ser explorada em diversos tipos de câncer (BAMBOROUGH *et al.*, 2009; FUSELLA *et al.*, 2017; GUPTA *et al.*, 2010; TSOLOU *et al.*, 2017). Especialmente no câncer de cólon, IKK β interconecta a inflamação e a tumorigênese (GRETEN *et al.*, 2004).

Tem sido cogitado que a ação terapêutica da talidomida possa estar associada a um bloqueio da sinalização do fator de transcrição NF- κ B, via inibição de IKK β (YANG *et al.*, 2015). A utilização do fator de transcrição NF- κ B e da proteína IKK β como alvos terapêuticos no câncer também já foi alvo de diversos estudos científicos com produtos naturais e sintéticos (HUANG *et al.*, 2013; KIM; HAWKE; BALDWIN, 2006; LEUNG *et al.*, 2013; TSOLOU *et al.*, 2017). A proteína IKK β desenvolve um importante papel na via de NF- κ B, atuando através da ligação a proteína I κ B, como apresentado na **figura 14** (BISWAS; BAGCHI, 2016). Tendo em vista essa possibilidade, foram realizados ensaios computacionais visando propor um possível mecanismo de ligação entre os compostos análogos da talidomida e a enzima IKK β . Foi possível confirmar *in silico* a interação de compostos da série AS a resíduos de aminoácido do sítio ativo por ligações de hidrogênio, contatos hidrofóbicos e interações cátion- π , corroborando os resultados obtidos *in vitro*.

Após análise das interações do composto AS-01, que apresentou os resultados menos satisfatórios tanto *in vitro* como *in silico*, com resíduos de aminoácidos do sítio ativo da proteína IKK β , foi possível observar que estas interações ocorreram com um número menor de resíduos de aminoácido e apenas através de contatos hidrofóbicos. Os compostos AS-08, AS-10 e AS-11 apresentaram, em ordem crescente, os maiores valores de *score* de *docking* molecular que se justificaram pela maior quantidade de interações destes com resíduos de aminoácidos do sítio ativo da proteína IKK β .

6 CONCLUSÕES

- Os compostos AS-14, AS-11 e AS10 apresentaram baixa citotoxicidade sobre células da linhagem Vero, com os maiores valores de CC_{50} entre os compostos da série AS;
- As moléculas AS-08, AS-10 e AS-11 destacaram-se quanto a atividade biológica frente as três linhagens testadas, com os menores valores de CC_{50} e maiores seletividades.
- Os compostos AS-08 e AS-11 foram identificados como indutores da produção de citocinas imunossupressoras, o que pode ser explorado na geração de uma resposta imune anti-inflamatória, que é benéfica e associada ao não surgimento ou não progressão do câncer colorretal.
- Foi demonstrada a correlação entre os estudos *in vitro* e *in silico*, o que permitiu descrever as razões moleculares que justificam a maior interação dos compostos com melhores resultados *in vitro* com a proteína IKK β , pela utilização da metodologia do *docking* molecular.
- Os resultados obtidos ressaltam o composto AS-11 como o composto mais promissor da série AS, e reforçam o potencial dos derivados ftalimídicos para o tratamento de patologias com forte influência do contexto imunológico, como o câncer de cólon. Melhoramentos estruturais subsequentes poderão levar a uma redução dos valores de CC_{50} nas células tumorais e a maiores efeitos sobre células do sistema imunológico.

REFERÊNCIAS

- AL-SHA'ER, M. A.; ALMAZARI, I. S.; TAHA, M. O. Discovery of novel potent nuclear factor kappa-B inhibitors (IKK- β) via extensive ligand-based modeling and virtual screening. **Journal of Molecular Recognition**, v. 30, n. 6, p. 1–16, 2017.
- ALIABADI, A. *et al.* Phthalimide analogs as probable 15- lipoxygenase-1 inhibitors: synthesis, biological evaluation and docking studies. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 1, p. 36, 2015.
- ALIANÇA, A. S. DOS S. *et al.* In vitro evaluation of cytotoxicity and leishmanicidal activity of phthalimido-thiazole derivatives. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. April, p. 1–10, 2017.
- ANDREWS, K. T.; FISHER, G.; SKINNER-ADAMS, T. S. Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 4, n. 2, p. 95–111, ago. 2014.
- ATCC. **Colon Cancer Panels 1 and 2**, 2004.
- AUGUSTIN, E. *et al.* Antitumor 1-nitroacridine derivative C-1748, induces apoptosis, necrosis or senescence in human colon carcinoma HCT8 and HT29 cells. **Biochemical pharmacology**, v. 79, n. 9, p. 1231–41, 1 maio 2010.
- AZAM, S.; ABBASI, S.; TAHIR, S. Investigation of Novel Chemical Inhibitors of Human Lysosomal Acid Lipase: Virtual Screening and Molecular Docking Studies. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 17, n. 5, p. 473–482, 2014.
- BAMBOROUGH, P. *et al.* Progress Towards the Development of Anti-Inflammatory Inhibitors of IKK β . **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 7, p. 623–639, 1 maio 2009.
- BAMFORD, S. *et al.* The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. **British Journal of Cancer**, v. 2, p. 355–358, 2004.
- BANERJEE, M.; SAHOO, S.; SAHU, S. K. in Silico Designing and Molecular Docking Studies on Selected Reported & Proposed New Compounds Against Ppar- γ Receptor for Type -2-Diabetes. v. 5, n. 4, p. 1022–1030, 2016.
- BASU, A.; SINHA, B. N. Understanding the molecular interactions of different radical scavengers with ribonucleotide reductase M2 (hRRM2) domain: Opening the gates and gaining access. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 26, n. 7, p. 865–881, 2012.
- BAUDINO, T. A. Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. p. 3–20, 2015.
- BERMAN, H. M. *et al.* The protein data bank. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000.
- BERTOLINI, F.; SUKHATME, V. P.; BOUCHE, G. Drug repurposing in oncology-patient and health systems opportunities. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 12, n. 12, p. 732–742, 20 dez. 2015.
- BINDEA, G. *et al.* Natural immunity to cancer in humans. **Current opinion in immunology**, v. 22, n. 2, p. 215–22, abr. 2010.
- BINDEA, G. *et al.* The immune landscape of human tumors: Implications for cancer

immunotherapy. **Oncoimmunology**, v. 3, n. 1, p. e27456, 2014.

BISWAS, R.; BAGCHI, A. NFkB pathway and inhibition: an overview. **Computational Molecular Biology**, v. 6, n. 1, p. 1–20, 2016.

CAMBRIDGE STRUCTURAL DATABASE. GOLD 5.2. [s.d.].

CASAL, J. J. *et al.* Thalidomide analogues: Tumor necrosis factor-alpha inhibitors and their evaluation as anti-inflammatory agents. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 83, p. 114–119, 2016.

CHEN, M.; DOHERTY, S. D.; HSU, S. Innovative uses of thalidomide. **Dermatologic clinics**, v. 28, n. 3, p. 577–86, jul. 2010.

CHEN, Y.; SHOICHET, B. K. Molecular docking and ligand specificity in fragment-based inhibitor discovery. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 5, p. 358–364, 2009.

CHONG, M. F.; CHAN, A. Thalidomide for Delayed Chemotherapy-Induced Nausea and Vomiting: Where Is Its Place in Therapy? **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, p. JCO2017764316, 25 jan. 2018.

COÊLHO, L. C. D. *et al.* Novel phthalimide derivatives with TNF- α and IL-1 β expression inhibitory and apoptotic inducing properties. **MedChemComm**, v. 5, n. 6, p. 758, 2014.

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

CORRAL, L. G. *et al.* **Selection of novel analogs of thalidomide with enhanced tumor necrosis factor alpha inhibitory activity.** **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, jul. 1996. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2230173&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>

COUSSENS, N. P. *et al.* Small-Molecule Screens : A Gateway to Cancer Therapeutic Agents with Case Studies of Food and Drug Administration – Approved Drugs. n. October, p. 479–496, 2017.

DA COSTA, P. M. *et al.* Improvement of in vivo anticancer and antiangiogenic potential of thalidomide derivatives. **Chemico-Biological Interactions**, v. 239, p. 174–183, 2015.

DE MORAES GOMES, P. A. T. *et al.* Phthalimido-thiazoles as building blocks and their effects on the growth and morphology of Trypanosoma cruzi. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 111, p. 46–57, 2016.

DE OLIVEIRA CARDOSO, M. V. *et al.* Design, synthesis and structure - Activity relationship of phthalimides endowed with dual antiproliferative and immunomodulatory activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 96, p. 491–503, 2015.

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

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

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

- DUNN, G. P.; KOEBEL, C. M.; SCHREIBER, R. D. Interferons, immunity and cancer immunoediting. **Nature reviews. Immunology**, v. 6, n. 11, p. 836–48, nov. 2006.
- DURRANT, J. D.; MCCAMMON, J. A. BINANA: A novel algorithm for ligand-binding characterization. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 29, n. 6, p. 888–893, abr. 2011.
- FAKHOURY, M. *et al.* Use of artificial cell microcapsule containing thalidomide for treating TNBS-induced Crohn's disease in mice. **Current Drug Delivery**, v. 11, p. 146–153, 2014.
- FERREIRA, P. M. P. *et al.* Cytotoxic and toxicological effects of phthalimide derivatives on tumor and normal murine cells. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 87, n. 1, p. 313–330, 2015.
- FOUAD, Y. A.; AANEI, C. Revisiting the hallmarks of cancer. **American Journal of Cancer Research**, v. 7, n. 5, p. 1016–1036, 2017.
- FRIDMAN, W. H. *et al.* The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. **Nature reviews. Cancer**, v. 12, n. 4, p. 298–306, abr. 2012.
- FUMIAN, M. M. *et al.* LASSBio-1425, an analog of thalidomide, decreases triglyceride and increases HDL cholesterol levels by inhibition of TNF- α production. **International Journal of Cardiology**, v. 202, p. 497–499, jan. 2016.
- FUSELLA, F. *et al.* The IKK/NF- κ B signaling pathway requires Morgana to drive breast cancer metastasis. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1–17, 2017.
- GERMANO, G.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Cytokines as a key component of cancer-related inflammation. **Cytokine**, v. 43, n. 3, p. 374–9, set. 2008.
- GODIN, A. M. *et al.* 2-Phthalimidethanol and 2-phthalimidethyl nitrate inhibit mechanical allodynia, neutrophil recruitment and cytokine and chemokine production in a murine model of articular inflammation. **Pharmacological Reports**, v. 69, n. 4, p. 691–695, ago. 2017.
- GRETEN, F. R. *et al.* IKK β links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. **Cell**, v. 118, n. 3, p. 285–296, 2004.
- GUPTA, S. C. *et al.* Inhibiting NF- κ B activation by small molecules as a therapeutic strategy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1799, n. 10–12, p. 775–787, out. 2010.
- GUPTA, S. C. *et al.* Cancer drug discovery by repurposing: Teaching new tricks to old dogs. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, n. 9, p. 508–517, 2013.
- HAMBLEY, T. W. Is anticancer drug development heading in the right direction? **Cancer research**, v. 69, n. 4, p. 1259–62, fev. 2009.
- HANAHAHAN, D.; COUSSENS, L. M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. **Cancer cell**, v. 21, n. 3, p. 309–22, 20 mar. 2012.
- HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, mar. 2011.
- HASHIMOTO, Y. Thalidomide as a multi-template for development of biologically active compounds. **Archiv der Pharmazie**, v. 341, n. 9, p. 536–47, set. 2008.
- HORVAT, M. *et al.* Evaluation of antiproliferative effect of N-(alkyladamantyl)phthalimides in vitro. **Chemical biology & drug design**, v. 79, n. 4,

p. 497–506, abr. 2012.

HU, Y. A feedforward loop of NLRC5 (de)ubiquitination keeps IKK-NF- κ B in check. **Journal of Cell Biology**, v. 211, n. 5, p. 941–943, 2015.

HUANG, J.-J. *et al.* Novel IKK β inhibitors discovery based on the co-crystal structure by using binding-conformation-based and ligand-based method. **European journal of medicinal chemistry**, v. 63, p. 269–78, maio 2013.

INCA. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil** Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>>. Acesso em: 19 abr. 2018

ISRAEL, A. **The IKK Complex, a Central Regulator of NF-kappaB Activation** Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010a. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20300203>

ISRAEL, A. The IKK Complex, a Central Regulator of NF- B Activation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 3, p. a000158–a000158, 1 mar. 2010b.

KAMPMANN, S. S. *et al.* The synthesis and fluorescence profile of novel thalidomide analogues. **Tetrahedron**, v. 71, n. 42, p. 8140–8149, 2015.

KARIM, N. *et al.* Molecular docking and anti-amnesic effects of nepitrin isolated from *Rosmarinus officinalis* on scopolamine-induced memory impairment in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, n. June, p. 700–709, 2017.

KATSILA, T. *et al.* Computational approaches in target identification and drug discovery. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 14, p. 177–184, 2016.

KEIFER, J. A. *et al.* Inhibition of NF- κ B Activity by Thalidomide through Suppression of I κ B Kinase Activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 25, p. 22382–22387, 2001.

KIM, H. J.; HAWKE, N.; BALDWIN, A. S. NF- κ B and IKK as therapeutic targets in cancer. **Cell Death and Differentiation**, v. 13, n. 5, p. 738–747, 2006.

KINCAID, E. A second look: Efforts to repurpose old drugs against Zika cast a wide net. **Nature Medicine**, v. 22, n. 8, p. 824–825, 2016.

KOK, S. H. L. *et al.* Synthesis and anti-cancer activity of benzothiazole containing phthalimide on human carcinoma cell lines. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 7, p. 3626–3631, 2008.

KROEMER, G. *et al.* Immunogenic cell death in cancer therapy. **Annual review of immunology**, v. 31, p. 51–72, jan. 2013.

KUSHWAHA, N.; KAUSHIK, D. Recent Advances and Future Prospects of Phthalimide Derivatives. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, p. 159–171, 2016.

LAGUNIN, A. A. *et al.* Chemo- and bioinformatics resources for in silico drug discovery from medicinal plants beyond their traditional use: a critical review. **Nat. Prod. Rep.**, v. 31, n. 11, p. 1585–1611, 2014.

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

LEITE, A. C. L. *et al.* Phthaloyl amino acids as anti-inflammatory and

immunomodulatory prototypes. **Medicinal Chemistry Research**, v. 23, n. 2014, p. 1701–1708, 2013.

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

LEUNG, C.-H. *et al.* Hit identification of IKK β natural product inhibitor. **BMC pharmacology & toxicology**, v. 14, n. 1, p. 3, jan. 2013.

LI, B. *et al.* IL-10 modulates DSS-induced colitis through a macrophage-ROS-NO axis. **Mucosal Immunology**, v. 7, n. 4, p. 869–878, 2014.

LI, J. *et al.* Inhibition of autophagy by 3-MA enhances the effect of 5-FU-induced apoptosis in colon cancer cells. **Annals of surgical oncology**, v. 16, n. 3, p. 761–771, 2009.

LI, P.-K. *et al.* A thalidomide analogue with in vitro antiproliferative, antimitotic, and microtubule-stabilizing activities. **Molecular cancer therapeutics**, v. 5, n. 2, p. 450–6, fev. 2006.

LIN, C.; ZHANG, J. Inflammasomes in inflammation-induced cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. MAR, p. 1–22, 2017.

LINDNER, S.; KRÖNKE, J. The molecular mechanism of thalidomide analogs in hematologic malignancies. **Journal of Molecular Medicine**, v. 94, n. 12, p. 1327–1334, 2016.

LIU, S. *et al.* Crystal structure of a human I κ B Kinase β asymmetric dimer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 31, p. 22758–22767, 2013a.

LIU, T. *et al.* **NF- κ B signaling in inflammation** *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/sigtrans201723>>

LIU, Y. *et al.* A novel effect of thalidomide and its analogs: Suppression of cereblon ubiquitination enhances ubiquitin ligase function. **FASEB Journal**, v. 29, n. 12, p. 4829–4839, 2015.

LIU, Z. *et al.* In silico drug repositioning: what we need to know. **Drug discovery today**, v. 18, n. 3–4, p. 110–5, fev. 2013b.

LUO, C.; ZHANG, H. The Role of Proinflammatory Pathways in the Pathogenesis of Colitis-Associated Colorectal Cancer. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, 2017.

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

LUO, Y. *et al.* Expression of the novel adipokine C1qTNF-related protein 4 (CTRP4) suppresses colitis and colitis-associated colorectal cancer in mice. **Cellular & molecular immunology**, v. 13, n. 5, p. 688–699, 2016.

MAY, B. H. *et al.* In silico database screening of potential targets and pathways of compounds contained in plants used for psoriasis vulgaris. **Archives of Dermatological Research**, v. 307, n. 7, p. 645–657, 2015.

MAZZOCCOLI, L. *et al.* Novel thalidomide analogues from diamines inhibit pro-inflammatory cytokine production and CD80 expression while enhancing IL-10. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 66, n. 5, p. 323–9, jul. 2012.

MCLEAN, M. H. *et al.* The inflammatory microenvironment in colorectal Neoplasia. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, 2011.

MERCURIO, A. *et al.* A Mini-Review on Thalidomide: Chemistry, Mechanisms of

Action, Therapeutic Potential and Anti-Angiogenic Properties in Multiple Myeloma. **Current Medicinal Chemistry**, v. 24, p. 2736–2744, 2017.

MILLER, K. D. *et al.* Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 66, n. 4, p. 271–289, jul. 2016.

MILLRINE, D.; KISHIMOTO, T. A Brighter Side to Thalidomide: Its Potential Use in Immunological Disorders. **Trends in Molecular Medicine**, v. 23, n. 4, p. 348–361, abr. 2017.

MORI, T. *et al.* Structural basis of thalidomide enantiomer binding to cereblon. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1294, 2018.

MORO, A.; INVERNIZZI, N. The thalidomide tragedy: the struggle for victims' rights and improved pharmaceutical regulation. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 24, n. 3, p. 603–622, 2017.

MORVAN, M. G.; LANIER, L. L. NK cells and cancer: You can teach innate cells new tricks. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 1, p. 7–19, 2016.

NEURATH, M. F. Cytokines in inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 5, p. 329–342, 22 maio 2014.

NWAKA, S. *et al.* Advancing drug innovation for neglected diseases-criteria for lead progression. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 3, n. 8, p. e440, jan. 2009.

OGINO, S. *et al.* Cancer immunology--analysis of host and tumor factors for personalized medicine. **Nature reviews. Clinical oncology**, v. 8, n. 12, p. 711–9, dez. 2011.

OLIVEIRA, A. R. **Obtenção de novos ftalil-tiazóis e avaliação das atividades antitumoral e imunomodulatória in vitro.** [s.l.: s.n.].

PACCA, C. C. *et al.* Thiosemicarbazones and Phthalyl-Thiazoles compounds exert antiviral activity against yellow fever virus and Saint Louis encephalitis virus. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, p. 381–387, mar. 2017.

PADMA, V. V. An overview of targeted cancer therapy. v. 5, n. 4, p. 1–6, 2015.

PAGE, A. *et al.* Context-Dependent Role of IKK β in Cancer. **Genes**, v. 8, n. 12, p. 376, 8 dez. 2017.

PARASURAMAN, S. Prediction of activity spectra for substances. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 2, n. 1, p. 52, 2011.

PATIL, K. R. *et al.* Pentacyclic triterpenoids inhibit ikk β mediated activation of nf-kb pathway: In silico and in vitro evidences. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–30, 2015.

PESSOA, C. *et al.* Discovery of Phthalimides as Immunomodulatory and Antitumor Drug Prototypes. **ChemMedChem**, v. 5, n. 4, p. 523–528, 6 abr. 2010.

PIRES, B. *et al.* NF-kappaB: Two Sides of the Same Coin. **Genes**, v. 9, n. 1, p. 24, 2018.

POPIVANOVA, B. K. *et al.* **Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis.** **The Journal of clinical investigation**, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2213370&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>

QIN, J. *et al.* Colon cancer cell treatment with rose bengal generates a protective immune response via immunogenic cell death. **Cell Death and Disease**, v. 8, n. 2, p.

e2584, 2017.

RABELLO, M. M. **Desenvolvimento e automação de metodologias in silico para o estudo de complexos de inclusão utilizados na inovação terapêutica.** [s.l: s.n.].

RASK-ANDERSEN, M.; ALMÉN, M. S.; SCHIÖTH, H. B. Trends in the exploitation of novel drug targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 8, p. 579–590, ago. 2011.

REYES-ZURITA, F. J. *et al.* Maslinic acid, a natural triterpene from *Olea europaea* L., induces apoptosis in HT29 human colon-cancer cells via the mitochondrial apoptotic pathway. **Cancer letters**, v. 273, n. 1, p. 44–54, 8 jan. 2009.

ROCHA, G. B. *et al.* RM1: A reparameterization of AM1 for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I. **Journal of Computational Chemistry**, v. 27, n. 10, p. 1101–1111, 30 jul. 2006.

SALES LUIZ VIANNA, F. *et al.* Pharmacoepidemiology and thalidomide embryopathy surveillance in Brazil. **Reproductive Toxicology**, v. 53, p. 63–67, jun. 2015.

SANSEAU, P.; KOEHLER, J. Editorial: Computational methods for drug repurposing. **Briefings in Bioinformatics**, v. 12, n. 4, p. 301–302, 1 jul. 2011.

SANTIAGO, E. D. F. *et al.* Evaluation of the Anti- *Schistosoma mansoni* Activity of Thiosemicarbazones and Thiazoles. v. 58, n. 1, p. 352–363, 2014.

SANTOS, T. A. R. DOS *et al.* Antitumor and immunomodulatory activities of thiosemicarbazones and 1,3-Thiazoles in Jurkat and HT-29 cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 82, p. 555–560, 2016.

SARDANA, D. *et al.* Drug repositioning for orphan diseases. **Briefings in bioinformatics**, v. 12, n. 4, p. 346–56, jul. 2011.

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

SCHREIBER, R. D.; OLD, L. J.; SMYTH, M. J. Cancer Immunoediting : Integrating Suppression and Promotion. v. 331, n. March, p. 1565–1570, 2011.

SEARS, C. L.; GARRETT, W. S. Microbes, microbiota, and colon cancer. **Cell Host and Microbe**, v. 15, n. 3, p. 317–328, 2014.

SERUGA, B. *et al.* Cytokines and their relationship to the symptoms and outcome of cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 8, n. 11, p. 887–99, nov. 2008.

SHAMEER, K.; READHEAD, B.; DUDLEY, J. T. Computational and Experimental Advances in Drug Repositioning for Accelerated Therapeutic Stratification. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 15, n. 1, p. 5–20, 2015.

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

SHI, Z. *et al.* In silico analysis of molecular mechanisms of legume lectin-induced apoptosis in cancer cells. **Cell Proliferation**, v. 46, n. 1, p. 86–96, 2013.

SHORTT, J.; HSU, A. K.; JOHNSTONE, R. W. Thalidomide-analogue biology: immunological, molecular and epigenetic targets in cancer therapy. **Oncogene**, v. 32, n. 36, p. 4191–202, 5 set. 2013.

SILVA, F. A. R. *et al.* The Immunological Basis of Inflammatory Bowel Disease.

Gastroenterology Research and Practice, v. 2016, 2016.

SLIWOSKI, G. *et al.* Computational methods in drug discovery. **Pharmacol. Rev.**, v. 66, n. 1, p. 334–395, 2014.

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

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

TALAAT, R. *et al.* Novel thalidomide analogs: Anti-angiogenic and apoptotic effects on Hep-G2 and MCF-7 cancer cell lines. **Biomedicine & Aging Pathology**, v. 4, n. 3, p. 179–189, 2014.

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

The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3 Schrödinger, LLC., (n.d.). [s.d.].

TIAN, S. *et al.* The application of in silico drug-likeness predictions in pharmaceutical research. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 86, p. 2–10, 2015.

TOPHAM, C. *et al.* Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin as Adjuvant Treatment for Colon Cancer. p. 2343–2351, 2004.

TSOLOU, A. *et al.* Inhibition of IKK-NF κ B pathway sensitizes lung cancer cell lines to radiation. **Cancer Biology & Medicine**, v. 14, n. 3, p. 293, 2017.

VANNEMAN, M.; DRANOFF, G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. **Nature reviews. Cancer**, v. 12, n. 4, p. 237–51, abr. 2012.

VARGESSON, N. Thalidomide-induced teratogenesis: History and mechanisms. **Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews**, v. 105, n. 2, p. 140–156, 2015.

VEERAPPAN, K. *et al.* Inhibition of IKK β by celastrol and its analogues - An in silico and in vitro approach. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 368–373, 2017.

VIANNA, F. S. L.; SANSEVERINO, M. T. V.; FACCINI, L. S. Thalidomide Analogs in Brazil: Concern About Teratogenesis. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 2, p. 2–8, 2014.

WANG, M. *et al.* N-Hydroxyphthalimide exhibits antitumor activity by suppressing mTOR signaling pathway in BT-20 and LoVo cells. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 35, n. 1, p. 1–12, 2016.

WAVEFUNCTION, I. Spartan'08 Tutorial and User's Guide. 2008.

WHO. **CancerFact sheet N°297 February 2011**, 2011. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>

WHO. Cancer- Fact sheet. **World Health Organization**, n. February, p. 1–7, 2018.

WÜRTH, R. *et al.* Drug-repositioning opportunities for cancer therapy: novel molecular targets for known compounds. **Drug Discovery Today**, out. 2015.

XU, G. *et al.* **Crystal structure of inhibitor of kb kinase β** *Nature*, 2011.

YANG, C. *et al.* Systematic review: Thalidomide and thalidomide analogues for treatment of inflammatory bowel disease. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 41, n. 11, p. 1079–1093, 2015.

ZENG, X. *et al.* Pantoprazole, an FDA-approved proton-pump inhibitor, suppresses colorectal cancer growth by targeting T-cell- originated protein kinase. **Oncotarget**, v. 7, n. 16, 2016.

ZHOU, S. *et al.* Thalidomide-a notorious sedative to a wonder anticancer drug. **Current medicinal chemistry**, v. 20, n. 33, p. 4102–8, 2013.

APÊNDICE A – MANUSCRITO SUBMETIDO

Manuscrito submetido a revista *Biomedicine and pharmacotherapy*.

In silico and *in vitro* evidences of anticancer and immunomodulatory effects of phthalimide derivatives on colon cancer cells.

Thiago André Ramos dos Santos ^{a*}, Aline Caroline da Silva Santos ^a, Arsênio Rodrigues Oliveira ^b, Marcelo Montenegro Rabello ^c, Marcelo Zaldini Hernandez ^d, Ana Cristina Lima Leite ^b and Valéria R. A. Pereira ^a

^a Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Laboratório de Imunogenética, CEP 50670-420, Recife, PE, Brazil. ^b Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Planejamento em Química Medicinal, CEP 50740-520, Recife, PE, Brazil. ^c Universidade Federal do Vale do São Francisco, Central de Análise de Fármacos, Medicamentos e Alimentos, CEP: 56304-205, Petrolina, PE, Brazil. ^d Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Química Teórica Medicinal, CEP 50740-520, Recife, PE, Brazil.

*Corresponding author: Thiago André R. dos Santos (tandre.ufpe@gmail.com)

ABSTRACT:

Cancer remains a major cause of death worldwide and was the cause of 8.8 million deaths in 2015, and colorectal cancer is the third most prevalent. Development of small molecules with biological activity is important because it provides new alternatives for cancer treatment. Thalidomide is a synthetic compound most known for its involvement in a big pharmacological disaster, after its use for morning sickness by pregnant women. Despite this notorious episode involving teratogenesis, thalidomide was rediscovered, and now is used for the treatment of several diseases. Notably, thalidomide structure may serve as an interesting scaffold for the development of new phthalimide derivatives, and it presents a diverse amount of pharmacologic effects, including anti-neoplastic, epigenetic, anti-angiogenic and anti-inflammatory properties. The aim of this work was to evaluate a series of thalidomide analogs for its antitumor effects and immunomodulatory properties through *in vitro* and *in silico* approaches. The series concern 14 molecules, which have a common phthalimide core and vary in some substituents. Cytotoxic effects were assessed with colon cancer cell lines and Vero cells by MTT assay. Cytometric Bead Array (CBA) was used to detect Th1, Th2 and Th17 cytokine profiles in supernatants of mice splenocytes stimulated with each compound at CC_{50} after 24 h, 48 h, 72 h and six days of incubation. Compounds tested revealed toxicity and selectivity to tumor cells when compared to thalidomide, with CC_{50} values between 25 μ L e 274.9 μ L. Compounds also shown remarkable immunomodulatory effects, especially in the modulation of TNF and IL-10, key cytokines in development and progression of colorectal cancer. In order to evaluate a possible correlation between *in vitro* effects and the IKK β protein, an important player in NF- κ B signaling pathway, we performed molecular docking calculations with IKK β as target. Through molecular docking was possible to describe the molecular interactions between compounds from AS series and amino acid residues in the active site of the protein IKK β , which demonstrated good correlation with *in vitro* results. After analyzing all results, compound 2k stood out, with the better toxicity, high selectivity and high induction of decrease TNF production when compared to the other series compounds. Results corroborate the expected anticancer and immunomodulatory activities of thalidomide analogs, with a possible interaction with IKK β protein.

Keywords: Colon Cancer. Immunomodulation. Phthalimide. IKK β protein.

INTRODUCTION

Immunomodulation is a therapeutic resource of special interest in treatment of several diseases. Immune system and inflammation are essential elements to avoid apparition and progression of cancer, especially in the context of colorectal cancer, and strategies that regulate these aspects have been shown to be important in therapeutics [1–3].

Thalidomide is a phthalimide molecule most known for its involvement in a bigger pharmacological disaster, after its use for morning sickness by pregnant women [4]. Despite this notorious episode, thalidomide was rediscovered, and now is used for treatment of many disease [5–7]. Notably, thalidomide structure may serve as an interesting scaffold for the development of new phthalimide derivatives, as it presents a vast amount of pharmacologic effects [7–11].

Several genes may be involved in tumor protection / progression, depending on the context of their mutations. One of the well-studied and related genes is IKBKB, which encodes the inhibitor of nuclear factor kappa-B (NF- κ B) kinase subunit beta, termed IKK β [12]. For immunomodulation, was observed that thalidomide interferes in NF- κ B signaling pathway by the ligation with its inhibitor, I κ B kinase (IKK β) [13]. It is known that thalidomide, through this mechanism, contributes to the bind of I κ B protein to NF- κ B, which is not translocated to the nucleus. Consequently, several target genes, regulated by NF- κ B (as cytokine, chemokine and MHC genes) remains not transcript [14].

The synthesis of new phthalimide derivatives, as thalidomide analogs, has been focused of some research for cancer, demonstrating effects in tumor progression, angiogenesis, immunomodulation and microtubule-stabilizing, by different mechanisms of action [15–17]. In this work, we show *in vitro* effects of a

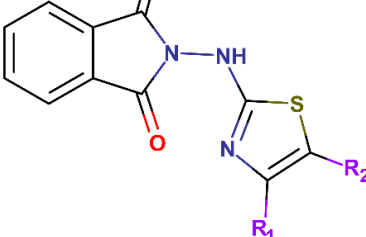
series of phthalimide derivatives and demonstrate by *in silico* approaches, a possible interaction of these molecules with IKK β .

MATERIAL AND METHODS

Compounds

Compounds used in this work were synthesized at Laboratory of Planning in Medicinal Chemistry (LpQM), and were first reported in experiments assessing its effects on the growth and morphology of *Trypanosoma cruzi* [18]. These phthalimido-thiazoles were chemically characterized and presented purity of > 95 %. The series of 14 compounds, have a common scaffold and vary in some substituents, as shown in Figure 1.

Figure 1 - Phthalimido-thiazoles scaffold and radicals.

	Comp.	R ¹	R ²	Comp.	R ¹	R ²
	2a	CH ₂ -Cl	H	2h	4-NO ₂ -Ph	H
	2b	Ph	H	2i	4-Ph-Ph	H
	2c	4-Me-Ph	H	2j	2-Naph	H
	2d	4-MeO-Ph	H	2k	3-NO ₂ -Ph	H
	2e	4-F-Ph	H	2l	3,4-diCl-Ph	H
	2f	4-Cl-Ph	H	2m	2,4-diCl-Ph	H
	2g	4-Br-Ph	H	2n	4-Br-Ph	Me

Cell culture

Colorectal cancer cell lines HT-29, T84 and Caco-2 were cultured for *in vitro* experiments. Vero cells were used as non-tumoral cell line control. T84 cells were maintained in 1:1 mixture of Ham's F12 medium and Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% of Fetal Bovine Serum (FBS). Caco-2 and HT-29 cells were maintained in DMEM supplemented with 10% of FBS and Vero cells in RPMI 1640 supplemented with 10% of FBS. Murine splenocytes were

obtained according to a previous protocol [19] and used to obtaining supernatant for immunomodulation assay. All cell lines were cultured at 37 °C and 5% CO₂.

Cytotoxicity assessment by MTT assay

Aiming to evaluate the effects of compounds against colorectal cancer cells and Vero, MTT-tetrazolium reduction assay was used. For cytotoxicity assessment, 2 x 10⁴ cells/well were seeded in 96-well plates with appropriate culture medium and incubated for 24 h (37 °C and 5 % CO₂). Compounds solubilized in DMSO (0.1 %) were added in six different concentrations (1 to 100 µg/ml) and incubated for 72 h. Thalidomide was used as a reference drug. After 70 h of treatment, 25 µL MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide, 5 mg/mL in PBS) was added to each well. Culture medium and remaining MTT were removed and MTT formazan product was dissolved in 100 µL of DMSO. Absorbance was measured at 570 nm using a plate reader (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Scientific). Concentration leading to 50 % inhibition of viability (CC₅₀) was calculated by regression using Graphpad Prism 5.0 Software.

Immunomodulation assay: Cytometric Bead Array for Th1, Th2 and Th17 cytokines profiles

Cytometric Bead Array (CBA) was used to detect Th1, Th2 and Th17 cytokines profiles in supernatants of mice splenocytes stimulated with each compound, at highest non-toxic concentration (> 90 % incorporation of tritiated thymidine), for 24 h, 48 h, 72 h and six days of incubation[18]. Th1, Th2, Th17 CBA Kit was used according to manufacturer instructions (BD BioSciences). In these

experiments, the production of cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF and IL-17A was quantified. Acquisition and analysis of standards and samples were performed using FACS calibur flow cytometer and BD FCAP Array v3.0 software, respectively.

In silico assays

Molecular docking studies were performed for all compounds, including Thalidomide. Structures of all compounds were obtained in SPARTAN 08' program, by applying the RM1 method [20] which is available as part of SPARTAN program, using internal default settings for convergence criteria. Docking calculations and analysis were performed using the structure of human I κ B Kinase – IKK β - (PDB ID code: 4KIK) as the target [13], which is presented in a co-crystallized complex with an inhibitor referred as “K252A” [21]. Active site of IKK β was defined as all atoms within a radius of 6.0 Å from the co-crystallized ligand. For docking studies, K252A inhibitor was extracted from IKK β chain and was used as a reference ligand. Residues LEU21, THR23, LYS44, MET96, GLU97, TYR98, CYS99, ASP103, ILE165 and ASP166 were treated as flexible during the calculations. The GOLD 5.2 program was used for docking calculations. After that, Binana program was used for analyses of molecular interactions present in the best docking solutions, using default settings, except for hydrogen bond distance, which was changed to a maximum of 3.5 Å. Figures were generated with PyMOL program [22].

Statistical analysis

All experiments were done in triplicate. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test ($p < 0.05$) was used for data analysis. GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, California, EUA) was used for all analysis.

RESULTS

Antitumor effects on HT-29, T84 and Caco-2 cell lines

Cell viability was tried by MTT assay, which demonstrated a consistent activity against all cell lines, specifically for some compounds. Table 1 shows CC₅₀ results for colorectal cancer cells and Vero cells. Lower and higher CC₅₀ results for HT-29 were observed with 2h (68.3 μ M) and 2g (147.3 μ M) respectively. Similarly, for Caco-2 cell line the lower CC₅₀ was observed with 2h (36.8 μ M), therefore the higher one was achieved after incubation with 2a (227.1 μ M). T84 cell line present lower and higher values for CC₅₀ after incubation with 2k (25 μ M) and 2a (229 μ M), respectively.

Table 1. Compounds utilized in this study and their cytotoxicity in HT-29, T84, Caco-2 and Vero cells.

Compound	HT-29	T84	Caco-2	Vero
	CC₅₀ (μM)	CC₅₀ (μM)	CC₅₀ (μM)	CC₅₀ (μM)
2a	111,4	229,0	227,1	124,9
2b	144,3	103,3	95,25	91,56
2c	122,0	66,72	138,2	75,16
2d	131,1	57,4	98,0	61,24
2e	106,1	88,7	107,7	75,76
2f	139,7	79,0	91,4	74,46
2g	147,3	76,0	89,8	53,99
2h	68,3	274,9	36,8	98,54
2i	109,8	57,6	44,5	82,26
2j	66,6	64,0	70,0	126,5
2k	68,8	25,0	69,8	179,3
2l	100,1	185,9	223,0	83,51
2m	126,3	89,1	114,6	55,07
2n	120,4	107,3	99,9	232,0
Thalidomide	133,8	201,9	222,2	186,0

Selectivity index calculation

After evaluating effects of compounds in cell viability, a selectivity index was measured. For this, CC_{50} values from Vero cells (CC_{50} control) and colorectal cancer cells (CC_{50} tumor) were used in the following quotient: CC_{50} control / CC_{50} tumor. Results express how more selective were the compounds tested to colorectal cancer cells in comparison to Vero cells. Results are shown in Table 2.

Table 2. Selectivity index for compounds colorectal cancer cell lines.

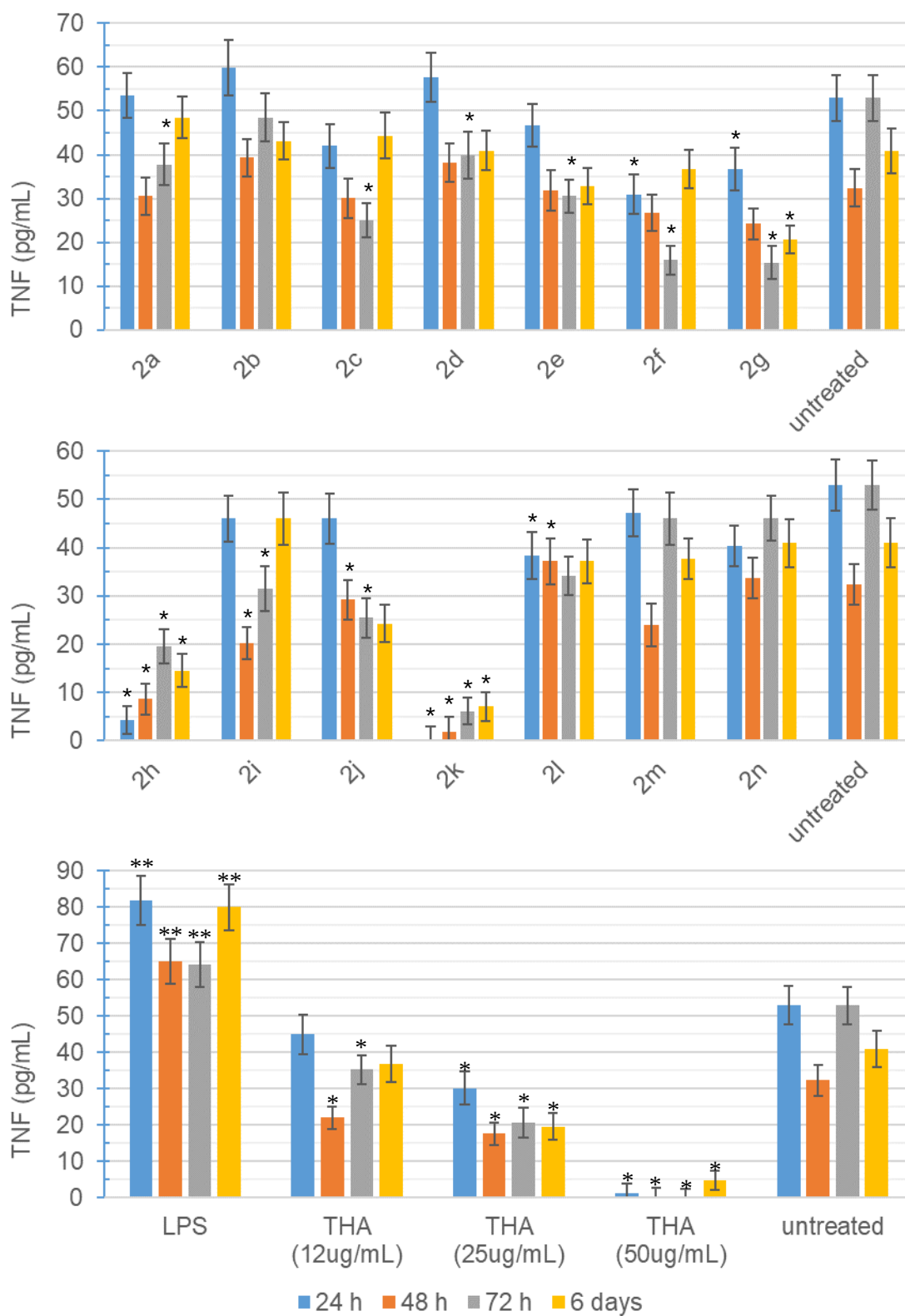
Compound	HT-29	T84	Caco-2
2a	1,12	0,55	0,55
2b	0,63	0,89	0,96
2c	0,62	1,13	0,54
2d	0,47	1,07	0,62
2e	0,71	0,85	0,70
2f	0,53	0,94	0,81
2g	0,37	0,71	0,60
2h	1,44	0,36	2,68
2i	0,75	1,43	1,85
2j	1,90	1,98	1,81
2k	2,61	7,17	2,57
2l	0,83	0,45	0,37
2m	0,44	0,62	0,48
2n	1,93	2,16	2,32
Thalidomide	0,95	1,43	1,58

Regarding selectivity, after calculations based on CC_{50} , 2k highlighted, presenting the highest values of selectivity for two of the three tumor lines tested (HT-29 and T-84). Only for the Caco-2 lineage 2h was more selective, but with selectivity index very close to obtained by 2k. Thalidomide, used in this work as a reference drug, showed intermediate selectivity values, when compared to all compounds.

Effects of phthalimide derivatives on cytokine production

All compounds, except 2b, 2m and 2n, were able to significantly reduce TNF production in at least one of analyzed times. As expected, LPS induced increase and Thalidomide induced reduction of production of this cytokine (Figure 2a, b and c).

Figure 2 – TNF production by spleen cells after compounds stimulation for 24 h, 48 h, 72 h and six days.

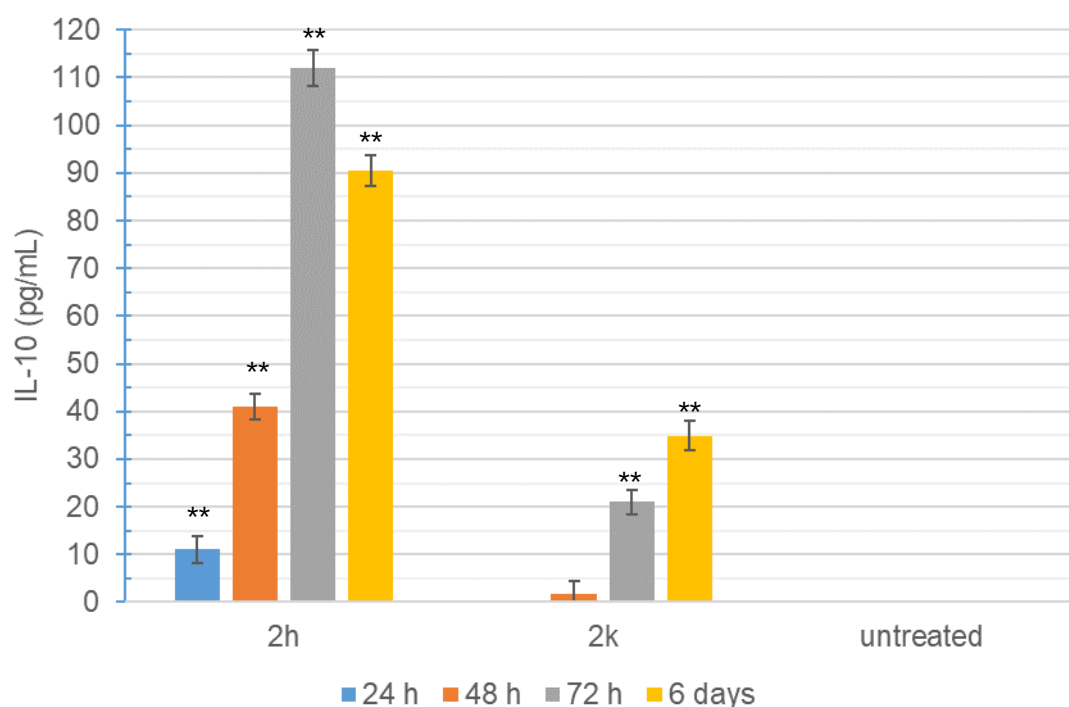


Note: (*) It corresponds to significant decrease and (**) corresponds to significant increase of cytokine concentration when compared to basal control, $p < 0.05$.

Regarding IL-10, an important anti-inflammatory cytokine, only 2h and 2k significantly stimulate its production (Figure 3). Under the tested conditions, production of IL-10 was not detected after incubation with Thalidomide and LPS. IL-4, another important anti-inflammatory cytokine, had its production significantly induced by 2h. Incubation with 2k also produced IL-4, but not significantly (Figure 4).

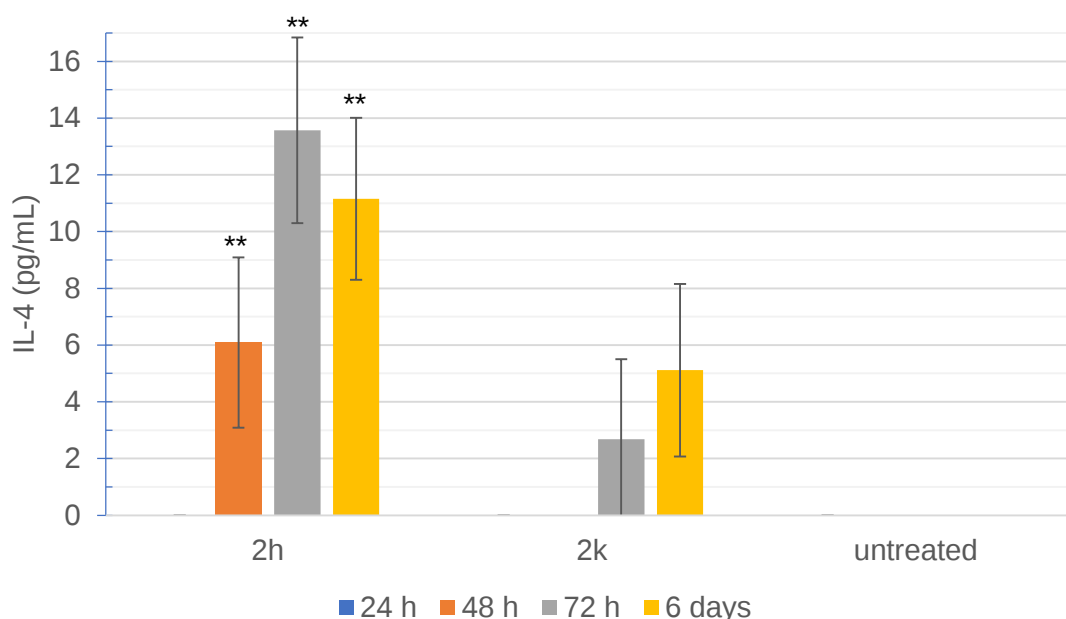
Concerning to IL-2, IL-6, IL-17A and IFN- γ , none of compounds promoted significant production of these cytokines (data not shown).

Figure 3 – IL-10 production by spleen cells after compounds stimulation for 24 h, 48 h, 72 h and six days.



Note: (**) It corresponds to significant increase of cytokine concentration when compared to basal control, $p < 0.05$.

Figure 4 – IL-4 production by spleen cells after compounds stimulation for 24 h, 48 h, 72 h and six days.



Note: (**) It corresponds to significant increase of cytokine concentration when compared to basal control, $p < 0.05$.

***In silico* studies**

Aiming to evaluate a possible correlation between cell proliferation inhibition, immunomodulation properties and IKK β , we conducted computational calculations which allowed us to investigate compounds and IKK β (PDB ID: 4KIK) interactions. IKK β is an important player in NF- κ B signaling pathway, which acts as an inhibitor of I κ B protein [23,24]. Inhibition of IKK β has been sought with synthetic and natural products and is thought to have a important therapeutic function [25–28]. *In silico* analysis of the interaction between IKK β protein and compounds 2a and 2k allowed to propose a possible mechanism by which binding to the inhibitory protein could occur.

Using Binana software, amino acid residues of IKK β active site that would interact with the selected molecules were located. Table 3 shows amino acid residues of the active site

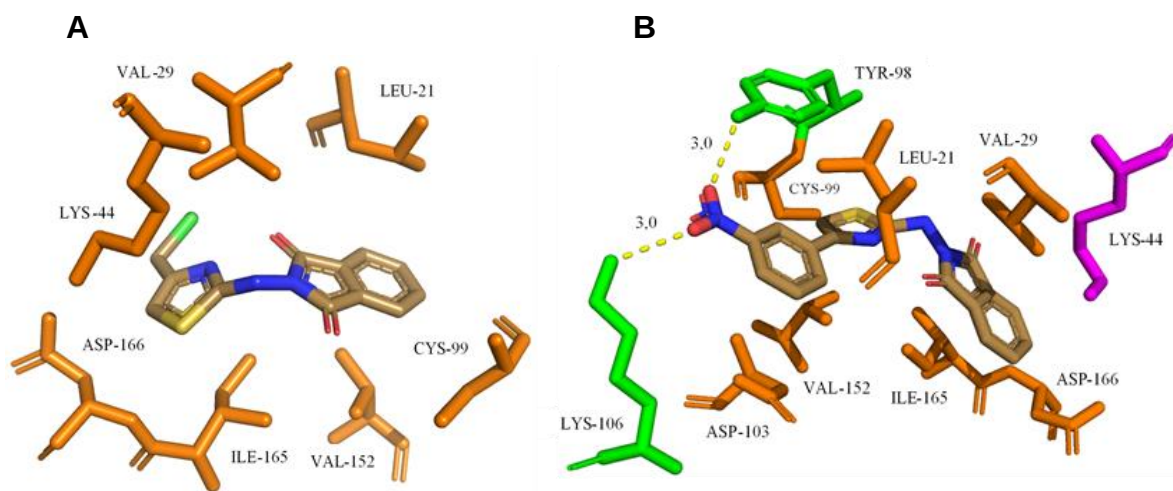
of IKK β which showed potential for interaction with the best docking solutions of each selected compound. Interactions occurred mainly through hydrophobic contact, however hydrogen bonds were also identified. These interaction points are presented visually in figure 5.

Table 3. Residues in IKK β involved in molecular interaction with molecules 2a and 2k.

Residues	Molecules	
	2a	2k
LEU-21	HC	HC
VAL-29	HC	HC
ALA-42	-	-
LYS-44	HC	CAT- π
MET-96	-	-
TYR-98	-	2,8
CYS-99	HC	HC
ASP-103	-	HC
LYS-106	-	3,0
VAL-152	HC	HC
ILE-165	HC	HC
ASP-166	HC	HC
Docking score	60,0	80,01

HC means hydrophobic contacts. Numbers presented means the distances between donor and acceptor atoms in hydrogen bounds, in Angstrom. CAT- π means cation-pi interactions.

Figure 5 – Detailed view of docking solutions for (A) compound 2a and (B) compound 2k. 2a/2k are interacting with orange residues by hydrophobic contact, green residues by hydrogen bonds and with magenta residue by cation- π interaction.



DISCUSSION

Despite the tragic events associated with the use of thalidomide by pregnant women after its launch in the 1950s, the vast biological effects associated with its structure have been of importance in medicinal chemistry. It became clear when, over the last decades, interest in thalidomide has resurfaced [5,29,30]. Thalidomide is an example of a strategy called “drug repositioning” or “drug repurposing” [29,30]. Antitumor action of thalidomide has received special prominence among the range of biological effects, together with its remarkable immunomodulatory effects [11,31,32]. Its structure is composed of two heterocyclic rings, phthalimide and glutaramide and modifications in this structure have been made aiming to increase their therapeutic potential [33].

Compounds tested in this work do not present a chiral center susceptible to racemization in their structures, as occurs with thalidomide. Thus, under the prism of possible enantiomeric forms, compounds tested have a reduced potential for possible side effects associated with these racemic mixtures.

CC₅₀ values obtained for all cell lines after incubation with most of compounds tested were comparatively better than values obtained after incubation with thalidomide. These results suggest a therapeutic potential for these compounds and need to be corroborated with other experiments involving *in vivo* models. When analyzed according to each lineage specifically, the following compounds were highlighted: HT-29: 2j < 2h < 2k < ... < THA, T84: 2k < 2d < 2i < ... < THA and Caco-2: 2h < 2i < 2k < ... < THA.

2h and 2k stood out, showing potent and selective cytotoxicity. In addition to this direct antitumor activity, these compounds were prominent in modulation of important cytokines in the context of colon cancer [10,15,34–37].

It has been showed that the presence of nitro groups as substituents and a larger number of spacers between the two heterocyclic rings increase immunomodulatory action of thalidomide derivatives [35,38,39]. Interestingly, only 2h and 2k, which have the nitro group as substituent, strongly inhibited TNF production by splenocytes, at all incubation times. These same compounds also induced a significant increase in IL-10 production. TNF reduction associated with IL-10 increased was also observed by Mazzocchi *et al.* (2012) in his work with thalidomide

derivatives. IL-10 plays an essential role in the maintenance of gastrointestinal homeostasis, with predominantly anti-inflammatory action [40]. The increase in IL-10 induced by the phthalimide derivatives tested can be exploited in inflammatory bowel diseases, inhibiting intestinal inflammation and suppressing the production of pro-inflammatory cytokines [41,42]. 2h was also able to increase the production of IL-04, another important anti-inflammatory cytokine in the control of exacerbation of Th1 response that occurs in intestinal mucosa in inflammatory bowel disease [43].

In silico approaches have shown promise in development and screening of new therapeutic alternatives. Computational calculations allow screening of a large number of molecules in a very short period of time, with a relatively low cost associated and an increasingly degree of reliability [44]. Since the compounds tested in this work have a strong immunomodulatory characteristic, notably on TNF cytokine, molecular docking was planned for the most promising compounds.

Thalidomide presents a series of well-described targets in the literature, among them is the IKK β protein. IKK β is an important enzyme on NF- κ B regulation. Transcription factor NF- κ B and associated regulatory factors (such as IKK β) are strongly related to a variety of solid and hematological tumors. The role of NF- κ B is linked to regulation of cell proliferation, control of apoptosis, promotion of angiogenesis and metastases stimulation. Inhibition of NF- κ B alone, or in combination with antitumor therapies, leads to cell death or inhibition of tumor cell growth, thus, a promising therapeutic approach [45]. This relationship has been demonstrated in an *in vivo* model of colitis-associated cancer, which was observed to decreased production of proinflammatory cytokines and incidence of tumors in the intestinal epithelium of mice [46].

It has been suggested that thalidomide therapeutic action can be caused by signaling block of transcription factor NF- κ B through inhibition of IKK β [11]. In view of this possibility, we performed computer calculations to understand the binding mode between these thalidomide analogs and IKK β . These interactions were characterized by hydrophobic contacts and hydrogen bonds in the active site of the protein and is aligned with the *in vitro* results obtained. Further experiments are needed to elucidate the involvement of IKK β /NF- κ B signaling pathway in the mechanism of action oh these molecules.

CONCLUSIONS

Anticancer drug development is substantially necessary and the development of new drugs, with antitumor activity and immunomodulatory aspects associated, is an interesting approach. In this work, 2h and 2k stood out for their biological activity against three colon cancer lines, with the lowest values of CC_{50} and higher selectivity of the series. Linked to direct antitumor activity, these same compounds have been identified as modulators of inflammatory immune response, which is beneficial and associated with non-onset or non-progression of colorectal cancer. It was proposed, by computational calculations, a molecular mechanism of binding between thalidomide analogs and $IKK\beta$, through hydrophobic contacts and hydrogen bonds at the active site of the protein.

REFERENCES

- [1] C. Luo, H. Zhang, The Role of Proinflammatory Pathways in the Pathogenesis of Colitis-Associated Colorectal Cancer, *Mediators Inflamm.* 2017 (2017). doi:10.1155/2017/5126048.
- [2] Y. Luo, X. Wu, Z. Ma, W. Tan, L. Wang, D. Na, *et al.*, Expression of the novel adipokine C1qTNF-related protein 4 (CTRP4) suppresses colitis and colitis-associated colorectal cancer in mice., *Cell. Mol. Immunol.* 13 (2016) 688–699. doi:10.1038/cmi.2016.16.
- [3] B.K. Popivanova, K. Kitamura, Y. Wu, T. Kondo, T. Kagaya, S. Kaneko, *et al.*, Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis., *J. Clin. Invest.* 118 (2008) 560–70. doi:10.1172/JCI32453.
- [4] S. Zhou, F. Wang, T.-C. Hsieh, J.M. Wu, E. Wu, Thalidomide-a notorious sedative to a wonder anticancer drug., *Curr. Med. Chem.* 20 (2013) 4102–8. doi:10.1016/j.surg.2006.10.010.Use.
- [5] N. Vargesson, Thalidomide-induced teratogenesis: History and mechanisms, *Birth Defects Res. Part C - Embryo Today Rev.* 105 (2015) 140–156. doi:10.1002/bdrc.21096.
- [6] F. Sales Luiz Vianna, M.Z. de Oliveira, M.T.V. Sanseverino, E.F. Morelo, D. de Lyra Rabello Neto, J. Lopez-Camelo, *et al.*, Pharmacoepidemiology and thalidomide embryopathy surveillance in Brazil, *Reprod. Toxicol.* 53 (2015) 63–67. doi:10.1016/j.reprotox.2015.03.007.
- [7] M. Chen, S.D. Doherty, S. Hsu, Innovative uses of thalidomide., *Dermatol. Clin.* 28 (2010) 577–86. doi:10.1016/j.det.2010.03.003.
- [8] Y. Hashimoto, Thalidomide as a multi-template for development of biologically active compounds., *Arch. Pharm. (Weinheim).* 341 (2008) 536–47. doi:10.1002/ardp.200700217.
- [9] M.F. Chong, A. Chan, Thalidomide for Delayed Chemotherapy-Induced Nausea and Vomiting: Where Is Its Place in Therapy?, *J. Clin. Oncol.* (2018) JCO2017764316. doi:10.1200/JCO.2017.76.4316.
- [10] C.M. de Souza, T. da S. Vieira, A.C.A.E. Silva, M.T.P. Lopes, M.A.N.D. Ferreira, S.P. Andrade, *et al.*, Thalidomide attenuates mammary cancer associated-inflammation, angiogenesis and tumor growth in mice., *Biomed. Pharmacother.* 66 (2012) 491–8. doi:10.1016/j.biopha.2012.04.005.

- [11] C. Yang, P. Singh, H. Singh, M.L. Le, W. El-Matary, Systematic review: Thalidomide and thalidomide analogues for treatment of inflammatory bowel disease, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 41 (2015) 1079–1093. doi:10.1111/apt.13181.
- [12] A. Page, M. Navarro, C. Suárez-Cabrera, A. Bravo, A. Ramirez, Context-Dependent Role of IKK β in Cancer, *Genes (Basel)*. 8 (2017) 376. doi:10.3390/genes8120376.
- [13] J.A. Keifer, D.C. Guttridge, B.P. Ashburner, A.S. Baldwin, Inhibition of NF- κ B Activity by Thalidomide through Suppression of I κ B Kinase Activity, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 22382–22387. doi:10.1074/jbc.M100938200.
- [14] M.A. Al-Sha'er, I.S. Almazari, M.O. Taha, Discovery of novel potent nuclear factor kappa-B inhibitors (IKK- β) via extensive ligand-based modeling and virtual screening, *J. Mol. Recognit.* 30 (2017) 1–16. doi:10.1002/jmr.2604.
- [15] L.C.D. Coêlho, M.V. de O. Cardoso, D.R.M. Moreira, P.A.T. de M. Gomes, S.M.T. Cavalcanti, A.R. Oliveira, *et al.*, Novel phthalimide derivatives with TNF- α and IL-1 β expression inhibitory and apoptotic inducing properties, *Medchemcomm.* 5 (2014) 758. doi:10.1039/c4md00070f.
- [16] R. Talaat, W. El-Sayed, H. Agwa, A. Gamal-Eldeen, S. Moawia, M. Zahran, Novel thalidomide analogs: Anti-angiogenic and apoptotic effects on Hep-G2 and MCF-7 cancer cell lines, *Biomed. Aging Pathol.* 4 (2014) 179–189. doi:10.1016/j.biomag.2014.03.002.
- [17] P.-K. Li, B. Pandit, D.L. Sackett, Z. Hu, J. Zink, J. Zhi, *et al.*, A thalidomide analogue with in vitro antiproliferative, antimitotic, and microtubule-stabilizing activities., *Mol. Cancer Ther.* 5 (2006) 450–6. doi:10.1158/1535-7163.MCT-05-0254.
- [18] P.A.T. De Moraes Gomes, A.R. Oliveira, M.V. De Oliveira Cardoso, E. De Farias Santiago, M. De Oliveira Barbosa, L.R.P. De Siqueira, *et al.*, Phthalimido-thiazoles as building blocks and their effects on the growth and morphology of *Trypanosoma cruzi*, *Eur. J. Med. Chem.* 111 (2016) 46–57. doi:10.1016/j.ejmech.2016.01.010.
- [19] E.D.F. Santiago, A. De Oliveira, B. De Oliveira, R. Magalhaes, Evaluation of the Anti- *Schistosoma mansoni* Activity of Thiosemicarbazones and Thiazoles, 58 (2014) 352–363. doi:10.1128/AAC.01900-13.
- [20] G.B. Rocha, R.O. Freire, A.M. Simas, J.J.P. Stewart, RM1: A reparameterization of AM1 for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I, *J. Comput. Chem.* 27 (2006) 1101–1111. doi:10.1002/jcc.20425.

- [21] S. Liu, Y.R. Misquitta, A. Olland, M.A. Johnson, K.S. Kelleher, R. Kriz, *et al.*, Crystal structure of a human I κ B Kinase β asymmetric dimer, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 22758–22767. doi:10.1074/jbc.M113.482596.
- [22] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3 Schrödinger, LLC., (n.d.), (n.d.).
- [23] A. Israel, The IKK Complex, a Central Regulator of NF-kappaB Activation, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2 (2010) a000158. doi:10.1101/cshperspect.a000158.
- [24] B. Pires, R. Silva, G. Ferreira, E. Abdelhay, NF-kappaB: Two Sides of the Same Coin, *Genes (Basel)*. 9 (2018) 24. doi:10.3390/genes9010024.
- [25] K. Veerappan, S. Natarajan, P. Ethiraj, U. Vetrivel, S. Samuel, Inhibition of IKK β by celastrol and its analogues - An in silico and in vitro approach, *Pharm. Biol.* 55 (2017) 368–373. doi:10.1080/13880209.2016.1241809.
- [26] K.R. Patil, P. Mohapatra, H.M. Patel, S.N. Goyal, S. Ojha, C.N. Kundu, *et al.*, Pentacyclic triterpenoids inhibit ikk β mediated activation of nf-kb pathway: In silico and in vitro evidences, *PLoS One*. 10 (2015) 1–30. doi:10.1371/journal.pone.0125709.
- [27] Y. Hu, A feedforward loop of NLRC5 (de)ubiquitination keeps IKK-NF- κ B in check, *J. Cell Biol.* 211 (2015) 941–943. doi:10.1083/jcb.201511039.
- [28] J.-J. Huang, X.-W. Wu, J.-M. Jia, X.-K. Guo, X. Xue, Z.-Y. Jiang, *et al.*, Novel IKK β inhibitors discovery based on the co-crystal structure by using binding-conformation-based and ligand-based method., *Eur. J. Med. Chem.* 63 (2013) 269–78. doi:10.1016/j.ejmech.2013.01.045.
- [29] S.C. Gupta, B. Sung, S. Prasad, L.J. Webb, B.B. Aggarwal, Cancer drug discovery by repurposing: Teaching new tricks to old dogs, *Trends Pharmacol. Sci.* 34 (2013) 508–517. doi:10.1016/j.tips.2013.06.005.
- [30] A. Mercurio, G. Adriani, A. Catalano, A. Carocci, L. Rao, G. Lentini, *et al.*, A Mini-Review on Thalidomide: Chemistry, Mechanisms of Action, Therapeutic Potential and Anti-Angiogenic Properties in Multiple Myeloma, *Curr. Med. Chem.* 24 (2017) 2736–2744. doi:10.2174/0929867324666170601074646.
- [31] Y. Liu, X. Huang, X. He, Y. Zhou, X. Jiang, S. Chen-Kiang, *et al.*, A novel effect of thalidomide and its analogs: Suppression of cereblon ubiquitination enhances ubiquitin ligase function, *FASEB J.* 29 (2015) 4829–4839. doi:10.1096/fj.15-274050.

- [32] T. Mori, T. Ito, S. Liu, H. Ando, S. Sakamoto, Y. Yamaguchi, *et al.*, Structural basis of thalidomide enantiomer binding to cereblon, *Sci. Rep.* 8 (2018) 1294. doi:10.1038/s41598-018-19202-7.
- [33] N. Kushwaha, D. Kaushik, Recent Advances and Future Prospects of Phthalimide Derivatives, *J. Appl. Pharm. Sci.* (2016) 159–171. doi:10.7324/JAPS.2016.60330.
- [34] J.J. Casal, M. Bollini, M.E. Lombardo, A.M. Bruno, Thalidomide analogues: Tumor necrosis factor- α inhibitors and their evaluation as anti-inflammatory agents, *Eur. J. Pharm. Sci.* 83 (2016) 114–119. doi:10.1016/j.ejps.2015.12.017.
- [35] L. Mazzocchi, S.H. Cadoso, G.W. Amarante, M.V.N. de Souza, R. Domingues, M. a Machado, *et al.*, Novel thalidomide analogues from diamines inhibit pro-inflammatory cytokine production and CD80 expression while enhancing IL-10., *Biomed. Pharmacother.* 66 (2012) 323–9. doi:10.1016/j.biopha.2012.05.001.
- [36] J. Shortt, a K. Hsu, R.W. Johnstone, Thalidomide-analogue biology: immunological, molecular and epigenetic targets in cancer therapy., *Oncogene.* 32 (2013) 4191–202. doi:10.1038/onc.2012.599.
- [37] M. Fakhoury, M. Coussa-Charley, H. Al-Salami, I. Kahouli, S. Prakash, Use of artificial cell microcapsule containing thalidomide for treating TNBS-induced Crohn's disease in mice, *Curr. Drug Deliv.* 11 (2014) 146–153. doi:10.2174/156720181101140212170025.
- [38] P.M.P. Ferreira, P.M. Da Costa, A. De Menezes Costa, D.J.B. Lima, R.R. Drumond, J.D.N. Silva, *et al.*, Cytotoxic and toxicological effects of phthalimide derivatives on tumor and normal murine cells, *An. Acad. Bras. Cienc.* 87 (2015) 313–330. doi:10.1590/0001-3765201520130345.
- [39] A.M. Godin, D.P. Araújo, R.R. Menezes, A.M.S. de Brito, I.S.F. Melo, G.M.E. Coura, *et al.*, 2-Phthalimidethanol and 2-phthalimidethyl nitrate inhibit mechanical allodynia, neutrophil recruitment and cytokine and chemokine production in a murine model of articular inflammation, *Pharmacol. Reports.* 69 (2017) 691–695. doi:10.1016/j.pharep.2017.01.033.
- [40] M.F. Neurath, Cytokines in inflammatory bowel disease, *Nat. Rev. Immunol.* 14 (2014) 329–342. doi:10.1038/nri3661.
- [41] B. Li, R. Alli, P. Vogel, T.L. Geiger, IL-10 modulates DSS-induced colitis through a macrophage-ROS-NO axis, *Mucosal Immunol.* 7 (2014) 869–878. doi:10.1038/mi.2013.103.

- [42] B. Seruga, H. Zhang, L.J. Bernstein, I.F. Tannock, Cytokines and their relationship to the symptoms and outcome of cancer., *Nat. Rev. Cancer*. 8 (2008) 887–99. doi:10.1038/nrc2507.
- [43] F.A.R. Silva, B.L. Rodrigues, M.D.L.S. Ayrizono, R.F. Leal, The Immunological Basis of Inflammatory Bowel Disease, *Gastroenterol. Res. Pract.* 2016 (2016). doi:10.1155/2016/2097274.
- [44] S. Tian, J. Wang, Y. Li, D. Li, L. Xu, T. Hou, The application of in silico drug-likeness predictions in pharmaceutical research, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 86 (2015) 2–10. doi:10.1016/j.addr.2015.01.009.
- [45] H.J. Kim, N. Hawke, A.S. Baldwin, NF- κ B and IKK as therapeutic targets in cancer, *Cell Death Differ.* 13 (2006) 738–747. doi:10.1038/sj.cdd.4401877.
- [46] F.R. Greten, L. Eckmann, T.F. Greten, J.M. Park, Z.W. Li, L.J. Egan, *et al.*, IKK β links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer, *Cell*. 118 (2004) 285–296. doi:10.1016/j.cell.2004.07.013.

APÊNDICE B – MANUSCRITO PUBLICADO

Biomedicine & Pharmacotherapy 82 (2016) 555–560



Available online at
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com/en



Antitumor and immunomodulatory activities of thiosemicarbazones and 1,3-Thiazoles in Jurkat and HT-29 cells



Thiago André R. dos Santos^a, Aline Caroline da Silva^a, Elany Barbosa Silva^b,
 Paulo André Teixeira de Moraes Gomes^b, José Wanderlan Pontes Espíndola^b,
 Marcos Veríssimo de Oliveira Cardoso^b, Diogo Rodrigo Magalhaes Moreira^c,
 Ana Cristina Lima Leite^{b,*}, Valéria R.A. Pereira^{a,*}

^a Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Laboratório de Imunogenética, CEP 50670-420, Recife, PE, Brazil

^b Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Farmacêuticas, CEP 50740-520, Recife, PE, Brazil

^c Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, CEP 40296-710, Salvador, BA, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 December 2015

Received in revised form 20 May 2016

Accepted 23 May 2016

Keywords:

Drug development

Cancer

Immune system

1,3-thiazoles

Thiosemicarbazones

Cell death

ABSTRACT

Cancer remains a high incidence and mortality disease, causing around 8.2 million of deaths in the last year. Current chemotherapy needs to be expanded, making research for new drugs a necessary task. Immune system modulation is an emerging concept in cancer cell proliferation control. In fact, there are a number of mechanisms underlying the role immune system plays in tumor cells. In this work, we describe the structural design, synthesis, antitumor and immunomodulatory potential of 31 new 1,3-thiazole and thiosemicarbazone compounds. Cisplatin was used as anticancer drug control. Cytotoxicity against J774A.1 macrophages and antitumor activity against HT-29 and Jurkat cells was determined. These 1,3-thiazole and thiosemicarbazone compounds not only exhibited cytotoxicity in cancer cells, but were able to cause irreversible cancer cell damage by inducing necrosis and apoptosis. In addition, these compounds, especially pyridyl-thiazoles compounds, regulated immune factors such as interleukin 10 and tumor necrosis factor, possibly by directing immune system in favor of modulating cancer cell proliferation. By examining their pharmacological activity, we were able to identify new potent and selective anticancer compounds.

© 2016 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Immune system modulation is an emerging concept in cancer cell proliferation control. In fact, there are a number of mechanisms underlying the role immune system plays in tumor cells. The most well-known processes involve minimizing metastasis by attenuating pro-angiogenic cytokines expression, or alternatively by upregulating expression of endothelial factors that are crucial for angiogenic process in metastasis. In addition, enhancing antitumor immunity mediated by interferon- γ and interleukins can reduce cancer cell development. In view of this, discovery of anticancer and immunomodulating agents is a line of research that is receiving much attention [1–4].

Among anticancer and immunomodulatory drug candidates that have entered into clinical trials, the majority are synthetic compounds, especially heterocyclic derivatives. Examples are Thalidomide, Imatinib and Sunitinib. Following this direction, phthalimide has commonly been employed in design of potential anti-inflammatory, immunomodulatory, antiangiogenic, and anti-tumor drugs. Given this promising outlook, the strategy of molecular hybridization, using phthalimide as a pharmacophoric fragment has figured prominently in recent research and given rise to many successful outcomes. Our research group has discovered potent and selective anticancer and anti-inflammatory compounds by hybridizing two distinct structural domains: phthalimide and another heterocyclic ring. This has led to the identification of various SARs and the discovery of a new potent hybrid compound containing thiosemicarbazone and 1,3-thiazole moieties, which were observed as having selective toxicity against tumor cells [1,5,6].

Bearing in mind the molecular biophores outlined above and the remarkable pharmacological properties observed in 1,3-

* Corresponding authors.

E-mail addresses: thiago.andre.ufpe@gmail.com (T.A.R. dos Santos),
acilb2003@yahoo.com.br (A.C. da Silva), valeria@cpqam.fiocruz.br (V.R.A. Pereira).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.05.038>

0753-3322/© 2016 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

thiazole and thiosemicarbazone compounds, we here describe the design, synthesis and pharmacological evaluation of 31 new potential antitumor and immunomodulatory agents. These 1,3-thiazole and thiosemicarbazones not only exhibited cytotoxicity in cancer cells, but were able to cause irreversible cancer cell damage by inducing necrosis and apoptosis. In addition, especially pyridyl-thiazoles compounds, regulated immune factor such as interleukin 10 and tumor necrosis factor, possible by halting the immune system in favor of modulating cancer cell proliferation.

2. Material and methods

2.1. Compounds

Compounds were obtained from LpQM (Laboratory of planning in Medicinal Chemistry). In general, compounds were developed in two reaction steps: a condensation between ketones and different thiosemicarbazides; and a cyclization of the thiosemicarbazones obtained in the preceding step with different α -halogen-acetophenones [7]. The pyridyl-thiosemicarbazones **3a–c**, aryl-thiosemicarbazone (**6**) and phthalyl-thiosemicarbazones (**9a, 9b**) were prepared from the reaction between thiosemicarbazides (**1a–c**) and pyridyl-ketone (**2**), the aryl-ketone (**5**) and phthalyl ketone (**8**), respectively (Fig. 1). The thiosemicarbazones obtained were

treated with different α -halogen-acetophenones to obtain derivatives of 1,3-thiazoles (**4a–j**, **7a–j**) and (**10a–j**). All compounds were chemically characterized and presented purity of >95% [8].

2.2. Cell culture

Colorectal cancer cell line HT-29 and J774A.1 macrophage cell line was cultured in DMEM medium (Cultilab) containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 100U/mL penicillin G, and 2mMl-glutamine in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air at 37 °C. Jurkat cells (human acute T lymphocytic leukemia) cultured in RPMI 1640 medium (Sigma) containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 100U/mL penicillin G, and 2mMl-glutamine in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air at 37 °C. Both cell lines used in this work were obtained from cell bank of Rio de Janeiro (BCRJ). Culture medium was changed 2–3 days and subcultured when cell population density reached to 70–80% confluence.

2.3. Cytotoxicity assessment by MTT assay

MTT-tetrazolium reduction assay was used to evaluate effects of compounds against HT-29, Jurkat and J774A.1 cells [9]. Briefly, 1×10^5 cells/well were added in 96-well plates with appropriated medium and incubated for 24 h (37 °C and 5% CO₂). Compounds

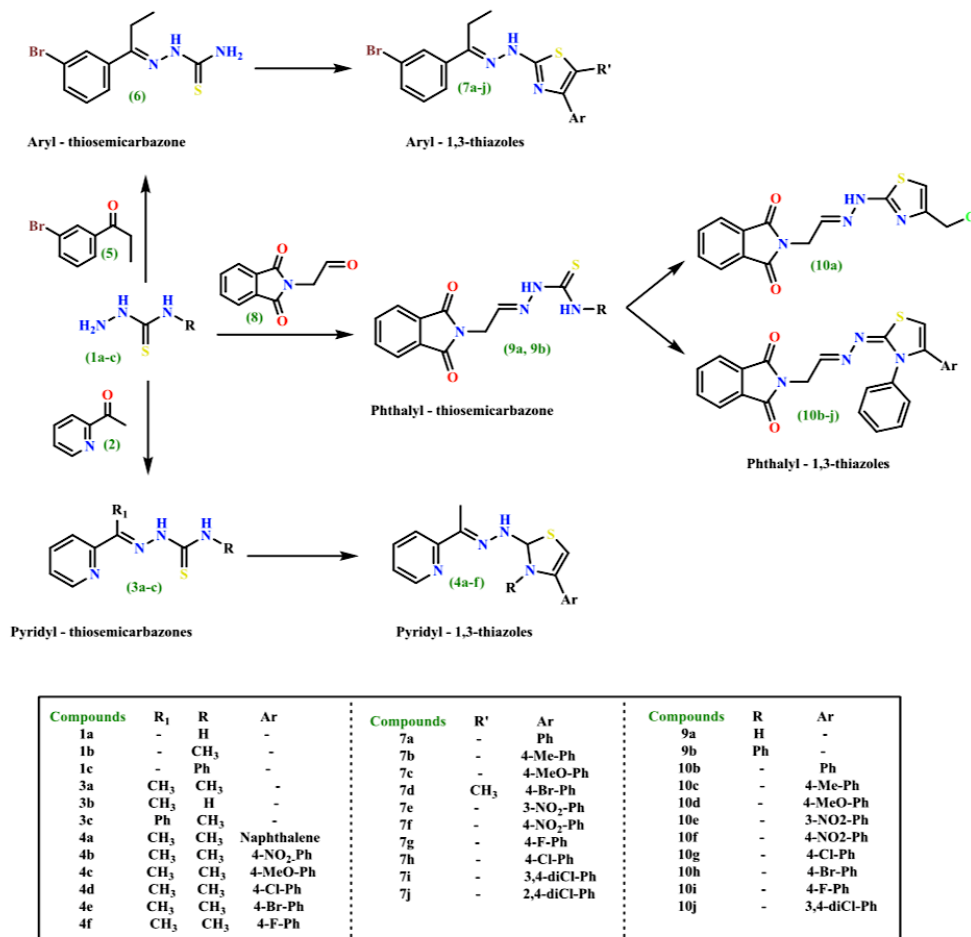


Fig. 1. General synthetic procedure.

were then added in different concentrations (1 to 100 $\mu\text{g/mL}$) and incubated for 72 h. Cisplatin was used as a reference drug. Two hours before the end of the incubation time, 25 μL MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide, 5 mg/mL in PBS) was added to each well. Culture medium was removed and 100 μL of DMSO were added. The amount of formazan was determined by measuring the absorbance at 570 nm [9]. Concentration leading to 50% inhibition of viability (CC_{50}) was calculated by regression analysis.

2.4. Flow cytometry assay

HT-29 and Jurkat cells (1×10^6 cells/mL) were treated (72 h, 37 °C, 5% CO_2) with compounds in its respective CC_{50} , obtained in previous experiments. Briefly, tumor cells were harvested, washed with PBS, re-suspended in Annexin V binding buffer (eBioscience, San Diego, CA, USA) and stained with propidium iodide (PI) and annexin V-FITC (eBioscience, San Diego, CA, USA) according to manufacturer instructions. The cells were immediately analyzed by flow cytometry (FACSCalibur™, BD BioSciences, San Jose, CA, USA) [10]. Results were analyzed by BD FlowJo 7.6 software.

2.5. Immunomodulatory activity

J774A.1 macrophages were stimulated with compounds for 24, 48 and 72 h in its respective CC_{50} values and culture supernatants were used to measurement of cytokine production [9]. Lipopolysaccharide (LPS at 50 ng mL^{-1}) was used as positive control, while cells without either LPS or compounds were used as negative control. Concentration of TNF and IL-10 was measured using sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), according to the manufacturer's suggested protocols (BD OptEIA™, San Jose, CA, USA). Absorbance was read at 415 nm using a spectrophotometer (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Scientific, San Jose, CA, USA).

2.6. Statistical analysis

All experiments were done in triplicate. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test ($P < 0.05$). GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, California, EUA) was used for all analysis.

3. Results

3.1. Antitumor activity on Jurkat and HT-29 cell lines

Using MTT assay we observed that compounds demonstrated antitumor activity in both Jurkat and HT-29 cells. Compounds tested showed a dose-dependent effect (data not shown). All pyridyl-thiosemicarbazones and pyridyl-thiazoles series showed low CC_{50} value in HT-29 and Jurkat cells when compared with cisplatin – 179 and 89.5 μM , respectively (Table 1). The lower CC_{50} value in HT-29 and Jurkat cells was observed with compound **3b** (17.18 μM) and compound **7e** (2.79 μM) respectively.

3.2. Cell death induction

Once observed that compounds had an antitumor effect, and after determination of CC_{50} value for each compound, we incubated HT-29 and Jurkat cells with these compounds in its respective CC_{50} values for 72 h aiming to evaluate the kind of cell death induced. Cells were stained with annexin V-FITC (AN) and propidium iodide (PI) and analyzed by flow cytometry.

Untreated HT-29 cells presented a lower staining with either AN or PI, demonstrating cell viability. Saponin, used as cell death

Table 1
Compounds utilized in this study and their cytotoxicity in J774A.1 Macrophages, HT-29 and Jurkat cell lines.

Compound	J774A.1 CC_{50} (μM)	HT-29 CC_{50} (μM)	Jurkat CC_{50} (μM)
3a	21.77	83.09	14.91
3b	182.57	17.18	32.80
3c	21.36	29.46	ND
4a	30.35	57.83	16.23
4b	36.05	65.62	21.30
4c	19.99	108.25	19.59
4d	20.32	78.87	28.18
4e	33.60	51.29	21.54
4f	11.65	25.22	ND
6	51.05	153.67	67.82
7a	75.90	57.49	74.37
7b	113.60	24.13	116.63
7c	114.96	61.97	113.83
7d	21.95	58.34	110.66
7e	40.13	21.02	2.79
7f	67.47	ND	125.69
7g	6.50	79.62	117.88
7h	ND	126.75	406.65
7i	124.76	127.59	271.53
7j	75.37	18.29	25.13
9b	28.66	13.44	88.81
10a	69.33	172.53	17.48
10b	37.01	21.05	83.60
10c	41.03	17.84	23.42
10d	40.51	22.09	114.49
10e	47.38	21.28	21.22
10f	26.47	273.22	21.53
10g	30.07	114.45	11.54
10h	21.20	95.77	ND
10i	26.57	129.71	8.54
10j	ND	0.00	23.99
Cisplatin	58.98	179.07	89.47

Note: ND: Not Determined.

positive control, caused a high staining (>90%) with PI, indicating cell death by necrosis, as expected. Pyridyl-thiazoles compounds caused higher labeling with AN, under the experimental conditions applied, indicating cell death predominantly by apoptosis. An increase of double staining (AN-PI) was detected after incubation with Phthalyl-thiazoles and Pyridyl-thiazoles, indicating the occurrence of cell death by necrosis or late apoptosis (Fig. 2).

Jurkat untreated cells showed low staining with either AN or PI. The cell treatment with the commercial drug cisplatin caused a double staining (AN-PI) increase. Jurkat cells presented a high double staining with high percentage of PI labeling, for pyridyl-thiazoles. Compound **10c** led to an increasing of AN staining, twice higher than untreated control. **10a** and **3b** compounds induced a high increasing of double staining in Jurkat cells. Results are shown in Fig. 3.

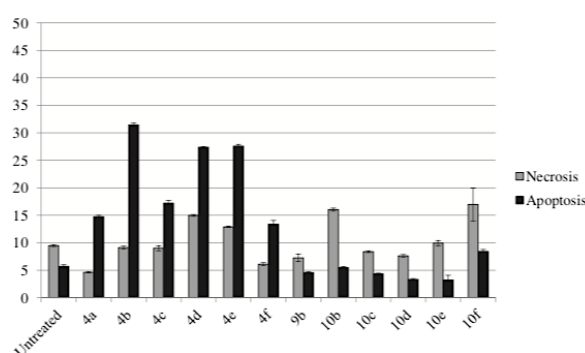


Fig. 2. Percentage of HT-29 cells labeled for necrosis and apoptosis, after 72 h of incubation with the compounds.

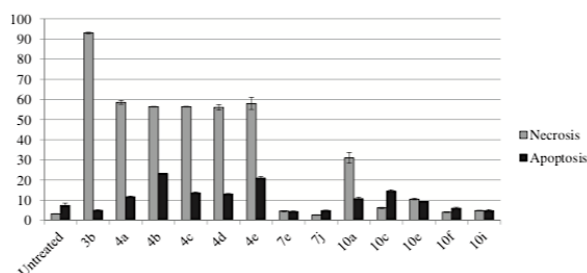


Fig. 3. Percentage of Jurkat cells stained for necrosis and apoptosis, after 72 h of incubation with the compounds.

3.3. Cytotoxicity effect and immunomodulatory activity on macrophages

Cytotoxicity in J774A.1 cells was done by MTT assay and CC_{50} results were used for stimulation of cultures. CC_{50} results varied between 6.5 and 182.57 μ M, for **7g** and **3b**, respectively. Cisplatin showed a CC_{50} of 58.98 μ M. All CC_{50} results are shown in Table 1.

Immunomodulatory activity was evaluated by production of cytokines IL-10 and TNF. This quantification was assessed by ELISA assay. For this purpose, J774A.1 macrophages supernatants of culture were collected after incubation with compounds for 24, 48 and 72 h. Results are showed below.

TNF production was observed for all compounds tested after 48 h of incubation, however, significant values were observed only for **6**, **7a**, **7f**, **7h**, **7i**, **7j**, all pyridyl-thiosemicarbazones, pyridyl-thiazoles and phthalyl-thiazoles (except **10f**). Similar results were observed after 72 h of incubation. Results are shown in Figs. 4 and 5.

After 24 h of incubation with compounds **4c** and **4d** was observed a significant ($p < 0.0001$) decrease in IL-10 production, when compared to untreated group. Inhibition of production of this cytokine was sustained with **4c** after 48 h of incubation. On the other hand, **7d**, **7f**, **7g**, **10g**, **10h**, **10j** increased this cytokine production after 48 h (Figs. 6 and 7). It was not detected production of IL-10 after 72 h of treatment.

4. Discussion

Despite great efforts made by public and private organizations cancer's characteristics, as severity and often lethality, has persisted over the years [11]. Development of new cancer treatments remains a challenging process, diverse therapy strategies have been developed and tried, and medicinal chemistry is one of this approaches [12]. In this context, several compounds has been noted for its activity in various diseases, including cancer [13].

These compounds include thiosemicarbazones, thiazoles and phthalimides, molecules tested in this study. The choice of these compounds for development of pre-clinical trials are based on the broad spectrum of biological activities related to them, as well as the effects on components of immune system such as cytokines [14,15].

In this work, four classes of compounds were screened for its antitumor activities, and its actions on immune cells. Cisplatin, used as a control, is one of the most remarkable success in the treatment of cancer [16]. It is expected that a potential anticancer drug to stimulate protective immunity against the tumor and in favor of the host [17].

A screening was performed with J774A.1 macrophages, through MTT assay. In this assay, only metabolically viable cells can reduce MTT by mitochondrial dehydrogenases leading to formation of formazan crystals. These experiments aimed to assess cytotoxicity of compounds in this important cell of immune system, present in microenvironment of practically all solid tumors [18]. It is known that macrophages may play both pro and anti-tumor role, due to its polarization capability and high plasticity [19–21]. Faced with this problem, it constitutes an important approach to evaluate whether tested compounds contribute to cytotoxicity of macrophages.

Cytotoxic effect of compounds when treating tumor cells was superior to the observed after treatment with cisplatin. These results showed that these compounds have a potential as a therapeutic tool, despite the cytotoxicity observed in macrophages. The present data showed that there is a structure-relationship for synthetic compounds tested. The biological activities of compounds are apparently related to the types of modifications on scaffold molecules. Therefore, other experiments were performed, aiming to elucidate this potential in this tumor cell lines.

Antitumor treatment can cause different cell death to neoplastic cells, depending on the lethal stimuli generated [22]. Apoptosis is a strongly regulated process that can be initiated by both intracellular stress signals and extracellular ligands [23]. Apoptosis is morphologically characterized by cell shrink, pyknosis and eventually fragmentation of apoptotic bodies [24]. Inactivation of apoptosis is a central event in cancer development, and its activation, by treatment approaches, can present benefits in patient prognostic [25]. In contrast, necrosis has been considered as an uncontrolled cell death pathway, characterized by cytoplasmic vacuolization, loss of plasma membrane integrity and cell swelling [23].

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

All compounds tested increase significantly the labeling for apoptosis and necrosis. In fact, the triggering of these two types of cell death can have beneficial effects on clinical [23], and these results support the need for further studies *in vitro* and *in vivo* in

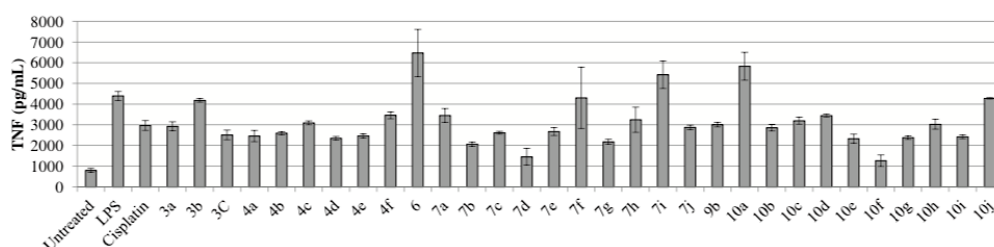


Fig. 4. TNF production in supernatants of macrophage culture in presence of all compounds tested at its respective CC_{50} values, after 48 h of incubation. Horizontal bars represent standard deviation.

Note: Increase was significant for **3a**, **3b**, **3c**, **4a**, **4b**, **4c**, **4d**, **4e**, **4f**, **6**, **7a**, **7f**, **7h**, **7i**, **7j**, **10a**, LPS and Cisplatin. $P < 0.0001$.

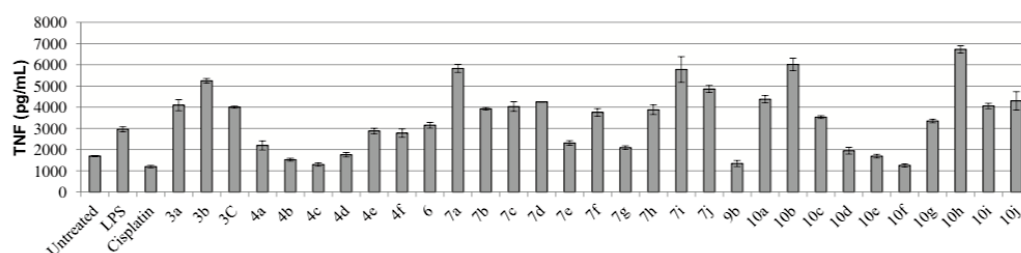


Fig. 5. TNF production in supernatants of macrophage culture after 72 h of incubation. Horizontal bars represent standard derivation.

Note: Increase was significant for **3a, 3b, 3c, 4a, 4e, 4f, 6, 7a, 7b, 7c, 7d, 7e, 7f, 7g, 7h, 7i, 7j, 10a, 10b, 10c, 10 g, 10h, 10i, 10j** and LPS. $P < 0.0001$.

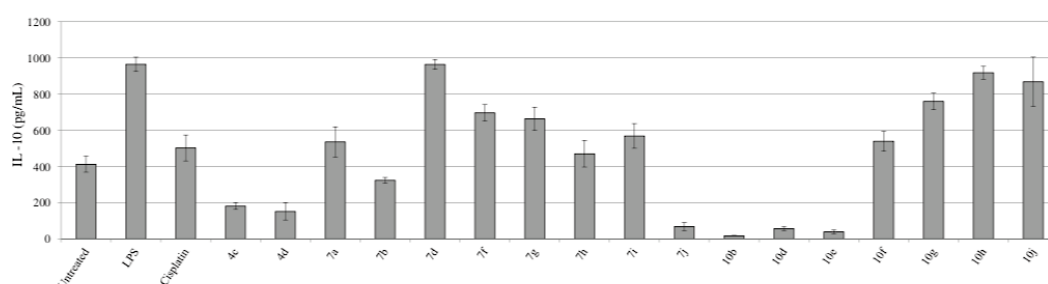


Fig. 6. IL-10 production in supernatants of macrophage culture after 24 h of incubation. Horizontal bars represent standard derivation.

Note: Increase was significant for **7d, 7f, 7g, 10g, 10h, 10j**, LPS and Cisplatin. $P < 0.0001$. Decrease was significant for **4c, 4d, 7j, 10b, 10d** and **10e**. $P < 0.0001$.

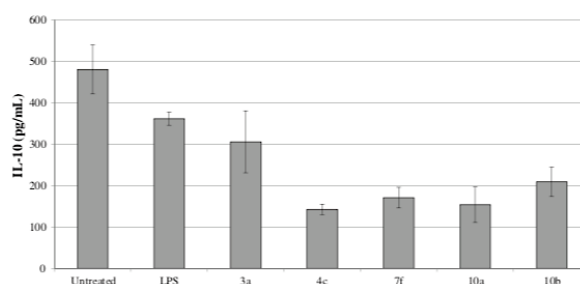


Fig. 7. IL-10 production in supernatants of macrophage culture after 48 h of incubation. Horizontal bars represent standard derivation.

Note: Decrease was significant for **3a, 4c, 7f, 10a, 10b**. $P < 0.0001$.

order to identify the mechanism of action of this series compounds.

The presence of cytokines are an important component in tumor microenvironment and often more important than the cellular content. The type and amount of cytokines produced in this microenvironment may be critical in tumor development and progression [3].

Cytokine production after incubation with compounds was evaluated with J774A.1 macrophages. IL-10 and TNF production were assessed after 24, 48 and 72 h of incubation.

Among untreated group, production of IL-10 was observed after 24 and 48 h. Its known that under stationary state tissue macrophages presents intrinsic anti-inflammatory functions [26].

IL-10 exerts its function through inhibitory activity on macrophages and dendritic cells. IL-10 inhibits IL-12 production by activated macrophages in addition to down regulate MHC-II expression by these cells [27]. IL-10 reduction might be considered a desirable phenomenon, mainly if it happens in tumor

microenvironment, since that several pro tumor effects have been associated with this cytokine [28,29].

Historically, TNF was the first cytokine used in cancer treatment [30]. Apart of cancer context, TNF was identified as a main regulator of inflammation and a key in cytokine network [31]. In cancer context, this cytokine can present a dichotomous action and can actuate as a pro or antitumor agent, in diverse contexts. For instance, this pro-inflammatory cytokine is an important factor involved in initiation, proliferation, angiogenesis and metastasis of diverse cancer types [32]. Several malign cells constitutively produce small quantities of TNF [31]. Those observations, and TNF roles in cancer development and progression might shade anticancer potential of this cytokine [30]. Defining TNF role in cancer therapy remains a challenging process due to its pleiotropic nature that might stimulate multiple complex and interconnected pathways, often involved in opposite phenomena [30].

Results obtained reveal that some compounds have good activity as immunomodulators on J774A.1 macrophage. Understanding mechanisms by which a favorable immune context can be

developed and maintained is essential for guiding innovative therapies [33]. New approaches on cancer treatment should consider, and take advantage of mechanisms that interfere in macrophages in several levels, as in attraction, differentiation and activation of this cells [19].

Thus, several series of compounds tested in this work deserve to be further investigated, since it was observed for several of them, low cytotoxic effect on macrophages, cytotoxic action against tumor cells, as well as necrosis/apoptosis induction and stimulation of important cytokines production. Results show that these compounds could represent promising prototype for development of new pharmacological agents. As perspectives, further elucidation of its mode of action and its effects *in vivo* models is needed.

5. Conclusions

Anticancer drug development is substantially necessary. By examining pharmacological activity of a set of thiosemicarbazone and 1,3-thiazole, we were able to identify new potent and selective anticancer compounds, such as 4a, 7c, 10e and 3b as most potent anticancer and immunomodulatory agent of each series. These compounds show low cytotoxicity against macrophages and modulated cytokines production. Therefore, these 1,3-thiazole and thiosemicarbazone compounds not only exhibited cytotoxicity in cancer cells, but were able to cause irreversible cancer cell damage by inducing necrosis and apoptosis. It would be worthwhile to conduct further optimization studies with a view to improving the antitumor properties of this 1,3-thiazole and thiosemicarbazone prototypes.

Acknowledgements

We would like to thank the Brazilian National Research Council (CNPq), Research Foundation of Pernambuco State (FACEPE) and FIOCRUZ for the financial support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.05.038>.

References

- [1] A.C.L. Leite, F.F. Barbosa, M.V. de, O. Cardoso, D.R.M. Moreira, L.C.D. Coelho, E.B. da Silva, et al., Phthaloyl amino acids as anti-inflammatory and immunomodulatory prototypes, *Med. Chem. Res.* 23 (2014) 1701–1708, doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00044-013-0730-1>.
- [2] M.A. Swartz, N. Iida, E.W. Roberts, S. Sangaletti, M.H. Wong, F.E. Yull, et al., Tumor microenvironment complexity: emerging roles in cancer therapy, *Cancer Res.* 72 (2012) 2473–2480, doi: <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0122>.
- [3] S.I. Grivennikov, F.R. Greten, M. Karin, Immunity, inflammation, and cancer, *Cell* 140 (2010) 883–899, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>.
- [4] W.J. Lesterhuis, J.B.A.G. Haanen, C.J.A. Punt, Cancer immunotherapy – revisited, *Nat. Rev. Drug Discov.* 10 (2011) 591–600, doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd3500>.
- [5] L.C.D. Coelho, M.V. de, O. Cardoso, D.R.M. Moreira, P.A.T. de, M. Gomes, S.M.T. Cavalcanti, A.R. Oliveira, et al., Novel phthalimide derivatives with TNF- α and IL-1 β expression inhibitory and apoptotic inducing properties, *Medchemcomm* 5 (2014) 758, doi: <http://dx.doi.org/10.1039/c4md00070f>.
- [6] C. Pessoa, P.M.P. Ferreira, L.V.C. Lotufo, M.O. de Moraes, S.M.T. Cavalcanti, L.C.D. Coelho, et al., Discovery of phthalimides as immunomodulatory and antitumor drug prototypes, *ChemMedChem* 5 (2010) 523–528, doi: <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.200900525>.
- [7] M.V. de O. Cardoso, L.R.P. de Siqueira, E.B. da Silva, L.B. Costa, M.Z. Hernandez, M.M. Rabello, et al., 2-Pyridyl thiazoles as novel anti-Trypanosoma cruzi agents: structural design, synthesis and pharmacological evaluation, *Eur. J. Med. Chem.* 86 (2014) 48–59, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.08.012>.
- [8] P.A.T. de M. Gomes, A.R. Oliveira, M.V. de O. Cardoso, E. de F. Santiago, M. deOBarbosa, L.R.P. deSiqueira, et al., Phthalimido-thiazoles as building blocks and their effects on the growth and morphology of Trypanosoma cruzi, *Eur. J. Med. Chem.* 111 (2016) 46–57, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.01.010>.
- [9] M.E.S.B. Barros, J.C.R. Freitas, J.M. Oliveira, C.H.B. Da Cruz, P.B.N. Da Silva, L.C.C. De Araújo, et al., Synthesis and evaluation of (–)-Massoialactone and analogues as potential anticancer and anti-inflammatory agents, *Eur. J. Med. Chem.* 76 (2014) 291–300, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.02.013>.
- [10] E. Augustin, A. Moś-Rompa, D. Nowak-Ziatyk, J. Konopa, Antitumor 1-nitroacridine derivative C-1748, induces apoptosis, necrosis or senescence in human colon carcinoma HCT8 and HT29 cells, *Biochem. Pharmacol.* 79 (2010) 1231–1241, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2009.12.012>.
- [11] A. Kamb, S. Wee, C. Lengauer, Why is cancer drug discovery so difficult? *Rev. Nat. Rev. Drug Discov.* 6 (2007) 115–120, doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd2155>.
- [12] C.J. Lord, A. Ashworth, Biology-driven cancer drug development: back to the future, *BMC Biol.* 8 (2010) 38, doi: <http://dx.doi.org/10.1186/1741-7007-8-38>.
- [13] S.J. Sturla, J.J. Irwin, R.N. Loeppky, M.J. Mulvihill, M. Searcey, Chemistry in cancer research: a vital partnership, *Cancer Res.* 67 (2007) 6539–6543, doi: <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1619>.
- [14] S.J. Kashyap, V.K. Garg, P.K. Sharma, N. Kumar, R. Dudhe, J.K. Gupta, Thiazoles: having diverse biological activities, *Med. Chem. Res.* 21 (2011) 2123–2132, doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00044-011-9685-2>.
- [15] S. Zheng, Q. Zhong, Q. Jiang, M. Mottamal, Q. Zhang, N. Zhu, et al., Discovery of a series of thiazole derivatives as novel inhibitors of metastatic cancer cell migration and invasion, *ACS Med. Chem. Lett.* 4 (2013) 191–196, doi: <http://dx.doi.org/10.1021/ml300322n>.
- [16] N. Pabla, Z. Dong, Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies, *Kidney Int.* 73 (2008) 994–1007, doi: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ki.5002786>.
- [17] M. Dougan, G. Dranoff, Immune therapy for cancer, *Annu. Rev. Immunol.* 27 (2009) 83–117, doi: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132544>.
- [18] G. Solinas, G. Germano, A. Mantovani, P. Allavena, Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation, *J. Leukoc. Biol.* 86 (2009) 1065–1073, doi: <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0609385>.
- [19] M. Heusinkveld, S.H. van der Burg, Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers, *J. Transl. Med.* 9 (2011) 216, doi: <http://dx.doi.org/10.1186/1479-5876-9-216>.
- [20] A. Mantovani, S. Sozzani, M. Locati, P. Allavena, A. Sica, Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes, *Trends Immunol.* 23 (2002) 549–555, doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4906\(02\)00202-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4906(02)00202-5).
- [21] F.O. Martinez, L. Helming, S. Gordon, Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective, *Annu. Rev. Immunol.* (2009), doi: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132532>.
- [22] O. Kepp, A. Tesniere, F. Schlemmer, M. Michaud, L. Senovilla, L. Zitvogel, et al., Immunogenic cell death modalities and their impact on cancer treatment, *Apoptosis* 14 (2009) 364–375, doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s10495-008-0303-9>.
- [23] E.C. de Bruin, J.P. Medema, Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response, *Cancer Treat. Rev.* 34 (2008) 737–749, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2008.07.001>.
- [24] R.K. Amaravadi, C.B. Thompson, The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment, *Clin. Cancer Res.* 13 (2007) 7271–7279, doi: <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1595>.
- [25] S. Kasibhatla, B. Tseng, Why target apoptosis in cancer treatment? *Mol. Cancer Ther.* 2 (2003) 573–580, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12813137>.
- [26] P.J. Murray, T.A. Wynn, Protective and pathogenic functions of macrophage subsets, *Nat. Rev. Immunol.* 11 (2011) 723–737, doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3073>.
- [27] S. Lee, K. Margolin, Cytokines in cancer immunotherapy, *Cancers (Basel)* 3 (2011) 3856–3893, doi: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers3043856>.
- [28] E. Itakura, R.-R. Huang, D.-R. Wen, E. Paul, P.H. Wünsch, A.J. Cochran, IL-10 expression by primary tumor cells correlates with melanoma progression from radial to vertical growth phase and development of metastatic competence, *Mod. Pathol.* 24 (2011) 801–809, doi: <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2011.5>.
- [29] L. Zeng, C. O'Connor, J. Zhang, A.M. Kaplan, D.A. Cohen, IL-10 promotes resistance to apoptosis and metastatic potential in lung tumor cell lines, *Cytokine* 49 (2010) 294–302, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2009.11.015>.
- [30] L. Bertazza, S. Mocellin, The dual role of tumor necrosis factor (TNF) in cancer biology, *Curr. Med. Chem.* 17 (2010) 3337–3352, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20712570>.
- [31] F. Balkwill, Tumour necrosis factor and cancer, *Nat. Rev. Cancer* 9 (2009) 361–371, doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2628>.
- [32] W. Lin, M. Karin, A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 1175–1183, doi: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI31537>.
- [33] W.H. Fridman, F. Pagès, C. Sautès-Fridman, J. Galon, The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome, *Nat. Rev. Cancer* 12 (2012) 298–306, doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3245>.

ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO CEUA



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificado de Aprovação

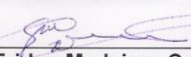
Certificamos que o Projeto intitulado: AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-PARASITÁRIA E IMUNOMODULADORA DE COMPOSTOS NATURAIS OU OBTIDOS POR SÍNTESE ORGÂNICA Protocolado sob o Nº 26/2011, coordenado pelo (a) pesquisador (a) **VALÉRIA REGO ALVES PEREIRA** está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz (CEUA-CPqAM) em reunião 09/02/2012. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até fevereiro de 2016

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie	Nº de Animais
CAMUNDONGO MUS MUSCULUS BALB/c 60 dias 20g	600
	TOTAL 600

We certify that the project entitled AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-PARASITÁRIA E IMUNOMODULADORA DE COMPOSTOS NATURAIS OU OBTIDOS POR SÍNTESE ORGÂNICA (CEUA Protocol Nº 26/2011), coordinated by **VALÉRIA REGO ALVES PEREIRA** is according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz on February 09, 2012. In the present version this project is licensed and valid until February, 2016

Recife (Pe, Brazil) april 16, 2012.

Eridan M. Coutinho M. D. Ph.D
Pesquisadora Emérita da FIOCRUZ
Coordenadora da CEUA/CPqAM
Recife - Brasil


Dr. Eridan Medeiros Coutinho

Vice - Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ