

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

FLAVIANA ALVES DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL, IMUNOMODULADORA E DA
TOXICIDADE AGUDA E SUBCRÔNICA DE NOVOS DERIVADOS
TIAZOLFTALIMÍDICOS**

**RECIFE
2020**

FLAVIANA ALVES DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL, IMUNOMODULADORA E DA
TOXICIDADE AGUDA E SUBCRÔNICA DE NOVOS DERIVADOS
TIAZOLFTALIMÍDICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Biologia Química para a Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco.

Orientador: Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta
Co-orientador: Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo.
Co-orientador: Dr. Marina Galdino da Rocha Pitta

**RECIFE
2020**

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Santos, Flaviana Alves dos

Avaliação da atividade antitumoral, imunomoduladora e da toxicidade aguda e subcrônica de novos derivados ftazolftalimídicos / Flaviana Alves dos Santos – 2020.

171 f.: il., fig., tab.

Orientador: Ivan da Rocha Pitta

Coorientadores: Moacyr Jesus Barreto de Melo Rego e Marina Galdino da Rocha Pitta

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2020. Inclui referências e anexos.

1. Câncer 2. Toxicidade- testes 3. Citocinas I. Pitta, Ivan da Rocha (orient.) II. Rego, Moacyr Jesus Barreto de Melo (coorient.) III. Pitta, Marina Galdino da Rocha (coorient.) IV. Título

616.994061

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2021-088

FLAVIANA ALVES DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL, IMUNOMODULADORA E DA
TOXICIDADE AGUDA E SUBCRÔNICA DE NOVOS DERIVADOS
TIAZOLFTALIMÍDICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Biologia Química para a Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco.

Aprovada em: 27/ 02/2020

COMISSÃO EXAMINADORA

Thiago Henrique Napoleão/UFPE

Ivan da Rocha Pitta

Mardonny Bruno de Oliveira Chagas /UFPE

MichellyCristiny Pereira /UFPE

Amanda Pinheiro de Barros Albuquerque /LINAT

Dedico a Deus e à minha Família.

AGRADECIMENTOS

À Deus, fonte de toda minha fé e força.

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

Ao meu namorado **Matheus Medeiros**, pela relação de cuidado, parceria e companheirismo.

À Profa. **Dra. Michelly Cristiny Pereira**, pelo apoio durante toda jornada no LINAT. Muito obrigada, de coração por todo carinho a mim dedicado. Muito obrigada por toda força e toda ajuda. Espero um dia poder retribuir todo esse carinho e dedicação.

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

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

Agradeço imensamente aos amigos do Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas, mas de que uma vida compartilhada, por me aguentarem. Agradeço especialmente aos que mais próximos – **Michael Leal, Maria Andreza, Priscila Stela, Lidianne, Maria Clara, Amanda Albuquerque, Eduardo Davi, Thiago Lins, Antonio Félix** e a tanto outros não citados mais muito amado e que foram imprescindíveis para tornar possível a realização deste trabalho.

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

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

Enfim, agradecer não é uma tarefa fácil e nem justa, por existirem inúmeras pessoas que durante este caminho me ajudaram direta ou indiretamente.

A todos o meu sincero agradecimento.

RESUMO

O câncer é uma das principais causas de morte em todo mundo, apesar dos avanços em relação aos tratamentos disponíveis eles possuem ainda baixa seletividade e muitos efeitos colaterais. A imunomodulação representa uma nova estratégia para o tratamento dos pacientes com câncer. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade anticâncer, imunomoduladora e a toxicidade aguda e subcrônica de derivados tiazolftalimídicos (FTs e AMs). Inicialmente avaliou-se o efeito citotóxico destes derivados em células normais (PBMCs) de voluntários. Também foram avaliados a capacidade de inibição de formações de clones, da inibição migração celular, da alteração do ciclo celular e da indução de morte. Posteriormente foi avaliado a citotoxicidade em diversas linhagens tumorais nas concentrações entre 1 e 100 μM . Além de avaliar a imunomodulação dos derivados tiazolftalimídicos (FTs) em esplenócitos de Balb/C estimulados com ConA. Para os derivados AM1b e AM1f também foi avaliado a toxicidade aguda e subcrônica, mas não a imunomoduladora. Frente as PBMCs os derivados tiazolftalimídicos não apresentaram citotoxicidade até 100 μM . Frente as células tumorais Panc-1, Sk-Mel-28 e PC-3 o derivado FT-12 apresentou CI_{50} entre $31,54\mu\text{M} \pm 1,33$ a $71,92\mu\text{M} \pm 1,31$. O derivado FT-9 apresentou atividade antineoplásica de $59,11\mu\text{M} \pm 4,48$ (K562) e $64,42\mu\text{M} \pm 6,36$ (Molt-4). O derivado FT-12 induziu a diminuição de formação de clones em PC-3 e Panc-1, inibiu a migração de Panc-1 além de induzir aumento da morte por necrose e clivagem de parp na linhagem Panc-1. Os derivados FT-3 e 4 inibiram as citocinas antiinflamatórias IL-4 e IL-10, já o derivado FT-6 estimulou a produção dessas citocinas. FT-3 e 8 inibiram a produção das citocinas pró inflamatórias IL-17A, $\text{INF-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 e IL-2. O derivado AM1b apresentou atividade antineoplásica frente as linhagens de câncer de próstata Du-145 ($17,19\mu\text{M} \pm 0,82$) e de câncer de pâncreas Panc-1 ($11,22\mu\text{M} \pm 2,75$). Já o derivado AM1f apresentou atividade frente a todas as linhagens avaliadas com CI_{50} entre 14 a 26 μM . Nas células de câncer de pâncreas e próstata o derivado AM1f reduziram a formação de clones, além de inibir a migração celular e induzir um arrasto na fase G0/G1 em Panc-1 e um aumento na fase S-G2/M na linhagem PC-3, principalmente na concentração do dobro do CI_{50} . Frente a indução da morte celular o AM1f aumentou significativamente a apoptose e a necrose na linhagem PC-3, ele também induziu o aumento da senescência nas células Du-145, Panc-1 e Mia-paca-2. No ensaio de toxicidade aguda os derivados AM1b e AM1f não induziram alterações significativas em relação ao grupo não tratado. Mas no ensaio da toxicidade subcrônica o AM1b induziu alta toxicidade com morte de 5 animais e alterações bioquímicas e hematológicas, o que não foi observado como no ensaio com o AM1f. Desta forma conclui-se que em relação a atividade antineoplásicas os derivados tiazolftalimídicos que apresentaram melhor atividade foram os FT-12 e o AM1f. O AM1f além de apresentar menor toxicidade tanto no ensaio de toxicidade aguda como no de toxicidade subcrônica. Já os derivados FT-3, 6 e 8 apresentaram atividade imunomoduladora.

Palavras-chave: Antineoplásico. Toxicidade. Anticâncer.

ABSTRACT

Cancer is one of the main causes of death worldwide, despite advances in relation to available treatments, they still have low selectivity and many side effects. Immunomodulation represents a new strategy for the treatment of cancer patients. The objective of this work was to evaluate the anticancer, immunomodulatory activity and the acute and subchronic toxicity of thiazolphthalimide derivatives (FTs and AMs). Initially, the cytotoxic effect of these derivatives on normal cells (PBMCs) of volunteers was evaluated. The ability to inhibit clone formation, inhibition of cell migration, alteration of the cell cycle and death induction were also evaluated. Subsequently, cytotoxicity was evaluated in several tumor strains at concentrations between 1 and 100 μM . In addition to evaluating the immunomodulation of thiazolphthalimide derivatives (FTs) in Balb/C splenocytes stimulated with ConA. For AM1b and AM1f derivatives, acute and subchronic toxicity, but not immunomodulatory toxicity, was also evaluated. In view of PBMCs, thiazolphthalimidic derivatives did not show cytotoxicity up to 100 mM. In view of the tumor cells Panc-1, Sk-Mel-28 and PC-3, the derivative FT-12 presented IC₅₀ between $31.54\mu\text{M} \pm 1.33$ to $71.92\mu\text{M} \pm 1.31$. The FT-9 derivative showed antineoplastic activity of $59.11\mu\text{M} \pm 4.48$ (K562) and $64.42 \mu\text{M} \pm 6.36$ (Molt-4). The FT-12 derivative induced a decrease in the formation of clones in PC-3 and Panc-1, inhibited the migration of Panc-1 in addition to inducing an increase in death by necrosis and parp cleavage in the Panc-1 strain. Derivatives FT-3 and 4 inhibited the anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-10, while derivative FT-6 stimulated the production of these cytokines. FT-3 and 8 inhibited the production of the pro-inflammatory cytokines IL-17A, INF- γ , TNF- α , IL-6 e IL-2. The AM1b derivative showed antineoplastic activity against the Du-145 prostate cancer strains ($17.19 \mu\text{M} \pm 0.82$) and Panc-1 pancreatic cancer ($11.22\mu\text{M} \pm 2.75$). The AM1f derivative, on the other hand, showed activity against all strains evaluated with IC₅₀ between 14 and 26 μM . In pancreatic and prostate cancer cells, the AM1f derivative reduced the formation of clones, in addition to inhibiting cell migration and inducing a drag in the G₀/G₁ phase in Panc-1 and an increase in the S-G₂/M phase in the PC-3 line, mainly in the concentration of double the IC₅₀. Faced with the induction of cell death, AM1f significantly increased apoptosis and necrosis in the PC-3 strain, it also induced an increase in senescence in Du-145, Panc-1 and Mia-paca-2 cells. In the acute toxicity test, derivatives AM1b and AM1f did not induce significant changes in relation to the untreated group. But in the subchronic toxicity test, AM1b induced high toxicity with the death of 5 animals and biochemical and hematological changes, which was not observed as in the AM1f test. Thus, it is concluded that in relation to antineoplastic activity, the thiazolphthalimide derivatives that showed the best activity were FT-12 and AM1f. AM1f, in addition to presenting less toxicity in both acute and subchronic toxicity tests. FT-3, 6 and 8 derivatives, on the other hand, showed immunomodulatory activity.

Key-words: Antineoplastic. Toxicity. Anticâncer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Distribuição proporcional dos tipos de neoplasias com maiores taxa de incidência no Brasil estimados para 2020-2022, por sexo, exceto pele não melanoma.....	19
Figura 2– Distribuição proporcional dos tipos de neoplasias com maiores taxa de incidências no Nordeste estimados para 2020, por sexo, exceto pele não melanoma.....	19
Figura 3 –Taxas brutas de incidência estimadas para 2020 por sexo, segundo estado de Pernambuco e capital Recife para 2020, por sexo (dados para 100 mil habitantes).....	20
Figura 4 –Fatores de riscos associados ao desenvolvimento de câncer no Brasil e no Mundo	20
Figura 5 – Esquema ilustrativo do processo de carcinogênese tumoral.....	22
Figura 6 – Interação celular de diversas células presentes no microambiente tumoral interagindo para o estabelecimento e sustentação ds células tumorais...	23
Figura 7- Estrutura química da lenalidomida e da talidomida.....	35
Figura 8 - Desenho esquemático com diversas moléculas que possuem o anel tiazol em sua estrutura e suas atividade faramacológicas.....	36

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Estrutura molecular dos derivados tiazofthalimídicos.....	42
Quadro 2– Linhagens tumorais utilizadas para avaliação da citotoxicidade celular dos derivados ftalimido-tiazol	46

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ALT- Alanina Aminotransferase

AMP- Adenosina Monofosfato

AST- Aspartato Aminotransferase

BRCA 1- em inglês, breast câncer 1

BRCJ- Banco de Células do Rio de Janeiro

CAFs- Fibroblastos Associados a Câncer

CBA- em inglês, CytometricBeadArray

CHCM- Concentração De Hemoglobina Corpuscular Média

CI₅₀- Concentração inibitória de 50%, em inglês IC₅₀

CO₂- Gás carbônico.

CONCEA- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CT- Colesterol Total

CTL- Linfócito T Citotóxico

CTLA-1 - Proteína T-Linfócito-Associada citotóxico 4

DANT- Doenças e Agravos Não Transmissíveis

DMSO - Dimetilsulfóxido.

DNA- em português: ácido desoxirribonucleico; ou DNA, em inglês: deoxyribonucleic acid)

FDA- Administração de Medicamentos e Alimentos

FGF- Fator de Crescimento de Fibroblasto

G0 - Intervalo celular 0

G1 - Intervalo celular 1

G2 - Intervalo celular 2

HCM- Hemoglobina Corpuscular Média

HIF-1- Fator induzível por hipóxia 1

HPV – Papiloma vírus humano

IFN- α -Interferon alfa

IFN γ - Interferon gama

IL-10- Interleucina 10

IL-12- Interleucina 12

IL-17- Interleucina 17

IL-1 β - Interleucina 1 beta

IL-2- Interleucina 2

IL-22- Interleucina 22

IL-6- Intereleucina 6

ILC- Células linfoides inatas

INCA- Instituto Nacional do Câncer

JNK-1- Fosfatase quinases

LPQM- Laboratório de Planejamento em Química Medicinal

LPSF- Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos

M - Mitose.

MEC- Matriz extracelular

MHC- Complexo de Histocompatibilidade Principal

MMP- Metaloprotease

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

NF-κB- Fator Nuclear Kappa B

NHI- em inglês, *NationalCancerInstitute*

NK- Natural Killer

OMS- Organização Mundial da Saúde

p - Significância estatística.

PBMC - Células mononucleares do sangue periférico.

PBS - Tampão Salino Fosfato.

PD-1- em inglês, Programmed cell death

PDL-1-- em inglês, Programmed Cell Death Ligand 1

PE- Ficoeritrina

PGE2- Prostaglandina 2

PI - Iodeto de Propídeo.

PPAR - Receptor Ativado por proliferadores de peroxissomos.

PT- Proteína Total

SARs- Relação Estrutura Atividade

SDF1- Fator 1 Derivado de Células Estromais

SDS- Lauril Sulfato de Sódio

Sirt1- Regulador Silencioso de Informações 1

STAT-3- do inglês: signal transducers and activators of transcription 3

TAMs- Macrófagos Associados ao Tumor

TCLE- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TG- Triglicerídeos

TGF- β - Fator de crescimento de tumoral beta

TGF- β – Fator de Transformação beta

Th- do inglês, T Helper

TILs- Linfócitos Infiltrantes de Tumor

TLR- em inglês, toll like receptors

TNF- Fator de Necrose Tumoral

TZD-Tiazolidina

UFPE- Universidade Federal de Pernambuco

UV – Ultravioleta

VCM- Volume Corpuscular Médio

VEGF- Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1 Introdução.....	15
2 Revisão da literatura.....	18
2.1 Epidemiologia e fatores de risco associados ao Câncer.....	18
2.2 Aspectos gerais do câncer.....	21
2.3 Microambiente tumoral e sua importância na carcinogênese	23
2.3.1 Inflamação e câncer.....	24
2.4 sistema imunológico	27
2.4.1 Imunomodulação	29
2.5 Estratégias de tratamento do câncer	30
2.6 Desenvolvimento e Prospecção de Novos Fármacos.....	32
2.6.1 Moléculas privilegiadas.....	33
2.6.1.1 Ftalimidas	34
2.6.1.2 Tiazol	36
2.6.1.3 Tiazolidina-2-4-diona	37
2.6.1.4 Ftalimido-tiazol.....	38
3 Objetivos.....	40
3.1 Geral	40
3.2 Objetivos específicos	40
4 Metodologia.....	41
4.1 Fluxograma dos ensaios Biológicos.....	41
4.2. Derivados Ftalimído-tiazol.....	41
4.3 Avaliação da atividade antineoplásica	45
4.3.1 Obtenção e Citotoxicidade em Células Não Transformadas	45
4.3.2 Cultivo e manutenção de linhagens transformadas.....	45
4.3.3 Ensaio de citotoxicidadedas células transformadas.....	46
4.3.3.1 Cálculo doCl ₅₀	47
4.3.4 Avaliação da inibição da migração celular	47
4.3.5 Avaliação da inibição de formação de novos clones	47
4.3.6 Avaliação da Inibição do Ciclo Celular	48
4.3.7 Avaliação da indução de morte celular.....	48
4.3.8 Avaliação da clivagem de Parp	48
4.3.9 Avaliação da indução de senescência celular	49

4.4 Avaliação da toxicidade aguda e sub-cronica	49
4.4.1 Preparação do Composto	49
4.4.2 Animais.....	49
4.4.3 Avaliação Toxicológica <i>in vivo</i>.....	50
4.4.3.1 Análise de Toxicidade Aguda	50
4.4.3.2 Análise de Toxicidade Subcrônica.....	50
4.4.3.3 Avaliação hematológica.....	51
4.4.3.4 Avaliação bioquímica.....	51
4.5 Avaliação da atividade imunoduladora	52
4.5.1 Avaliação da citotoxicidade em esplenócitos por MTT.....	52
4.5.2 Cultura de esplenócitos	52
4.5.3 Quantificação de citocinas por CBA	53
4.6 Análise Estatística.....	53
5 Resultados.....	55
5.1 Artigo 1.....	55
5.2 Artigo 2.....	86
5.3 Artigo 3.....	104
6 Discussão	139
7 Considerações finais	144
8 Perspectivas	145
Anexo 1-Parecer CEP Animal.....	166
Anexo 2- Parecer comite de etica humano	167
Anexo 3 - Parecer comite etica animal	171

1 INTRODUÇÃO

O câncer é caracterizado como um conjunto de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células e a invasão aos tecidos e órgãos adjacentes, podendo ocorrer adesseminação para outras regiões do corpo. Essas células apresentam um crescimento desordenado em decorrência do acúmulo crescente de alterações genéticas, que afetam as principais vias moleculares e, por conseguinte, alteram os processos de proliferação e de morte celular. Desta forma, as células tumorais passam a se dividir rapidamente e incontrolavelmente dando origem aos tumores propriamente ditos (PÉREZ-HERRERO; FERNÁNDEZ-MEDARDE, 2015; HANAHAN E COUSSENS, 2012).

O impacto global, dessa doença, continua aumentando e grande parte disso se deve ao envelhecimento e crescimento populacional, a adoção de comportamento de risco, como também, como a falta de praticar exercício físico, a má alimentação e a maior exposição a agentes carcinogênicos. O câncer é a segunda causa de morte no Brasil e no mundo (FERLAY *et al.*, 2014). Segundo a organização mundial da saúde (OMS) a incidência para o ano de 2018 foi de 18,1 milhões de casos e que para 2040 estima-se que sejam 29,5 milhões de indivíduos afetados por essa doença (GLOBOCAN, 2018). De acordo com a estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA) foram aproximadamente 600 mil novos casos para o ano de 2018 (INCA, 2017a) no Brasil.

O conceito atual de câncer leva em consideração a influência das células tumorais sobre o microambiente no qual estão inseridas, e este influenciará tanto as células normais como as células tumorais no desenvolvimento, na progressão e na evasão das células neoplásicas (HANAHAN E WEINBERG, 2011). O microambiente tumoral possui uma dinâmica diferente dos tecidos normais, pois é regulado pelas necessidades das células tumorais (ARNETH, 2020; HANAHAN E WEINBERG, 2000). Dessa maneira, o microambiente tumoral é um potencial alvo terapêutico uma vez que, promover alterações neste ambiente, pode facilitar a indução à morte das células neoplásicas. Assim a busca de moléculas que possam atuar alterando o microambiente com a finalidade de desestruturar a rede de sustentação tumoral vem ganhando espaço nos últimos anos (SHNAIDER *et al.*, 2020; CHAMMAS *et al.*, 2010).

A inflamação, característica marcante do microambiente tumoral, é fundamental para o desenvolvimento, estímulo e manutenção das células tumorais. A inflamação persistente no tecido e favorece o surgimento de células neoplásicas

(QU; TANG; HUA, 2018;CAVALLO *et al.*, 2011). O processo inflamatório contribui na tumorigênese por fornecer diversos fatores de crescimento que sustentam sinalização proliferativa, fatores de sobrevivência que inibem a morte celular e fatores angiogênicos que induzem a formação de novos vasos para nutrir as células tumorais em crescimento. Ademais, vale salientar que células do microambiente tumoral liberam enzimas que modificam a matriz extracelular, como as metaloproteinases, que a degradam favorecendo os processos de angiogênese, invasão e metástase (ARMSTRONG *et al.*, 2018;CAVALLO *et al.*, 2011).

A eficácia dos fármacos antineoplásicos varia de acordo com o tipo de câncer, com as condições fisiológicas do paciente e com o grau ou estágio em que se encontra o tumor. Atualmente, a principal abordagem terapêutica para o tratamento dos pacientes com câncer é a quimioterapia sistêmica difusa a qual, na maioria das vezes, utiliza agentes citostáticos. Esses medicamentos induzem a apoptose e ou inibem a progressão do ciclo celular. Entretanto, não agem seletivamente e possuem um baixo índice terapêutico e inúmeros efeitos colaterais, como náuseas, mielotoxicidade e cardiotoxicidade (ARIAS, 2011; RÜHLE *et al.*, 2018).

Desta forma a busca de novos agentes quimioterápicos é de extrema relevância para que sejam encontradas alternativas eficazes no tratamento contra neoplasias (PÉREZ-HERRERO; FERNÁNDEZ-MEDARDE, 2015). Ademais, é de fundamental importância o desenvolvimento de medicamentos de segunda escolha em casos de pacientes com resistência terapêutica aos fármacos convencionais. A resistência aos quimioterápicos é um dos maiores obstáculos que interferem significativamente na eficiência do tratamento quimioterápico. A avaliação de novos agentes é, portanto, necessária para que os tratamentos sejam mais seletivos e eficientes para os diferentes tipos de tumores (HAJJI *et al.*, 2018; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2011).

Assim pode-se utilizar ferramentas da Química Medicinal para a síntese de novos medicamentos a partir da combinação de núcleos farmacofóricos distintos em uma única entidade química. A este processo denomina-se hibridização molecular, que visa desenvolver novas entidades químicas mais potentes, eficazes e seguras do que os tratamentos existentes (PITTA *et al.*, 2013). Essa estratégia une dois ou mais grupos farmacofóricos com atividades biológicas já relatadas para dar origem a uma nova molécula visando um aumento de sua atividade biológica (CHAGAS *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Um grupo farmacofórico, bastante utilizado pela Química Medicinal, é o grupo tiazolidina-1-4-diona, composto por um anel heterocíclico que possuem em sua estrutura átomos de oxigênios, enxofre, nitrogênio e carbono. Esse anel possui diversas atividades biológicas relatadas como antidiabético, anticâncer, anti-artrítico, antiinflamatório, antimicrobiano (KAUR MANJAL *et al.*, 2017).

Outro grupo farmacofórico bastante estudado é o ftalimidico, esse anel ficou mais conhecido por fazer parte da estrutura química da talidomida. Esta molécula, comercializada para enjôo, causou a focomelia, deficiência no desenvolvimento dos membros entre outras comorbidades, em diversos bebês nas décadas de 50 e 60 (MORO e INVERNIZZI, 2017). Atualmente, a talidomida e outros análogos são utilizados para o tratamento de lúpus eritematoso sistêmico refratário, mielodisplasias e mieloma múltiplo (WINTER *et al.*, 2015). O anel ftalimidico possui diversas atividades relatadas na literatura como analgésicas, anticonvulsivantes, antituberculose, hipolipidêmico, ansiolítico, antiinflamatório, antimicrobiana e antipsicótica (ALIANÇA *et al.*, 2017).

Desta forma o presente estudo visa avaliar a atividade antitumoral e imunomoduladora de derivados Ftalimido-tiazol como estratégia terapêutica frente a diversas linhagens tumorais, como também avaliar a toxicidade aguda e subcrônicas de novos derivados.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 EPIDEMIOLOGIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS AO CÂNCER

O câncer é a segunda causa de mortalidade no Brasil e no mundo. Segundo o INCA, as neoplasias são classificadas como doenças e agravos não transmissíveis (DANT). Estimou-se que, em 2018, dos 36 milhões de óbitos ocorridos no Brasil, 21% destes foram devido a complicações das neoplasias (INCA, 2017b).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), os dados referentes a incidência de câncer demonstram que importantes transições demográficas e epidemiológicas globais estão acontecendo. Essas modificações são caracterizadas pelo aumento da longevidade como também a mudança dos hábitos alimentares. Isso tem um impacto relevante no aumento da incidência de neoplasias nas próximas décadas, o que ocorrerá principalmente em países com baixo e médio desenvolvimento. A sobrevivência dos pacientes com câncer é maior em países e regiões mais desenvolvidas. Desta forma, há uma variabilidade das taxas de mortalidade por causa do câncer em todo o mundo (FERLAY *et al.*, 2015).

No ano de 2018 ocorreram 18 milhões de novos casos e desseocoreram 9,2 milhões de óbitos (INCA, 2019). Destaca-se também um discreto predomínio do sexo masculino tanto na incidência (53%) quanto na mortalidade (57%) causadas por neoplasias. Os dados do Globocan (Observatório de câncer global) demonstraram que os tipos de câncer mais incidentes no mundo foram: pulmão (1,8 milhão), mama (1,7 milhão), intestino (1,4 milhão) e próstata (1,1 milhão). Nos homens, os mais frequentes foram: pulmão (16,7%), próstata (15,0%), intestino (10,0%), estômago (8,5%) e fígado (7,5%). Em mulheres, as maiores frequências foram encontradas pra câncer de mama (25,2%), intestino (9,2%), pulmão (8,7%), colo do útero (7,9%) e estômago (4,8%) (Bray *et al.*, 2018).

No Brasil, os dados do INCA indicam que, para o biênio 2020-2022, a incidência será de 625 mil casos de câncer, como pode ser observado na figura 1. As neoplasias mais incidentes em homens serão próstata, pulmão, cólon e reto, já em relação as mais incidentes em mulheres serão eles: mama, cólon e reto e colo do útero (INCA, 2019).

Figura 1 – Distribuição proporcional dos tipos de neoplasias com maiores taxa de incidência no Brasil estimados para 2020-2022, por sexo, exceto pele não melanoma. Fonte: INCA, 2019.

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%			Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Óvário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

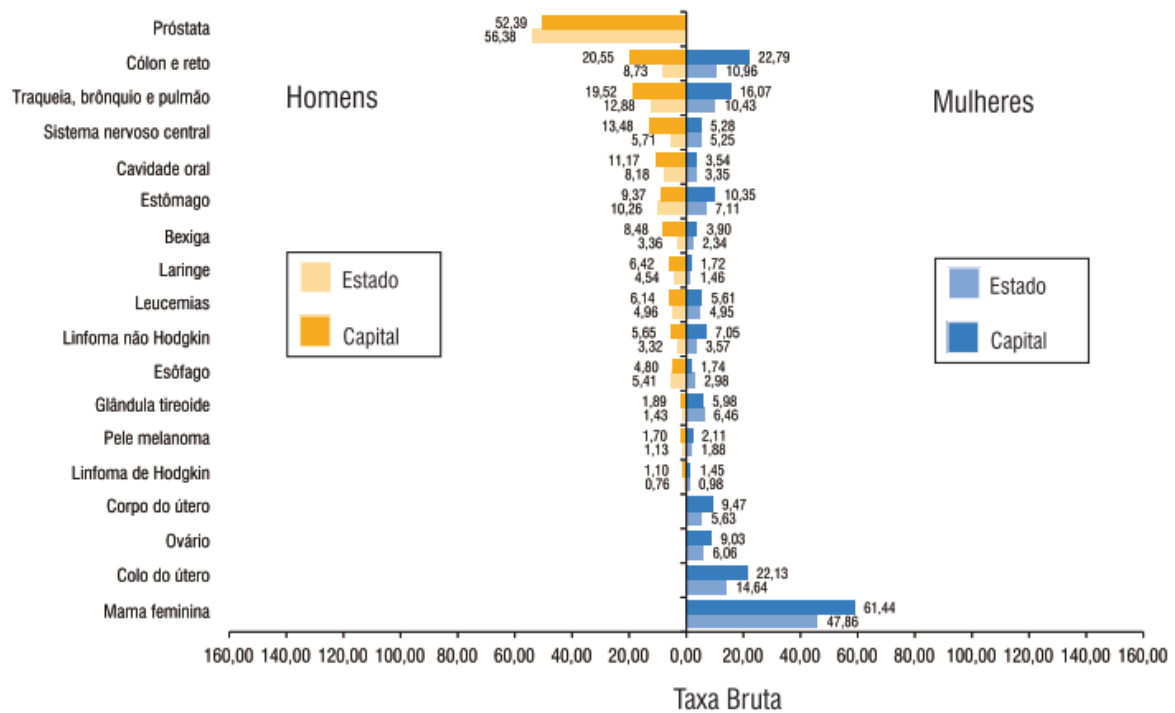
A distribuição de incidência de neoplasias varia regionalmente, a região Sudeste possui maior taxa de incidência (mais de 60%) seguida pelas regiões Nordeste (27,8%) e Sul (23,4%). A incidência da região Nordeste (Figura 2) é bem semelhante a do Brasil, mas vale ressaltar que o câncer de próstata em homens e o câncer de colo de útero em mulheres têm uma incidência maior que no resto do país (INCA, 2019).

Figura 2– Distribuição proporcional dos tipos de neoplasias com maiores taxa de incidências no Nordeste estimados para 2020, por sexo, exceto pele não melanoma. Fonte: INCA, 2019.

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	20.570	40,7%			Mama feminina	13.190	27,3%
Traqueia, brônquio e pulmão	3.120	6,2%			Colo do útero	5.250	10,9%
Estômago	3.000	5,9%			Cólon e reto	3.220	6,7%
Cólon e reto	2.540	5,0%			Traqueia, brônquio e pulmão	2.640	5,5%
Cavidade Oral	2.180	4,3%			Glândula tireoide	2.360	4,9%
Esôfago	1.580	3,1%			Estômago	2.090	4,3%
Leucemias	1.430	2,8%			Óvário	1.690	3,5%
Laringe	1.420	2,8%			Corpo do útero	1.520	3,1%
Sistema nervoso central	1.340	2,7%			Sistema nervoso central	1.250	2,6%
Linfoma não Hodgkin	1.120	2,2%			Leucemias	1.210	2,5%

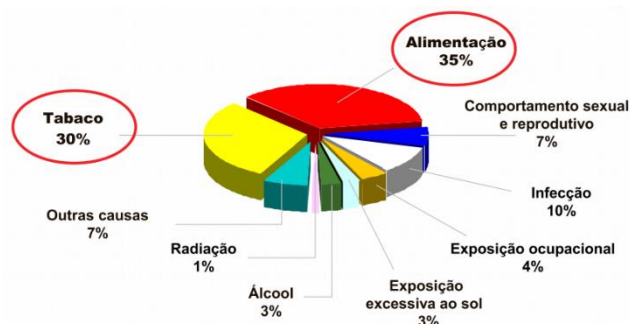
Quando comparamos o estado de Pernambuco com a capital Recife, para o ano de 2020, os dados demonstram que a incidência é maior na capital de todas as neoplasias, e em ambos os sexos (Figura 3). Nos homens, é esperado uma maior incidência das neoplasias de próstata, pulmão, cólon e reto e estômago, como ocorre no Brasil. No caso das mulheres, espera-se mama, cólon e reto e colo do útero, refletindo o que ocorre tanto no Brasil como na região Nordeste (INCA, 2019).

Figura 3 –Taxas brutas de incidência estimadas para 2020 por sexo, segundo estado de Pernambuco e capital Recife para 2020, por sexo (dados para 100 mil habitantes). Fonte: INCA,2019.



Os fatores geográficos devem ser observados pois irão influenciar a incidência de determinados tipos de neoplasias. Isto se deve, possivelmente, por refletirem os hábitos de vida de determinada população. É notável a influência dos hábitos alimentares no que se refere ao consumo acentuado de comidas industrializadas. Este fenômeno ocorre em todo o mundo e afeta principalmente os países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil. Outros fatores de risco ligados ao estilo de vida, como por exemplo, o consumo de bebidas alcoólicas, a baixa ingestão de frutas e vegetais, o alto consumo de carnes vermelhas e de alimentos processados, a obesidade, o tabagismo e a inatividade física (Figura 4) são fatores que podem influenciar o desenvolvimento de neoplasias (ARNOLD *et al.*, 2017).

Figura 4 –Fatores de riscos associados ao desenvolvimento de câncer no Brasil e no Mundo. Fonte: INCA, 2015.



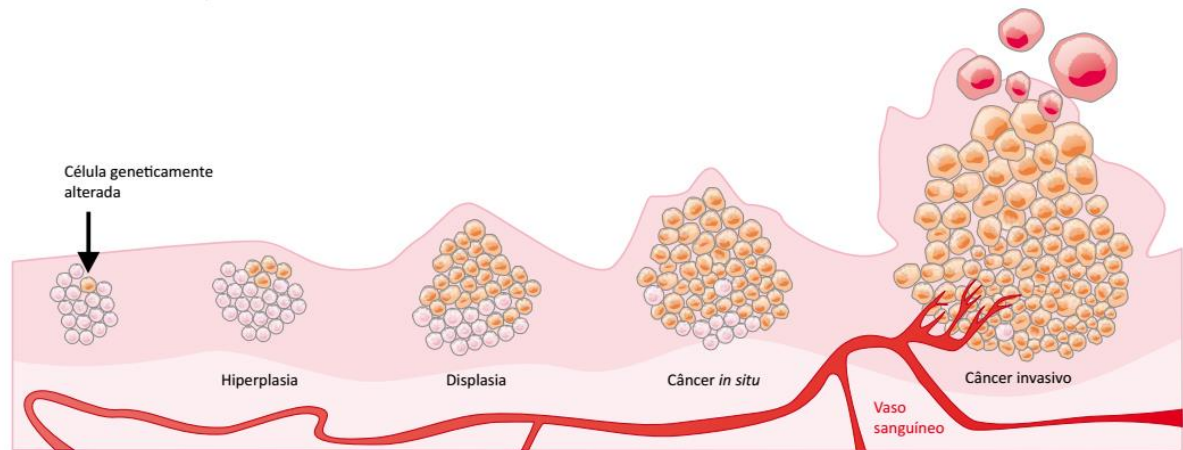
Vale ressaltar que os fatores hereditários, as mutações genéticas familiares a exemplo BRCA1 e BRCA2, contribuem em menor escala e dependerá principalmente do tipo de câncer e do histórico familiar. O câncer de mama e próstata possuem maior influência do fatores genéticos do que outros tipos de neoplasias (FERLAY *et al.*, 2014; INCA, 2017b).

2.2 ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER

O câncer pode ser definido como um conjunto de mais de 200 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que tendem a invadir outros tecidos e órgãos (INCA, 2011). Essas células acumulam mutações que favorecem vantagem proliferativa em relação às células normais, além de favorecer a invasão e a migração para outros tecidos, dando origem às metástases. As metástases são responsáveis por cerca de 90% das mortes dos pacientes com neoplasias (ALEXANDROVA, 2014; PIACENTINI E MENEZES, 2012).

A carcinogênese é subdividida em três estágios: iniciação, promoção e progressão tumoral (Figura 5). O primeiro estágio é caracterizado pela alteração gênica provocada por agentes carcinogênicos. Ocorrendo assim, um acúmulo de mutações no DNA celular, quando essas alterações ocorrem em genes responsáveis pelo ciclo celular, favorecem o desenvolvimento de células neoplásicas. O segundo estágio é caracterizado pelo contato contínuo com o agente cancerígeno promotor. Essa transformação é lenta e gradual, caracterizada por hiperplasia e displasia tecidual as quais podem ser reversíveis. No terceiro estágio, as células se multiplicam de forma descontrolada e irreversível. Nesse estágio o câncer já está instalado e evolui até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença (INCA, 2011; PIACENTINI e MENEZES, 2012).

Figura 5– Esquema ilustrativo do processo de carcinogênese tumoral. Fonte: INCA, 2011



A oncogênese é iniciada por alterações genéticas que podem ser decorrentes de fatores extrínsecos como alimentação e radiação UV. Os fatores podem ser divididos em extrínsecos e intrínsecos. Em relação aos fatores intrínsecos, destacam-se as mutações hereditárias ou erros aleatórios durante a divisão celular. No entanto, são necessárias cerca de duas ou mais mutações para que a célula modificada consiga alterar os mecanismos responsáveis pela proliferação, diferenciação e morte celular (CHAMMAS E ONUCHIC, 2010). Algumas mutações irão conferir às células tumorais vantagens de crescimento, como o aumento da invasibilidade regional e favorecimento da capacidade de migração para diferentes tecidos (ABEL E DIGIOVANNI, 2011).

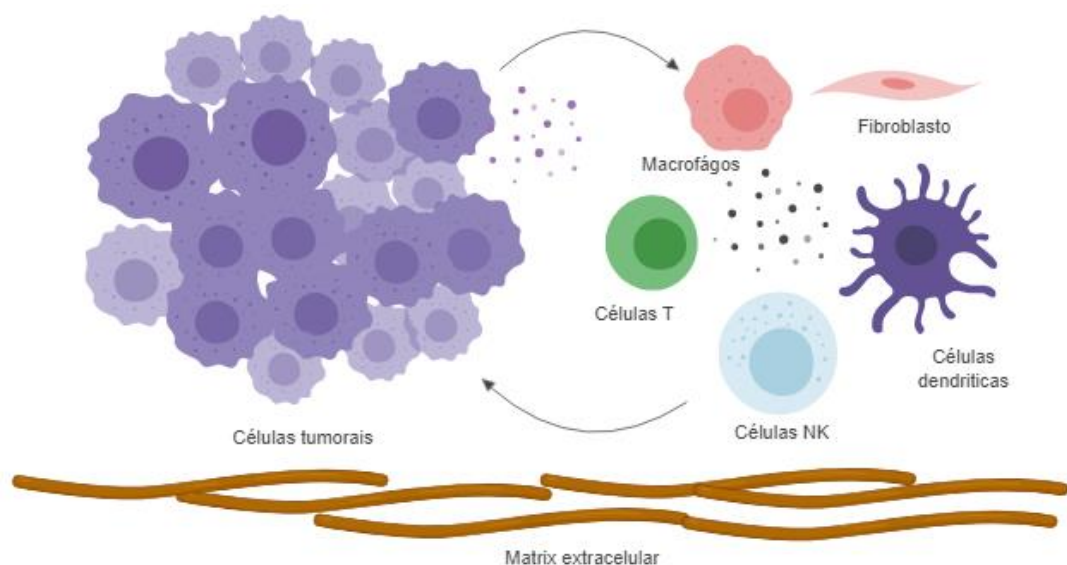
As neoplasias podem ser classificadas em benignas e malignas. As principais diferenças entre os tumores benignos e malignos se referem as taxas de desdiferenciação e crescimento celular, as quais são maiores em células malignas. Outra característica importante é que as células malignas possuem a propriedade de invadir e se ocupar e se desenvolver em outros tecidos, dando origem a tumores secundários chamados de metástases, fato não observado de tumores benignos. As neoplasias benignas apresentam um crescimento de forma organizada, geralmente lento, mas com marcada expansividade, sem rompimento da membrana basal e com limites bem definidos. No entanto, apesar de não invadirem outros tecidos, o crescimento descontrolado das células comprime os tecidos adjacentes, como é o caso de miomas (que tem origem no tecido muscular liso) e o adenoma (tumor benigno das glândulas) (INCA, 2011; PIACENTINI; MENEZES, 2012)

2.3 MICROAMBIENTE TUMORAL E SUA IMPORTÂNCIA NA CARCINOGENÊSE

O câncer era visto anteriormente como um conjunto de células que se multiplicam descontroladamente fugindo total ou parcialmente do controle do organismo. Essas células teriam autonomia no crescimento e na perpetuação da multiplicação celular. No entanto, essa visão mostrou-se reducionista e incompleta. Atualmente, o câncer é visto como uma rede complexa de co-existência e co-estimulação entre células normais e tumorais que interagem dando origem ao microambiente diferenciado(ARNETH, 2020). Este microambiente tumoral passou a ser reconhecido gradualmente como um dos principais contribuintes para a progressão do câncer e resistência aos medicamentos, sendo visto desta forma como alvo para novas terapias anticâncer(OCAÑA *et al.*, 2018; TSAI *et al.*, 2014).

Os tumores são tecidos complexos que compreendem células tumorais e estromais geneticamente estáveis, como células endoteliais e imunes, fibroblastos e entre outras células residente no tecido. Outro importante componente é a matriz extracelular (MEC) na qual as células estão inseridas. Esta matriz sofre modificações, como por exemplo, acréscimo substancial de fibras colágenas que aumentam a rigidez tecidual local, essa resistência dificulta a entrada de medicamentos antitumorais no tecido (EBLE E NILAND, 2019). Desta forma o microambiente tumoral tem participação significativa em diversos processos da iniciação, progressão tumoral e metástase (Figura 6).

Figura 6 – Interação celular de diversas células presentes no microambiente tumoral interagindo para o estabelecimento e sustentação ds células tumorais. Autor: Própria, 2019.



As células não cancerígenas presentes no microambiente tumoral interagem de forma direta e indireta com as células neoplásicas. Essa relação se dá através da liberação de citocinas ou moléculas sinalizadoras que estimularam o crescimento e a progressão tumoral (GUN *et al.*, 2019). As células neoplásicas induzem as células não tumorais do estroma à adquirirem fenótipos favoráveis ao crescimento tumoral (GANGULY, LI E MIRANTI, 2014;QUAIL E JOYCE, 2013).

Desta forma, as alterações estromais que sustentam a iniciação e progressão tumoral incluem células endoteliais (vasculares ou linfáticas) e pericitos associados a tumor, fibroblastos associados a câncer (CAFs) e células imunológicas, como os linfócitos infiltrantes de tumor (TILs), células T, células B, células NK, macrófagos associados (TAMs) e mastócitos. Essas células que fazem parte de microambiente são cooptadas a favorecer o crescimento celular tumoral, e geralmente não apresentam taxas de proliferação desreguladas ou instabilidade genética (OCAÑA *et al.*, 2018; KLEMM E JOYCE, 2014).

A matriz extracelular participa ativamente da progressão tumoral, pois armazena elementos intercelulares como componentes fibrosos, proteínas e polissacarídeos (KLEMM E JOYCE, 2014). A degradação da matriz extracelular implica diretamente na transição epitélio-mesenchimal, a qual promove remoção da barreira e a clivagem do colágeno. Esta última produz fragmentos biologicamente ativos que regulam a migração, proliferação e sobrevivência celular. Este processo degradativo da matriz também pode liberar moléculas de sinalização importantes, tais como o TGF- β (Fator de crescimento de tumoral beta), FGF (Fator de Crescimento de Fibroblasto) os quais regulam a angiogênese (THOMAS; RADHAKRISHNAN, 2019; EBLE; NILAND, 2019).

2.3.1 Inflamação e câncer

Estudos vêm demonstrando que a inflamação crônica é um dos fatores importantes para o surgimento e progressão do tumor (ARMSTRONG *et al.*, 2018; HE *et al.*, 2018). Cerca de 90% dos cânceres não são causados por mutações herdadas, mas por fatores ambientais que aumentam a inflamação como, por exemplo, o tabagismo e dietas alimentares (PEÑA-OYARZUN *et al.*, 2018).

A inflamação não é discutida pelo seu potencial carcinogênico, no entanto, existe uma íntima relação entre a presença de infecções microbianas crônicas e

danos causados pela inflamação crônica e o desenvolvimento de cânceres. A infecção causada pelo *Helicobacter pylori*, por exemplo, causa úlceras pépticas que podem evoluir para câncer gástrico. Trabalhos demonstram que indivíduos que possuem colite crônica ulcerativa têm uma probabilidade maior de desenvolver carcinoma colorretal, assim como pacientes com hepatite crônica ou cirrose tendem a ter um maior risco associado ao desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (ARMSTRONG *et al.*, 2018; NAGARSHETH; WICHA; ZOU, 2017)

A inflamação é um fator crucial para o sucesso do evento neoplásico e é considerada um dos *Hallmarkers* do câncer - (HANAHAHAN E WEINBERG, 2011). A inflamação altera substancialmente as interações entre as células do microambiente tumoral e influencia na reprogramação epigenética, nos danos ao DNA, na promoção de hipóxia e angiogênese, na ativação de fibroblastos associados ao câncer (CAFs), no recrutamento de células imunes regulatórias e na inibição da vigilância imunológica antitumoral (CHAMMAS E ONUCHIC, 2010; BAKER, 2018).

Dentre as células do sistema imune presentes no microambiente, os macrófagos, os linfócitos T e os precursores mielóides encontram-se em maior proporção, estas células participam ativamente do estímulo à angiogênese. Ademais, as citocinas secretadas pelas células imunes têm repercussão nos diferentes estágios tumorais. A IL-1 β e IL-6, por exemplo, estimulam a ativação de NF- κ B e STAT-3. Estes fatores de transcrição sustentam o microambiente inflamado, propiciando assim o desenvolvimento tumoral. Outra característica desse ambiente é a baixa tensão de oxigênio denominada de hipóxia. Os macrófagos detectam a hipóxia e, por consequência, ativam o fator induzível por hipóxia 1 (HIF-1) o qual promove a expressão do fator 1 derivado de células estromais (SDF1), também conhecido como CXCL12 (CXCL12). Esta quimiocina favorece o recrutamento de células endoteliais, enquanto os precursores mielóides produzem fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Tanto os macrófagos como as células mielóides favorecem o desenvolvimento das metástases por liberarem metaloproteases (MMP) 2 e 9 que aumentam a degradação dos componentes da membrana basal. Os macrófagos também aumentam os níveis de TNF, que diminuem a expressão da E-caderina favorecendo assim a invasibilidade celular das células neoplásicas (HARRIS, 2014; MUENST *et al.*, 2016).

Tanto a inflamação localizada quanto sistêmica além disso, a cronificação da inflamação pode promover a iniciação e progressão do tumor. Desta forma, terapias complementares contra o câncer também devem se concentrar na comunicação

entre células neoplásicas e células do sistema imune (GUN *et al.*, 2019). Assim, a busca de moléculas que possam atuar frente a esse microambiente tumoral com efeito dual, tanto influenciando as células do sistema imune como também induzindo a morte das células neoplásicas é de fundamental importância (PEÑA-OYARZUN *et al.*, 2018).

A relação das células tumorais e o sistema imune, chamado de imunoeedição, é dividida em três fases: eliminação, equilíbrio e escape. Na fase de eliminação, a resposta inflamatória é aguda induzindo uma resposta tanto inata como adaptativa para reconhecer e eliminar as células tumorais. As principais células imunes envolvidas na defesa contra células tumorais são células natural Killer (NK), células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, mastócitos e linfócitos T citotóxicos (MUENST *et al.*, 2016; MOHME; RIETHDORF; PANTEL, 2017).

As células apresentadoras de antígenos (APCs) atuam capturando e apresentando os antígenos associados aos tumores para células T imaturas através do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I e II. Este promove a ativação e expansão clonal de linfócitos T principalmente em CD4⁺ e células T citotóxicas CD8⁺. Outra consequência da ativação do complexo é a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IFN γ e IL-12, as quais ativam a resposta Th1 que catalisam a ativação do linfócito T citotóxico (CTL). Este subtipo de linfócito quando ativado irá migrar e se infiltrar no microambiente tumoral para induzir as células tumorais à apoptose (MOHAMED, JANTAN E HAQUE, 2017; STEVEN E SELIGER, 2018).

A segunda etapa da imunoeedição, chamada de equilíbrio, pode durar anos. Neste período as células do sistema imune combatem as células tumorais sem que haja eliminação definitiva. Assim, a resposta imune irá selecionar células neoplásicas instáveis que sobreviveram e se replicaram. Essas células são mais resistentes à atuação imune e formam uma nova população de clones tumorais. A este processo denomina-se “imunosseleção” (CHAMMAS E ONUCHIC, 2010; STEVEN E SELIGER, 2018).

Algumas células tumorais que conseguem resistir à resposta imunológica por diferentes mecanismos e se proliferam. Inicia-se então a última etapa da imunoeedição que é a fase de escape na qual as células tumorais tornam-se menos imunogênicas e adquirem a capacidade de evadir do controle imunológico. Por meio da redução da expressão de moléculas de adesão, de antígenos MHC, da liberação de mediadores anti-inflamatórios (IL-10, PGE2, e TGF- β) ocorre a inibição dos

linfócitos T efetores e da resposta imune (MOHAMED, JANTAN E HAQUE, 2017; CASTRO BARRETO *et al.*, 2010).

Atualmente, é aprovado pelo FDA (Administração de Medicamentos e Alimentos), órgão responsável pela aprovação de medicamentos nos Estados Unidos da América, o uso de IL-2 em melanoma metastático e carcinoma de células renais e IFN- α para a terapia adjuvante do melanoma estágio III. O potencial das citocinas no campo da imunoterapia do câncer pode ser exemplificado pelo uso de altas doses de IL-2 a qual pode induzir respostas completas duráveis em um subconjunto de pacientes com melanoma metastático e carcinoma de células renais. No entanto, o extenso pleiotropismo e a redundância da sinalização das citocinas representam desafios significativos para obter respostas antitumorais significativas além dos efeitos colaterais do uso desses medicamentos. Outro critério importante é a resposta dos pacientes que é bem variável nessas terapias, sendo um dilema do uso de IL-2 principalmente pelas baixas taxas de resposta e pela toxicidade alta (LEE; MARGOLIN, 2011).

2.4 SISTEMA IMUNOLÓGICO

A resposta imunológica do organismo pode ser dividida em aguda e crônica. A aguda ou inicial tende a debelar o agente agressor, mas caso o processo de eliminação inicial não obter êxito, o estímulo irá persistir e a reação inflamatória tenderá a se cronificar (QU; TANG; HUA, 2018).

Quando o dano tecidual acontece as células do tecido lesionado liberam inúmeros mediadores químicos que irão iniciar a cascata de ativação e migração de leucócitos (neutrófilos, monócitos e eosinófilos) para o local de dano para que essas células iniciem o reparo dos tecidos afetados. Inicialmente os primeiros leucócitos a serem atraídos, frente a uma resposta à sinalização quimiotática, seriam os neutrófilos, responsáveis por estimular o processo de reparo e iniciar a inflamação. Após esse processo, inicia-se o influxo de monócitos que, ao entrarem no tecido, se diferenciam em macrófagos. As células endoteliais, epiteliais e mesenquimais, presentes no tecido lesado, serão estimuladas por fatores de crescimento e citocinas produzidas por esses macrófagos que foram recrutados para o local. As quimiocinas, uma família de citocinas quimiotáticas, dirigem o recrutamento de células efetoras específicas de leucócitos, ditando, assim a progressão da resposta inflamatória. Após esse processo agudo, as células irão induzir a liberação de citocinas

antiinflamatórias que indizirão a remodelação do tecido (Armstrong *et al.*, 2018; Nagarsheth, Wicha e Zou, 2017).

A resposta do sistema imunológico contra patógenos e antígenos nocivos é didaticamente classificada em resposta imunológica inata e adaptativa. A imunidade inata ou não específica age no contato inicial aos patógenos invasores através de barreiras físicas, e células de resposta inespecífica como neutrófilos e mastócitos. Já a imunidade específica do antígeno ou adaptativa é mais complexa e desenvolve uma memória imunológica influenciada pelo primeiro contato com o patógeno. A resposta a esse mesmo antígeno em uma segunda invasão será mais rápida e eficiente. (Lau e Sun, 2018; Mohamed, Jantan e Haque, 2017).

As células linfóides inatas (ILCs) são um grupo de linfócitos heterogêneos categorizados em três subgrupos principais: tipo 1, 2 e 3. Todos possuem o receptor $CD4^+$ T helper (Th) e são diferenciadas por seu perfil de produção de citocinas e por seus principais fatores de transcrição que regulam seu desenvolvimento. Essas células produzem IFN- γ , expressam o fator de transcrição T-box (T-bet) e são subdivididas em células NK e ILC1s. As células do tipo 2 (ILC2s) produzem IL-5, IL-13 e o fator de transcrição receptor relacionado ao ácido retinóide alfa ($ROR\alpha$) e altos níveis de Gata-3. Já as células linfóides inatas tipo 3 (ILC3s), produzem IL-17 e IL-22 e possuem como fator de transcrição o receptor relacionado ao receptor órfão relacionado com retinoide γ T ($ROR\gamma$ t). São subdivididas em células indutoras do tecido linfóide (LTi) e ILC3s (MAAZI; AKBARI, 2017).

Essas células da imunidade inata são divididas levando em consideração a via ontogenética, suas diferentes funções efetoras e seus efeitos fisiopatológicos. A imunidade efetora mediada por células tipo 1 atua fornecendo uma resposta eficaz contra microrganismos intracelulares, tais como bactérias, protozoários e alguns vírus. Já a do tipo 2 atua principalmente na proteção contra helmintos e venenos. E a imunidade do tipo 3 é dedicada à proteção contra bactérias e fungos extracelulares (ANNUNZIATO; ROMAGNANI; ROMAGNANI, 2014).

As células da imunidade adaptativa são divididas com base em suas funções, perfis de expressão de proteínas, citocinas e fatores de transcrição. Estas linhagens incluem células efetoras, que protegem contra patógenos e células T reguladoras (Treg), que protegem contra respostas exacerbadas contra o hospedeiro como também atuam contra antígenos exógenos. A secreção de citocinas caracteriza os linfócitos pertencentes aos grupos Th1 e Th2. Outros subconjuntos Th adicionais foram identificados, sendo mais intensamente estudados o perfil Th17, que é crucial

para defesa do hospedeiro contra patógenos extracelulares, e o perfil Th22, que tem papel crucial na defesa do hospedeiro contra bactérias gram-negativas. Outros perfis foram descritos como o Th9 que está ligado a doenças relacionadas com a autoimunidade e asma. O perfil Th17 compreende as células auxiliares foliculares que atuam no centro germinativo folicular linfóide para mediar a função de células T helper (MAAZI e AKBARI, 2017; COSMI *et al.*, 2014).

As células Th1 atuam na ativação de células fagocíticas além de influenciar a opsonização de anticorpos e ativação de proteínas do complemento. O fator chave necessário para obter a diferenciação de células T CD4 no perfil Th1 é a presença das citocinas IL-12 e IFN- γ . As respostas imunes Th2 conferem proteção contra parasitas além de estarem envolvidas na promoção de reações agudas e respostas inflamatórias crônicas contra alérgicos. A polarização no perfil Th2 da célula T CD4 imatura é influenciada pela produção precoce de IL-4 durante o início da resposta. O perfil Th17 tem ação frente a bactérias e fungos, devido a sua capacidade de recrutar e ativar neutrófilos, através da produção de IL-8, ou indiretamente induzindo a produção de fatores estimuladores de colônia e CXCL8 por células residentes teciduais (TASHIREVA *et al.*, 2017; COSMI *et al.*, 2014).

Dentro do contexto tumoral, o perfil Th1 é mais favorável à eliminação das células neoplásicas pois ele antagoniza a resposta Th2. O perfil antiinflamatório Th2 promove a progressão do tumor, estimulando condições favoráveis para o desenvolvimento tumoral, além de influenciar na transição epitelial-mesenquimal, e na metástase das células tumorais (RUFFELL, AFFARA E COUSSENS, 2012; COSMI *et al.*, 2014).

2.4.1 Imunomodulação

Os imunomoduladores são moléculas que influenciam na comunicação das células do sistema imunológico. Eles podem ser utilizados como imunoestimulantes, imunossupressores e imunopolarizadores (HAFIDH *et al.*, 2012). A busca de imunomoduladores, principalmente agentes imunoestimulantes, vem crescendo nos últimos anos (MOHAMED, JANTAN E HAQUE, 2017).

A imunomodulação pode ser definida como o conjunto de modificações que aumentam ou diminuem a atuação do sistema imunológico. Os imunoestimuladores são os candidatos mais promissores para uso pois eles podem atuar estimulando o sistema imunológico a eliminar as células neoplásicas. Estes podem ser

classificados quanto a sua especificidade. Os específicos irão fornecer um antígeno que irá estimular o sistema imunológico, enquanto os inespecíficos aumentam as respostas imunes sem especificidade antigênica. Essas moléculas podem ser tanto de origem sintética como de origem natural (SHRESTHA; CLAIR; NEILL, 2014).

A imunoterapia vem se tornando um método promissor no tratamento auxiliar dos pacientes com câncer. O objetivo deste tipo de abordagem terapêutica é tornar o microambiente tumoral, que é imunossuprimido, em um ambiente atuante na eliminação das células tumorais (ZEIDNER et al., 2020). Existem, atualmente, diversos protocolos, como por exemplo, o uso de anticorpos contra CTLA-4, PD1 e PD-L1. Essas moléculas, que são expressas nas células imunes, inibem a ativação do sistema imunológico, elas atuam ligam e desligando o sistema imunológico. As células tumorais expressam essas proteínas e, assim, impedem que os linfócitos T efetores eliminem as células neoplásicas (SMYTH et al., 2016).

Outra alternativa promissora é o uso de indutores de receptores do tipo Toll TLR,(em inglês, toll like receptors). Esses receptores estão ligados ao reconhecimento e eliminação de bactérias e fungos que estimulam o sistema imunológico a eliminar células tumorais. O imiquimod, uma imidazoquinolina, é um agonista do TLR7/8, aprovado pelo FDA, utilizado como um creme dérmico no tratamento de verrugas genitais externas causadas por HPV, carcinoma de células basais superficiais e queratose actínica. Atualmente, o imiquimod vem sendo estudado em mais de 100 ensaios clínicos, utilizado isolado ou em combinação com os tratamentos clássicos. Outra imidazoquinolina promissora é a 3M-052. Ela vem sendo avaliada como adjuvante em modelos de vacinas e mostrou atividade promissora em modelos de tumor de melanona e próstata em ensaios pré-clínicos (LOCY et al., 2018).

2.5 ESTRATÉGIAS DE TRATAMENTO DO CÂNCER

Atualmente as estratégias para o tratamento dos pacientes com câncer são primeiramente a cirurgia, posteriormente ou em associação com a cirurgia temos a radioterapia, quimioterapia, hormônio terapia e a imunoterapia. A quimioterapia geralmente é utilizada antes ou depois da cirurgia, ela geralmente é utilizada na maioria dos pacientes. No entanto a quimioterapia possui muitos efeitos colaterais além do desenvolvimento de resistência ao tratamento, desta forma a busca para

encontrar novos tratamentos se faz tão necessárias(WANG; LEI; HAN, 2018; CASTRO SANT' ANNA et al., 2018).

A tentativa de buscar entender melhor o desenvolvimento tumoral desde seus estagios iniciais até os estágios finais progrediu nos últimos anos. A compreensão do câncer é bem mais complexa e envolve a existência de peculiaridades de cada tumor bem como da individualidade de resposta aos tratamentos disponíveis. No entanto, a medicina personalizada ainda é uma realidade distante. Além disso, o número de novos casos e a alta morbidade causada por essa doença aumentam ano após ano consideravelmente. É inegável que o desenvolvimento tecnológico no campo do tratamento antineoplásico tenha evoluído bastante. Atualmente, os medicamentos são mais eficazes contra a maioria dos cânceres, no entanto, ainda se faz necessário a pesquisa e o desenvolvimento de novos quimioterápicos(MOULD e HUTSON, 2017; ARIAS, 2011).

Os quimioterápicos são amplamente utilizados tanto um único agente, em raras exceções, bem como esquemas terapêuticos de três ou mais drogas. A maioria dos agentes quimioterápicos não age exclusivamente em células neoplásicas, mas também em células em divisão, acarretando inúmeros efeitos colaterais sistêmicos. Eles podem ter graus variados de toxicidade dependendo de fatores como o tempo de exposição ao medicamento, a idade, estado físico do paciente, entre outros (RÜHLE et al., 2018). Dessa forma, é um desafio constante a busca de medicamentos mais eficazes e menos tóxicos para o tratamento do câncer (WITZ, 2009).

O tratamento escolhido irá depender do tipo e do subtipo do câncer e é baseado em procedimentos como a quimioterapia, radioterapia, cirurgia e terapia hormonal. A escolha dependerá ainda da origem tumoral, localização, extensão e das características individuais de cada paciente. A quimioterapia disponível atualmente acarreta inúmeras reações adversas, pois atinge células normais que se renovam constantemente como as células da medula óssea, de pelos e da mucosa digestiva. Podendo causar também muitos efeitos tóxicos como mielossupressão, aplasia medular, náuseas, vômitos, entre outros (OLVER et al., 2018; FERDINANDI E FERREIRA, 2009).

A quimioterapia começou em 1940 e, desde então, muitos quimioterápicos foram introduzidos na rotina. Dentre eles se destacam os alquilantes, os antimetabólitos, os inibidores da topoisomerase, os inibidores de microtúbulos e antibióticos antitumorais. Como uma dada concentração de um agente

quimioterapêutico mata uma porcentagem constante de células em uma população, a maioria dos regimes de quimioterapia inclui ciclos repetidos para diminuir continuamente a massa tumoral (RÜHLE et al., 2018).

A maioria dos antitumorais disponíveis atua através da sua interação com proteínas da divisão celular e/ou com o DNA diretamente. Na quimioterapia atual do câncer, tanto a resistência aos medicamentos bem como seus efeitos colaterais levam à contínua procura de novos compostos antineoplásicos (MILLS, KOLB E SAMPSON, 2018; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ et al., 2011).

Outros tratamentos disponíveis para os pacientes com câncer são as cirurgias, a radioterapia, a terapia hormonal, a imunoterapia e o transplante de células tronco, geralmente associados à quimioterapia. O tratamento cirúrgico, quando pode ser utilizado, dependerá da extensão do tumor e do tecido acometido, podendo ter característica paliativa ou curativa. Quando é possível, a cirurgia é utilizada para retirar as células tumorais e regiões adjacentes, como a margem de segurança livre da doença, visando impedir sua propagação regional (INCA, 2011; WANG; LEI; HAN, 2018).

Já a radioterapia, geralmente utilizada em combinação com a quimioterapia e ou a cirurgia, altera ou danifica a molécula de DNA e assim induz a morte das células tumorais. A imunoterapia usa geralmente anticorpos monoclonais para induzir o sistema imune a identificar e eliminar células tumorais. A hormonioterapia é utilizada para inibir o crescimento tumoral, sendo os agentes mais utilizados: dietilestilbestrol (estrogênio), tamoxifeno (antiestrogênio), megestro (progestogênio), dexametasona e prednisona (adrenocortocosteróide) e anastrozol (inibidor dos adrenocortocosteróides). Existe também o transplante de células tronco que é utilizado para o tratamento de leucemias fazendo com que o paciente receba uma medula normal transplantada de um doador saudável e compatível (BAUDINO, 2015; ANDRADE e SILVA, 2007; INCA, 2011).

2.6 DESENVOLVIMENTO E PROSPECÇÃO DE NOVOS FÁRMACOS

A busca por novos agentes que possam ser utilizados como novos quimioterápicos é relevante, principalmente para aos pacientes que não respondem aos tratamentos disponíveis. Assim, o desenvolvimento de novos agentes mais seletivos e eficientes para os diferentes tipos de tumores é de fundamental importância (BARROS et al., 2012). A resistência aos tratamentos disponíveis é um

dos principais obstáculos para o desenvolvimento de novos tratamentos eficazes contra o câncer. Este é o principal fator que leva ao aumento do número de falhas em ensaios clínicos (HAJJI et al., 2018).

A resistência pode ser classificada em adquirida e intrínseca. A resistência adquirida existe quando as células tumorais desenvolvem mecanismos moleculares de resistência a determinados quimioterápicos. Já a resistência intrínseca se dá por fatores que tornam a célula insensível ao tratamento, sem uma sensibilização prévia com o quimioterápico. Deve-se levar em consideração também que dentro de um mesmo tumor são encontradas uma diversidade celular e uma alta heterogeneidade molecular. Desta forma, o tratamento pode selecionar células resistentes ao quimioterápico de outras subpopulações menos resistentes ao tratamento que estava presente no tumor original (FOO e MICHOR, 2014; PATHANIA et al., 2018).

2.6.1 Moléculas privilegiadas

Moléculas privilegiadas podem ser definidas como estruturas moleculares que possuem propriedades de ligação versáteis, de tal modo que um único grupo farmacofórico é capaz de se ligar potente e seletivamente a uma série de alvos biológicos. Assim, os análogos surgem da modificação e adição de diferentes grupos funcionais na estrutura daquela molécula. Outra característica importante é que estruturas privilegiadas exibem tipicamente boas propriedades farmacológicas semelhantes às drogas conhecidas o que, por sua vez, eleva ainda mais a possibilidade análogos (SHAVETA; MISHRA; SINGH, 2016; SONG et al., 2014).

A investigação de moléculas privilegiadas com promissora atividade antineoplásica é uma estratégia inicial para encontrar quimiotipos estruturalmente novos modificando sua estrutura central ou grupos laterais. Geralmente são utilizados grupos farmacofóricos com atividade conhecida dando origem a novos análogos estruturais (WAN et al., 2019; SONG et al., 2014).

É notável que o grupofarmacofórico contribui diretamente para a bioatividade da molécula e as suas vias de interações moleculares diretamente ou indiretamente influenciam sua interação com os alvos. Frequentemente, as moléculas privilegiadas são inspiradas ou derivadas de produtos naturais. Exemplos desses grupos farmacofóricos conhecidos, estruturas moleculares consideradas altamente reativas, são os grupamentos: indóis, quinolinas, cumarinas, isoxazolidinas, benzimidazóis, tiazolopirimidinas e arilaminopirazo l (SCHNEIDER; SCHNEIDER, 2017).

2.6.1.1 Ftalimidas

As ftalimidas possuem o grupo farmacofóricoftalimídico e são reportadas na literatura por diversas atividades biológicas como antiinflamatória(ZAHRAN et al., 2014), leishmanicida(ALIANÇA et al., 2017), antitumoral (ZAHRAN et al., 2018), analgésica(ALANAZI et al., 2015), anticonvulsivante (KAMIŃSKI et al., 2011), antituberculose(AKGÜN et al., 2012) e hipolipêmica(ABDEL-AZIZ et al., 2011).

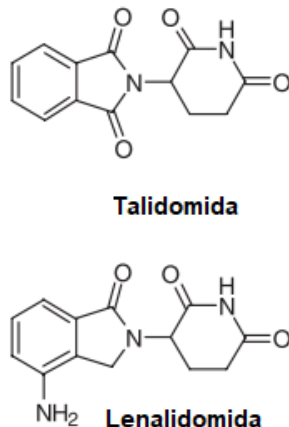
A talidomina é um derivado ftalimídico que foi utilizado como medicamento sedativo na década de 50. Ele foi retirado do mercado devido seus efeitos colaterais, sendo o mais pronunciado a ação teratogênica de um dos seus isômeros (AIDA et al., 2017).Estudos de relação estrutura-atividade (SARs) utilizando análogos e metabólitos da talidomida vêm demonstrando que a ftalimida é um fragmento farmacofórico fundamental para atividade das moléculas que possuem esse grupo. Desta forma, ele tem sido empregado no planejamento de potenciais candidatos a fármacos. Essa perspectiva promissora tem demonstrado que utilizar ftalimida como um fragmento farmacológico é uma estratégia interessante dentro da Química Medicinal na hibridização de moléculas(ZAHRAN et al., 2014).

Os análogos ftalimidos possuem atividade no tratamento do lúpus eritematoso sistêmico refratário, nas mielodisplasias e no mieloma múltiplo (WINTER et al., 2015). A talidomida e seus derivados, coletivamente referidos como drogas imunomoduladoras (lenalidomida, polidomida, entre outros), são inibidores eficazes da inflamação via inibição da produção de TNF induzida por TLR-4 (MILLRINE et al., 2016).Além de exibir efeitos antiangiogênicos e antiinflamatórios, a talidomida modula a resposta imune regulando moléculas chaves no processo inflamatório como: o fator nuclear-kB (NF- kB), citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , IL-6 (interleucina -6), IL-10 (interleucina- 10), IL-12 (interleucina- 12) e a ciclooxigenase 2 (KIM et al., 2017).

A lenalidomida,cujo nome comercial é o Revlimid®, outro derivado ftalimidicoé um medicamento imunomodulador que é utilizado para o tratamento de mieloma múltiplo, linfomas e leucemia crônica linfocítica(KIM et al., 2017). Ela também é utilizada em pacientes com doenças autoimunes, como por exemplo no tratamento do lúpus eritematoso sistêmico em pacientes refratários para outro medicamentos (WINTER et al., 2015). Essa molécula foi desenvolvida para tentar maximizar as propriedades anti-inflamatórias e antineoplásicas da talidomida além de reduzir a sua toxicidade. A Lenalidomida, é o principal fármaco entre os compostos

imunomoduladores derivados da talidomida (figura 8). Sua ação terapêutica se dá por diversos mecanismos de ação: antiinflamatórios, imunomoduladores, antiproliferativos e antiangiogênicos(CARDOSO et al., 2015a).

Figura 7- Estrutura química da lenalidomida e da talidomida.



Fonte: Adaptado de (ARMOIRY; AULAGNER; FACON, 2008).

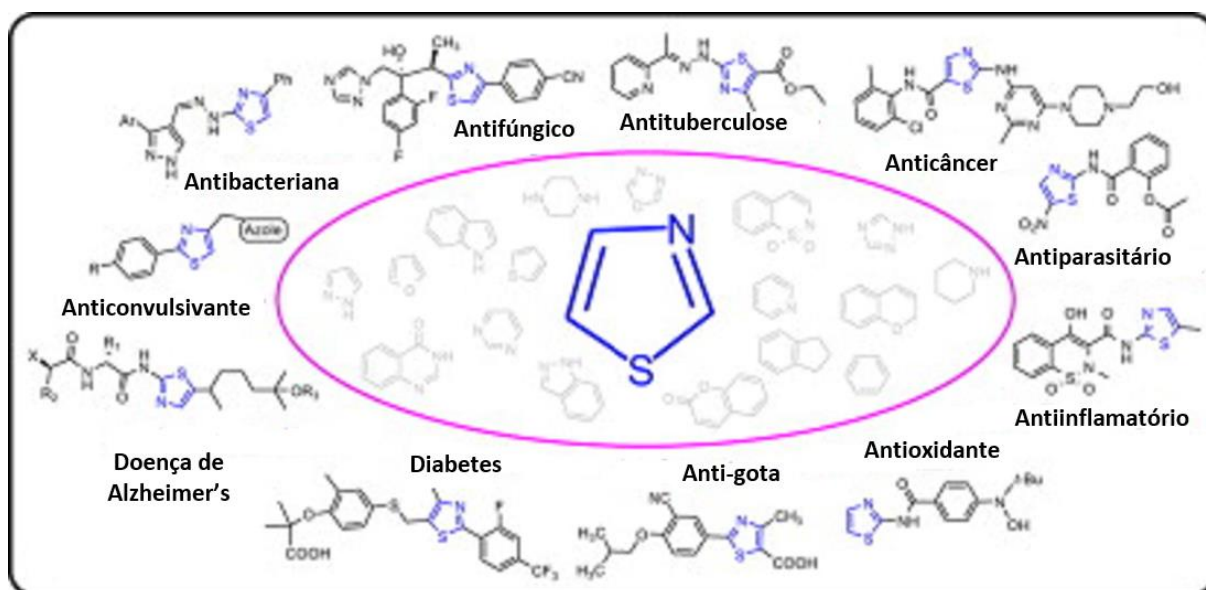
Este análogo da talidomida foi identificado anteriormente por sua capacidade de inibição da produção da citocina TNF (fator de necrose tumoral), do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e da produção do fator de crescimento de fibroblastos, além de induzir o aumento de IL-2 e INF- γ (ARMOIRY; AULAGNER; FACON, 2008; LAGRUE et al., 2015). Cranes e colaboradores (2005), em ensaios *in vitro* com células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), demonstraram que a lenalidomida possui uma potência de 50 a 2000 vezes maior na inibição da produção de citocinas estimuladas por LPS (lipopolissacarídeo), tais como TNF- α , IL-1b ou IL-6.

A lenalidomida possui mecanismo de ação dual, atuando tanto por efeitos citotóxicos diretos contra células tumorais como por influenciar o microambiente do tumor através da imunomodulação das células T e das células natural killer (NK). A lenalidomida induz a formação de sinapses imunológicas entre as células tumorais e as células T citotóxicas favorecendo assim a liberação de Granzima B induzindo a morte das células tumorais. Desta forma o grupo farmacológico se mostra promissor na busca de novos agentes quimioterápicos(HAGNER et al., 2017; SOLOMON, BATISTA e DEKOTER, 2017).

2.6.1.2 Tiazol

O núcleo tiazol é um heterociclo presente em diversas moléculas de ocorrência natural ou sintética. Esse anel é considerado um *building-block*, que é um grupo base para a construção de novas moléculas, pela sua versatilidade. Muitos medicamentos disponíveis atualmente no mercado possuem esse arcabouço. Exemplos deste grupo são: a tiazofurina e dasatinibe (agentes antineoplásicos), ritonavir (fármaco anti-HIV), ravuconazol (agente antifúngico), nitazoxanida (agente antiparasitário), fanetizol, meloxicam e fentiazac (agentes antiinflamatórios), nizatidina (agente antiúlcero gênico) e tiametoxam (inseticida) (AYATI et al., 2015). Os compostos tiazóis têm ampla aplicação e atividade biológicas atribuídas a eles como pode ser observado na figura 9.

Figura 8 - Desenho esquemático com diversas moléculas que possuem o anel tiazol em sua estrutura e suas atividades farmacológicas. Fonte: Adaptado de Ayati et al., 2015.



Os compostos heterocíclicos, como o anel tiazol, são uma parte importante dos produtos químicos, pois eles possuem papel crucial nos sistemas biológicos. Além de possuírem diversas atividades biológicas, como foi citado anteriorente, são fortes candidatos a se tornarem novos fármacos (KAUR MANJAL et al., 2017).

Os mecanismos da atividade antitumoral dos derivados tiazóis são inúmeros e eles conseguem interagir com alvostumorais como a proteína tirosina fosfatase não membranosa (SHP-2), a fosfatase quinase JNK-1 (JSP-1), o fator de necrose

tumoral TNF e o integrador antiapoptótico Bcl-XL-BH3. Foi demonstrado que benzotiazólicos bloqueiam inibidores da amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH), a proteína Raf-1 quinase e proteína antiapoptótica Bcl-2 (HASSAN et al., 2012).

Têm sido reportados os efeitos dos anéis tiazóis sobre a inibição do crescimento e proliferação de células tumorais (GHORAB; AL-SAID, 2012). O Dasatinib é um fármaco antineoplásico que possui o grupo farmacofóricotiazol em sua estrutura. Este medicamento é indicado para tratamento de pacientes portadores de leucemia mielóide crônica e leucemia linfoblástica aguda que apresentem mutação no cromossomo Filadélfia. É, portanto, um inibidor da proteína quinase tumoral BCR/ABL (ZHENG et al., 2013a).

2.6.1.3 Tiazolidina-2-4-diona

A tiazolidina-2-4-diona também é um núcleo heterocíclico tiazol que possui um átomo de nitrogênio, dois átomos de oxigênio e átomos de carbono. A tiazolidina 2,4-diona é muito utilizada para a síntese de novas moléculas. Já foi relatado que esse grupo farmacofórico possui atividades como antidiabética (KAUR MANJAL et al., 2017), anticâncer (Rêgo et al., 2014; Chagas et al., 2017), antiinflamatório (BANSAL et al., 2019), antibacteriana (TROTSKO et al., 2018) e anti-mielanoma (FUJII et al., 2018).

As Tiazolidina-2-4-dionas (TZDs) são potentes agonistas da família de receptores PPARs (receptores ativados por proliferador de peroxissoma). Esses receptores induzem principalmente a transcrição de genes ligados ao metabolismo de glicose, lipídeos e balanço energético. Ademais, as TZDs atuam também inibindo a expressão de proteínas pró-inflmatorias como a ciclooxigenase 2 (COX-2) e a sintetase induzível óxido-nítrico (iNOs) (BANSAL et al., 2019).

Além da atividade antiinflamatória, esses derivados também possuem atividade antineoplásica. Eles podem atuar principalmente na inibição do crescimento tumoral e invasibilidade celular, além de induzir a morte celular via apoptose (CHAGAS et al., 2017). As TZDs podem agir de maneira dependente e independente dos PPARs. De maneira dependente, o PPAR- γ pode induzir a inibição de ciclinas dependentes de quinase (CDKs) na inibição da proliferação celular. De maneira independente, as TZDs podem aumentar a expressão Sirt1 (regulador silencioso de informações 1). A ativação desse sensor induz o aumento da proteína quinase ativada por AMP e do estresse do retículo endoplasmático,

levando à indução de morte celular por autofagia e apoptose. Assim esse derivado apresenta potencial para torna-se um novo agente quimioterápico (ASATI; MAHAPATRA; BHARTI, 2014).

2.6.1.4 Ftalimido-tiazol

As Ftalimido-tiazóis são moléculas que surgiram a partir da hibridização molecular, que é uma ferramenta da Química Medicinal utilizada para conceber diversas moléculas a partir da combinação de dois os mais grupos farmacofóricos. Desta forma, dá-se origem a uma única entidade química, a qual pode apresentar novas potenciais atividades biológicas, como por exemplo, antitumoral. Assim, foi desenvolvido novas moléculas que podem apresentar atividade biológica através da ligando de uma ou duas porções tiazóis ao anel ftalimídico (GUGGILAPU et al., 2017).

Os derivados ftalimido-tiazóis possuem efeitos farmacológicos já descritos como a inibição de bactérias (HASSANEEN et al., 2002) e protozoários (OLIVEIRA, de et al., 2018; ALIANÇA et al., 2017), além de ação antitumoral (KOK et al., 2008; OLIVEIRA CARDOSO, et al., 2015). Além disso existe o relato de inibição da produção de TNF por diversos derivados. Desta forma, esses derivados se apresentam como potenciais fármacos no tratamento de várias condições inflamatórias (SHARMA et al., 2010).

As moléculas que possuem o grupo ftalimida estão sendo cada vez mais estudadas não só como inibidores, mas também como indutoras da degradação de moléculas específicas. Uma estratégia de bloquear a ação de uma proteínas específica é estimular a degradação da mesma via proteassoma e alguns derivados ftalimidicos conseguem executar essa função (WINTER et al., 2015). Além disso, nos últimos anos vem se demonstrando diversos alvos de atuação de derivados conjugados com o grupo farmacofóricoftalimídico, sendo vistos como uma estratégia para a degradação em vez da inibição dos alvos. Outras moléculas que possuem esse grupo apresentam atividade na degradação das proteínas da família BET, proteínas Sirtuin 2, CDK 9, Smad 3 e BCR-ABL (LI et al., 2018).

Tendo em vista a necessidade de prospecção molecular de novas derivados menos tóxicos e mais potentes para o tratamento anticâncer e imunomodulatório, no presente trabalho investigamos o potencial de novos compostos tiazoftalimidicos in

vitro, bem como sua citotoxicidade in vitro como a toxicidade in vivo em camundongos Swiss.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

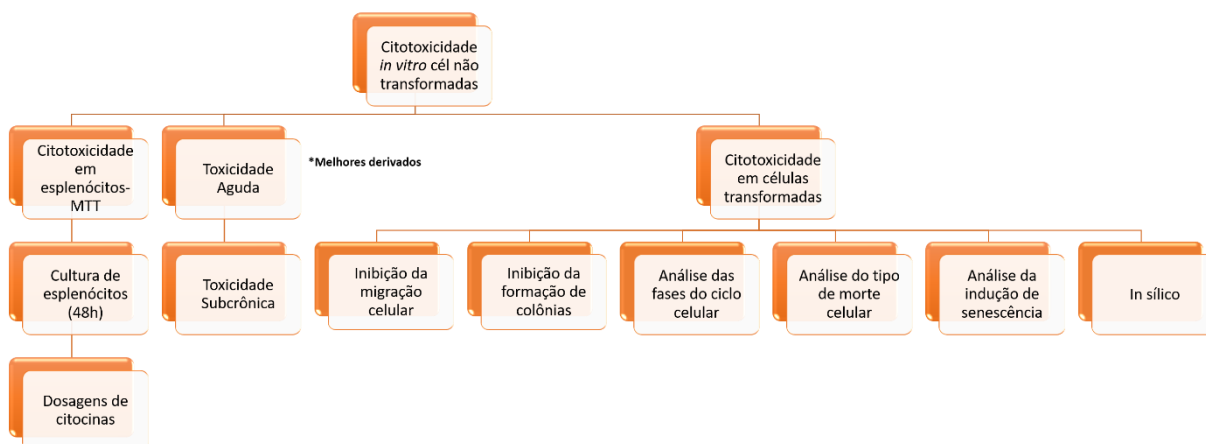
Avaliar a atividade antineoplásica, imunomoduladora e toxicidade aguda e subcrônica de novos derivados tiazolftalimidícos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Investigar a citotoxicidade dos derivados tiazolftalimidícos frente a células não transformadas;
- ✓ Avaliar a capacidade de inibição da formação de clones tumorais após tratamento com os derivados tiazolftalimidícos *in vitro*;
- ✓ Avaliar a capacidade de inibição da migração das células tumorais após o tratamento com os derivados ftalimidícos *in vitro*;
- ✓ Analisar o efeito do tratamento com derivadostiazolftalimidícos sobre o ciclo celular frente linhagens de câncer de próstata (Du-145 e PC-3) e pâncreas (panc-1 e Mia-Paca-2) *in vitro*.
- ✓ Avaliar a indução de morte celular após 48 horas de tratamento com os derivadostiazolftalimidícos frente linhagens de câncer de próstata e pâncreas.
- ✓ Avaliar a indução de clivagem de Parp em células de pâncreas (Panc-1) tratadas com o derivado tiazoftalimidíco FT-12.
- ✓ Identificar a influência imunomodulatória frente esplenócitos de Balb/C após 48 horas de tratamento com os novos derivados tiazoftalimidícos;
- ✓ Avaliar a toxicidade aguda e subcrônica em camundongos Swiss dos derivados tiazoftalimidícos AM1b e AM1f.
- ✓ Investigar *in silico* as possíveis interações moleculares do derivado FT-12 em células utilizando o *gene ontology*.

4 METODOLOGIA

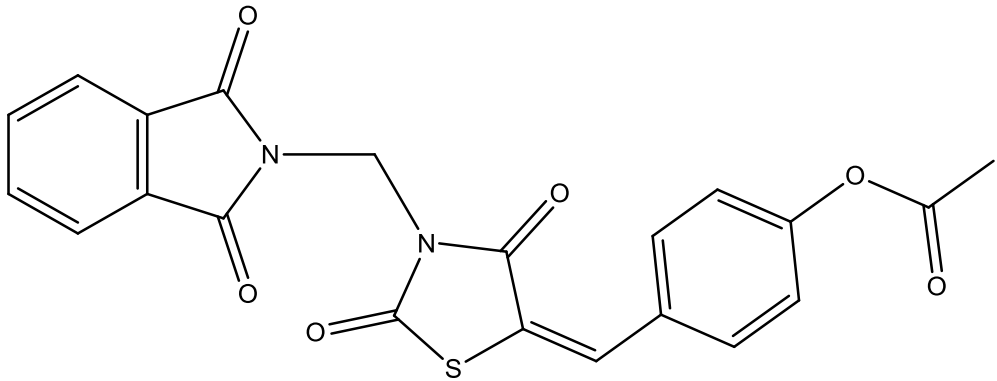
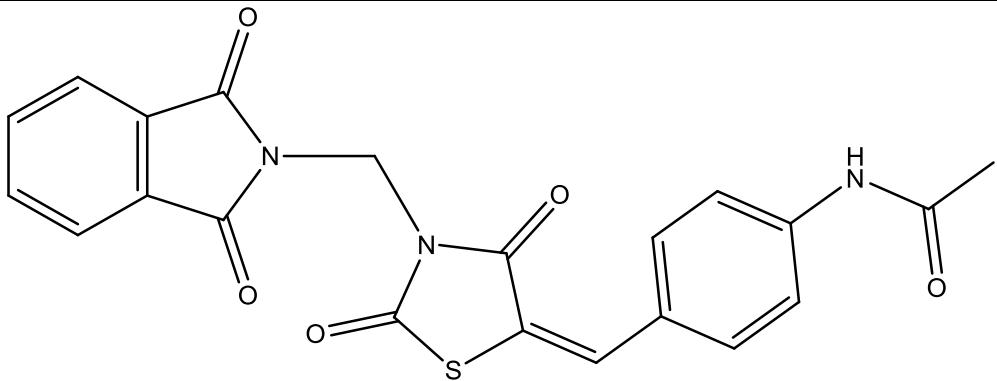
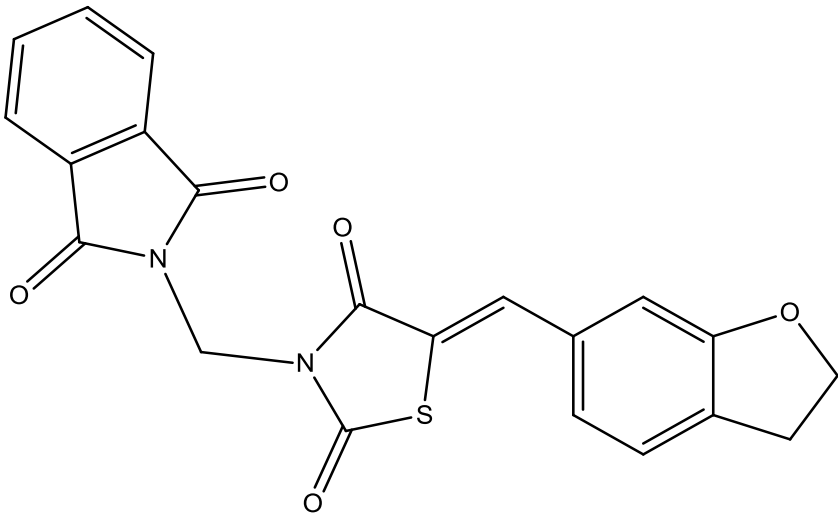
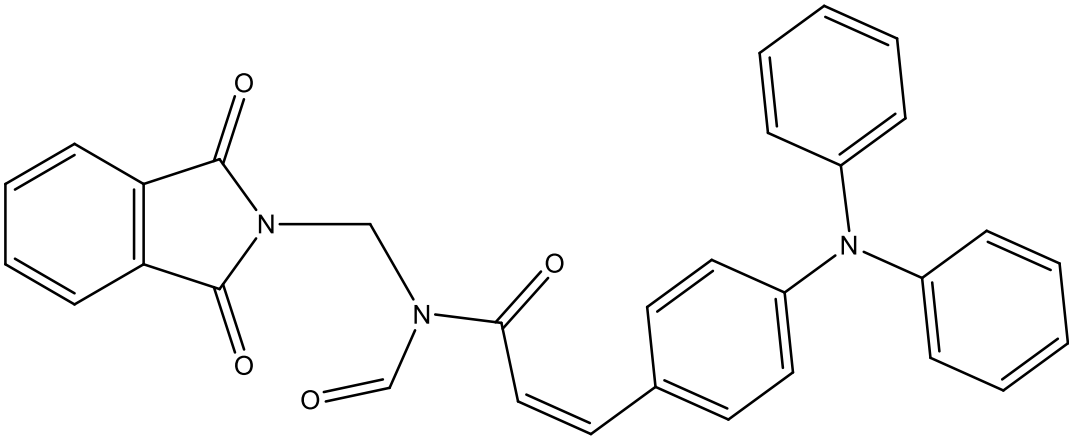
4.1 FLUXOGRAMA DOS ENSAIOS BIOLÓGICOS

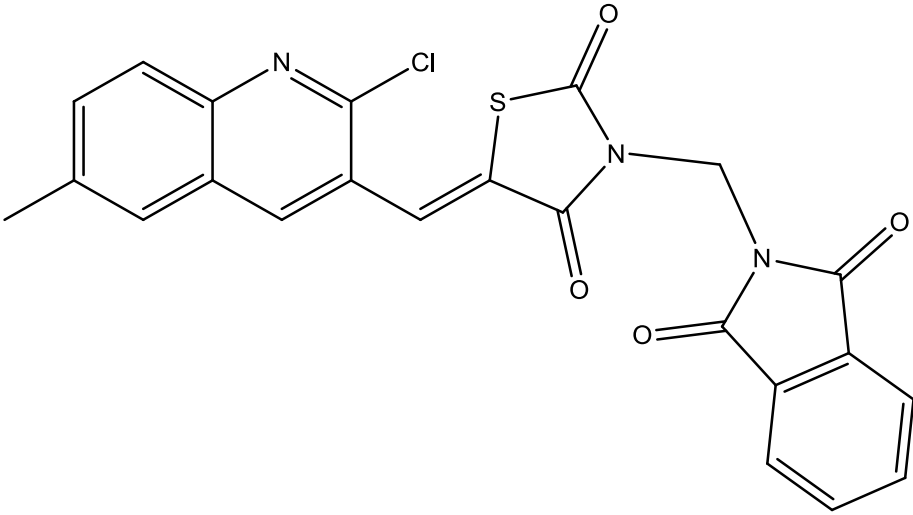
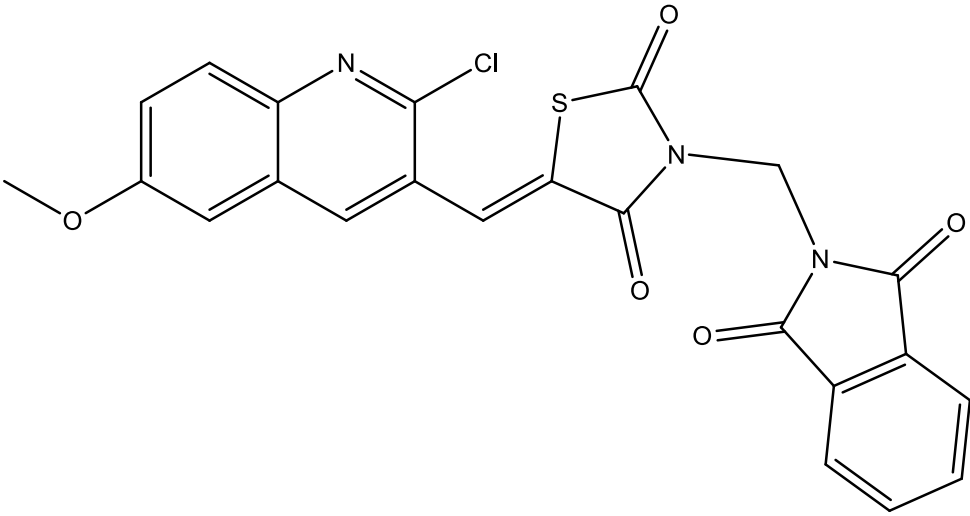
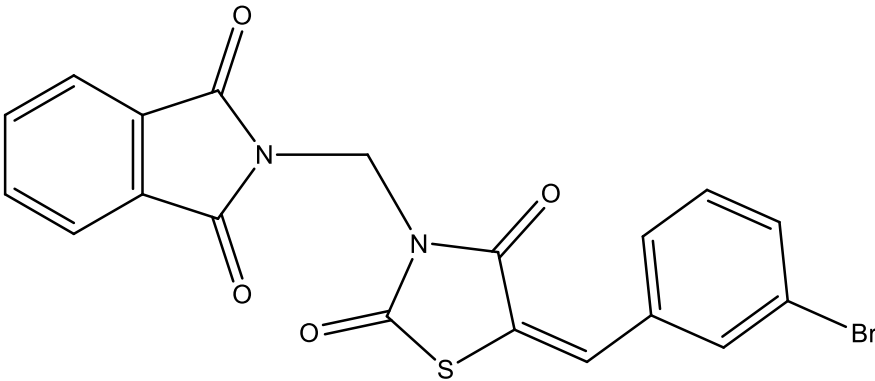
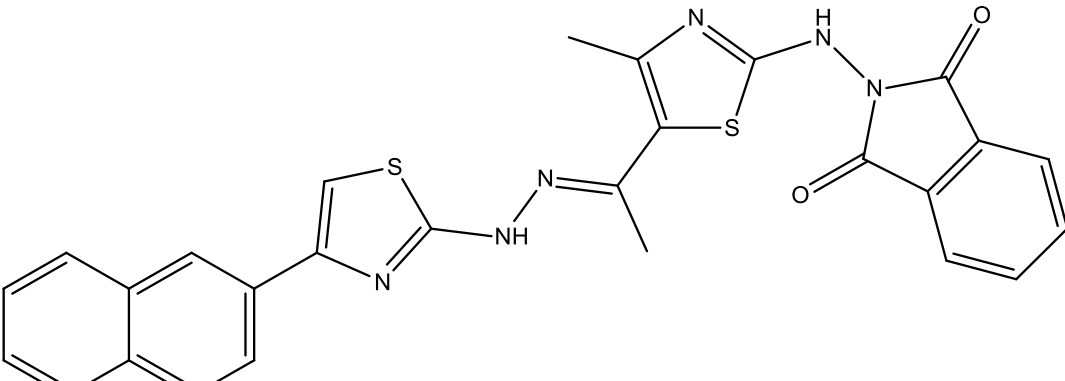


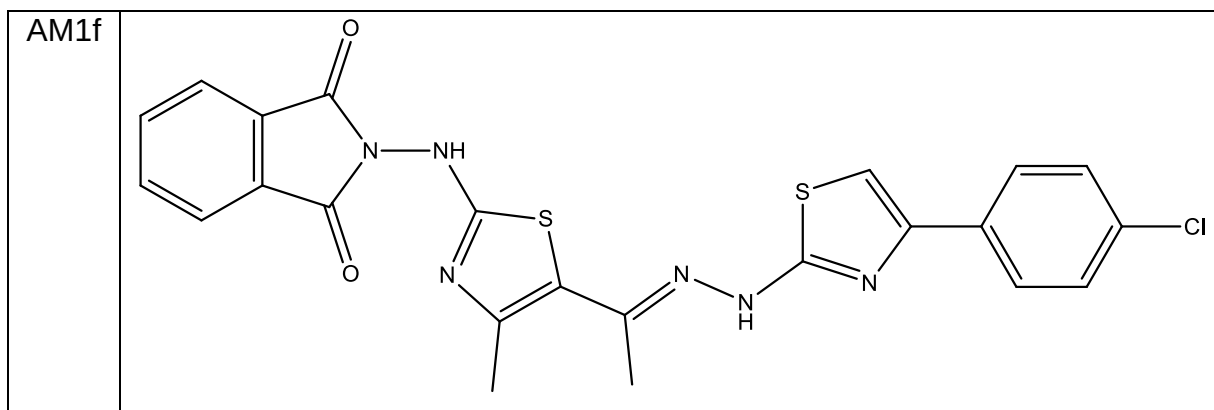
4.2. DERIVADOS TIAZOLFTALIMÍDICOS

Os derivados tiazolftalimidicos foram previamente sintetizados pelo Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF), na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Na tabela 1 pode ser observada a estrutura molecular dos derivados. As respectivas estruturas químicas foram previamente caracterizadas pela pesquisadora Dra Marina Galdino da Rocha Pitta. Já os derivados AM1b e AM1f, também derivados tiazolftalimidicos foram cedidos pela Professora Ana Cristina Lima Leite do Departamento de Farmácia, Laboratório de Planejamento em Química Medicinal- LPQM/UFPE. Todos os derivados foram diluídos em DMSO com concentração final, em todos os testes, incluindo os controles, de no máximo de 0,2%. Exceto para os ensaios *in vivo*, nos quais a concentração do DMSO foi de 2%.

Quadro 1- Estrutura molecular dos derivados tiazoftalimídicos.

FT-2	 <chem>CC(=O)Oc1ccc(cc1)/C=C2C(=O)N(CCN3C(=O)c4ccccc4C3=O)C2=O</chem>
FT-3	 <chem>CC(=O)Nc1ccc(cc1)/C=C2C(=O)N(CCN3C(=O)c4ccccc4C3=O)C2=O</chem>
FT-4	 <chem>O=C1C(=O)N(CCN2C(=O)c3ccccc3C2=O)C(=O)C1=Cc4ccc5c(c4)OCO5</chem>
FT-6	 <chem>c1ccc(cc1)N(c2ccccc2)Cc3ccc(cc3)/C=C4C(=O)N(CCN5C(=O)c6ccccc6C5=O)C(=O)C4=O</chem>

FT-12	 <chem>CC1=CC=C2C(=C1)N=C(Cl)C=C2C/C=C3\SC(=O)N(C3)CCN4C(=O)c5ccccc5C4=O</chem>
FT-13	 <chem>COc1ccc2c(c1)N=C(Cl)C=C2C/C=C3\SC(=O)N(C3)CCN4C(=O)c5ccccc5C4=O</chem>
FT-18	 <chem>O=C1C(=O)N(C1)CCN2C(=O)SC(C2)/C=C/c3cc(Br)ccc3</chem>
AM1b	 <chem>CC1=CC=C2C(=C1)C(=CN=C2S1C(=N)N=C1N)N=C(C)C(=N)N2C(=O)c3ccccc3C2=O</chem>



4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA

4.3.1 Obtenção e Citotoxicidade em Células Não Transformadas

Células mononucleares de sangue periférico (PBMC, do inglês Peripheralblood mononuclear cells) foram obtidas de doadores saudáveis com idade entre 20 a 40 anos de ambos os sexos. As PBMCs foram isoladas através de método padrão de centrifugação por gradiente de densidade com Ficoll-Hypaque (GE Healthcare). As células foram contadas em Câmara de Neubauer, e a viabilidade foi determinada pelo método de exclusão utilizando o corante vital azul de tripan. Os ensaios foram realizados apenas quando a viabilidade celular foi superior a 98%. Todos os doadores assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE em Seres Humanos - Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal de Pernambuco e aprovado sob o parecer nº 19491619.5.0000.5208 (Anexo 1). As células foram plaqueadas em placa de 96 poços (5×10^5 células/poço) e mantidas em estufa de atmosfera úmida a 37°C, com 5% de CO₂ durante a noite. Posteriormente os compostos foram adicionados (10 e 100 µM) e as placas incubadas por dois dias (48 horas). Após esse período, os procedimentos foram realizados como descritos no item 4.3.2.

4.3.2 Cultivo e manutenção de linhagens transformadas

Foram utilizadas as linhagens tumorais (Quadro 2) provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e acondicionadas no Banco de células tumorais do LINAT/UFPE. As células foram cultivadas de acordo com recomendações do

BRCJ e o meio foisuplementado com 10% de Soro Fetal Bovino, 10 mM de HEPES, bicarbonato de sódio e 10.000 U/mL de Penicilina/Estreptomicina e 0,25 µg/ml. Todas as linhagens foram mantidas em estufa úmida de CO₂ 5% a 37°C. A concentração de células para o ensaio do MTT segue a padronização do NHI (em inglês, *NationalCancerInstitute*).

Quadro 2– Linhagens tumorais utilizadas para avaliação da citotoxicidade celular dos derivados ftalimido-tiazol.Fonte: Adaptado de NIH, 2017.

Linhagem Tumoral	Nome	Densidade de Inoculação-MTT	Meio de Cultura
MOLT-4	Leucemia Linfoblastica Aguda	3 x 10 ⁴	RPMI-1640
K562	Leucemia Mieloide aguda	0,5 x 10 ⁴	RPMI-1640
HL-60	Linfoma Não - Hodgkin de Células B	4 x 10 ⁴	RPMI-1640
Du-145	Carcinoma de Próstata	1 x 10 ⁴	DMEMLow Glicose
PC-3	Carcinoma de Próstata	1 x 10 ⁴	F12
Sk-Mel-28	Melanoma	1 x 10 ⁴	DMEMLow Glicose
Panc-1	Carcinoma epiteloide de pâncreas	1 x 10 ⁴	DMEMLow Glicose
Mia Paca	Adenocarcinoma de pâncreas	1 x 10 ⁴	DMEMHigh Glicose

4.3.3 Ensaio de citotoxicidadedas células transformadas

As células neoplásicas foram plaqueadas nas concentrações de acordo com as recomendações do NIH (do inglês, *NationalCancerInstitute*), como pode ser observada no quadro 2. Os derivados tiazolftalimidicos foram adicionados nas concentrações de 1 a 100 µM. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo na concentração de 10 µM. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Após esse período foi adicionado 20 µl da solução de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio- 5 mg/mL), e as placas foram incubadas por 3 horas em estufa úmida a 5% de CO₂ a 37°C. Após 3 horas, adicionou-se 130µL de SDS (Lauril Sulfato de Sodio) a 20% para a dissolução dos cristais de formazan, guardando ao abrigo da luz por 24h. Após esse período, procedeu-se a leitura da densidade ótica em espectrofotômetro para microplacas (EL808 - Biotek®) em absorbância de 570 nm. Em todos os ensaios, foram incluídos controles não tratados, veículo de administração dos compostos (DMSO), e

doxorubicina.

4.3.3.1 Cálculo do Cl_{50}

As curvas dose-resposta dos compostos testados foram construídas com base nos resultados dos ensaios citotoxicidade tanto para células normais como para células tumorais. Através da fórmula: % viabilidade celular = $100 - (\text{média viabilidade célula tratada} - \text{média viabilidade branco}) \times 100 / (\text{média viabilidade DMSO} - \text{média viabilidade branco})$. Para a elaboração dos gráficos e cálculo da Cl_{50} , foram utilizados os programas GraphPad Prism versão 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) e Origin Pro 8 (Originlab Corporation, Northampton, MA, EUA), respectivamente.

4.3.4 Avaliação da inibição da migração celular

As células DU-145, PC-3, Panc-1 e Mia-paca-2 foram distribuídas numa densidade de 1×10^5 por poço em placas de 24 poços e incubadas à 37°C sob atmosfera de 5% de CO_2 por 24 horas. Após atingir a confluência de 90%, o meio foi aspirado e duas lavagens com PBS 1X foram realizadas, em seguida, foram feitas duas linhas de marcação (estrias) perpendiculares utilizando uma ponteira 200µl. Após o procedimento de marcação das estrias as células foram tratadas com meio completo, DMSO 0,1% (controle) e com os derivados FT-12 e AM1f na concentração do Cl_{50} . Os poços foram fotografados com 0, 6, 12 e 24 horas utilizando microscópio invertido (Leica, BZ). Os dados do ensaio de migração foram calculados utilizando as fotos para obter o tamanho da área final e da inicial do tamanho da estria feita com a ponteira. Para o cálculo da área utilizamos o programa ImageJ (Versão 1.49) (NIH, USA).

4.3.5 Avaliação da inibição de formação de novos clones

Foram plaqueadas 3×10^4 células de Du-145, PC-3, Panc-1 e Mia-paca-2 em placa de 24 poços. Após 24 horas as células foram tratadas com DMSO 0,1% (controle) e com os derivados FT-12 e AM1f na concentração do Cl_{50} durante 24 e 48 horas. Após o tratamento, as células foram tripsinizadas, contadas e aproximadamente 300 células foram plaqueadas em placas de 6 poços e mantidas em cultura até o aparecimento de clones. Depois de aproximadamente 14 dias, as

células foram fixadas com formaldeído 7%, coradas com cristal violeta 0,1%, lavadas com PBS 1x e mantidas a temperatura ambiente por 24 horas. Em seguida, foi realizada as fotos e a contagem dos clones e as análises estatísticas.

4.3.6 Avaliação da Inibição do Ciclo Celular

Após 24h de plaquemanto as células Du-145, PC-3, Panc-1 e Mia-paca-2 foram incubadas com os compostos AM1f, FT-12 e Doxorrubicina no CI_{50} . Após 48 horas, as células foram tripsinizadas e lavadas duas vezes com PBS 1x e fixado em álcool 70% por até 20 dias à $-20^{\circ}C$. Posteriormente as células foram marcadas com iodeto de propídio (5mg/mL) /RNase A (0,25mg/mL) por 15min ao abrigo da luz e feita a leitura pelo Citômetro de Fluxo Accuri C6 (BD).

4.3.7 Avaliação da indução de morte celular

A avaliação da apoptose ou necrose foi realizada através da dupla marcação com Anexina V-APC e Iodeto de Propídio (PI). Em alguns ensaios o marcador de necrose utilizado foi o composto 7-AAD que exibe propriedade semelhante ao do PI. As células foram distribuídas em placas de 6 poços com 5×10^5 células por poço e incubadas por 24h. Após esse período foi realizado o tratamento com a dose do CI_{50} e o dobro do CI_{50} para a linhagem de Du-145, PC-3, Panc-1 e Miapaca-2 com os derivados FT-12 e AM1F e o controle antitumoral Doxorrubicina durante 48 horas de incubação. Após esse período as células foram tripsinizadas e lavadas 2 vezes com tampão (10 mM HEPES/NaOH, 140 mM NaCl, 2.5 mM $CaCl_2$ -pH 7.4.). Em seguida as células foram marcadas com 2,5 μM iodeto de propídio (5mg/mL) ou 5 μM de 7-AAD e 5 μM de Anexina V-APC por 30min protegido da luz, seguida pela leitura no Citômetro de Fluxo Accuri C6 plus (BD).

4.3.8 Avaliação da clivagem de Parp

Foi realizada através da marcação com o anticorpo contra a fração de Parp-cliado conjugado a Ficoeritrina (PE). A avaliação da clivagem de parp é utilizada para quantificar a morte celular. As células Panc-1 foram distribuídas em placas de 6 poços com 5×10^5 células por poço e incubadas por 24h. Após esse período foi realizado o tratamento com a concentração do CI_{50} do derivado FT-12 e o controle

antitumoral Doxorubicina durante 48 horas de incubação. Após esse período as células foram tripsinizadas e lavadas 2 vezes com PBS 1x e fixadas e permeabilizadas com Citofix-citoperm BD. Elas foram incubadas por 20 minutos no gelo com essa solução. Após esse período as células foram lavadas com 1 ml Perm/Wash™(BD)duas vezes e incubadas com 5 µl do anticorpo Parp-clivado-PE durante 30 minutos. Posteriormente foram lavadas uma vez com 1 ml Perm/Wash™ e ressuspensas na mesma solução e em seguida foi realizada a leitura no Citômetro de Fluxo Accuri C6 plus.

4.3.9 Avaliação da indução de senescência celular

As células DU-145, Panc-1 e Mia-paca-2 foram plaqueadas em placas de 24 poços com 3×10^4 por poço e incubadas por 24h. Após esse período foi realizado o tratamento com a concentração do CI_{50} do derivado AM1f e o controle DMSO 0,1% durante 72 horas de incubação. Após esse período o meio foi aspirado e as células lavadas duas vezes com 1 ml de PBS 1X, e depois foi adicionado 300 µl por poço de solução de fixação e incubadas durante 7 minutos a temperatura ambiente após esse período as células foram lavadas 2 vezes com 1 ml de PBS 1X. Depois foi adicionada 300 µl da coloração, seguindo as normas do kit (Kit de coloração histoquímica de células de senescência- CS0030). As placas foram incubadas a 37°C sem CO₂ durante a noite. A marcação das células senescentes é o pH dependente. Posteriormente as células foram fotografadas utilizando o microscópio invertido (Leica, BZ).

4.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E SUB-CRONICA

4.4.1 Preparação do Composto

Os compostos AM1b e AM1f foram diluídos em DMSO puro e foi feita uma solução na concentração final de DMSO 2%.

4.4.2 Animais

Camundongos *Swiss* (linhagem *Mus musculus*) adultos, de ambos os sexos (fêmeas nulíparas e não grávidas), foram divididos aleatoriamente em grupos controle e teste para todas as avaliações.

Os animais foram mantidos no biotério do Centro de Ciências da Saúde da UFRN, sob condições controladas de iluminação (ciclo 12h claro/escuro) e de temperatura (23 ± 2 °C) recebendo ração comercial (Supralab® - Supra) e água *ad libitum* (CONCEA, 2015; MCTI, 2016). Os protocolos experimentais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética de Uso Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, sob número 087.008/2018. Foram utilizados 96 animais, distribuídos em grupos, como descritos em seguida.

4.4.3 Avaliação Toxicológica *in vivo*

4.4.3.1 Análise de Toxicidade Aguda

Uma avaliação prévia foi realizada, na qual foram utilizados 2 animais (fêmeas), que receberam duas doses dos derivados AM1b e Am1f (4 e 8 mg/Kg), sendo selecionada a dose máxima de 8mg/Kg, a qual não induziu os camundongos à morte. Após esta observação, o grupo teste (6 machos e 6 fêmeas) recebeu por gavagem a dose selecionada dos compostos e o grupo controle (6 machos e 6 fêmeas) recebeu o mesmo volume de solução DMSO 2% também por gavagem uma única vez. Todos os animais (testes e controles) foram observados cuidadosamente durante as primeiras 24 horas (pesquisa de sinais tóxicos imediatos) e diariamente durante o período de 14 dias (pesquisa de sinais tóxicos retardados agudos).

Ao final, todos foram anestesiados com tiopental 50mg/Kg associado a Lidocaína 2% 10 mg/Kg, e eutanasiados por deslocamento cervical, de acordo com as Normativas do CONCEA (2015). Amostras de sangue foram coletadas para análises hematológicas ou bioquímicas e órgãos selecionados (fígado, estômago, rins direito e esquerdo e baço) para avaliação macroscópica.

4.4.3.2 Análise de Toxicidade Subcrônica

Grupos testes (5 machos e 5 fêmeas) foram tratados por gavagem todos os dias durante um período de 30 dias com diferentes doses (2, 4 e 8 mg/Kg) dos derivados AM1b e Am1f, definidas pelo ensaio da toxicidade aguda. Os grupos controles (5 machos e 5 fêmeas) receberam o mesmo volume de solução DMSO 2% também por gavagem. O consumo de ração e água, assim como o peso corporal,

foram medidos três dias por semana. Durante o período experimental, todos os animais foram observados cuidadosamente e qualquer sinal de toxicidade foi avaliado.

Ao final, todos foram anestesiados com Tiopental 50mg/Kg associado a Lidocaína 2% 10 mg/Kg, e eutanasiados por deslocamento cervical, de acordo com as Normativas do CONCEA (2015). Amostras de sangue foram coletadas para análise hematológicas ou bioquímicas e órgãos selecionados (fígado, estômago, rins direito e esquerdo e baço), depois de observação macroscópica, foram retirados e processados para exame microscópico de rotina.

4.4.3.3 Avaliação hematológica

De todos os animais foram obtidas amostras sanguíneas por punção cardíaca, após a anestesia com Tiopental (Tiopentax®, Cristália) associado a Lidocaína 10 mg/Kg. Essas amostras foram homogeneizadas com proporções adequadas do anticoagulante EDTA 1% para a realização do hemograma. Foi utilizado o analisador hematológico automatizado ABX Micros ES60 (HORIBA ABX Diagnostics) para obter o número total de eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$), hematócrito (%), hemoglobina, contagem global de hemácias, leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$) e plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$), contagem diferencial de leucócitos (%), concentração de hemoglobina (g/dL) e determinação do hematócrito (%) e dos índices hematimétricos, tais como: volume corpuscular médio (VCM, fL), hemoglobina corpuscular média (HCM, pg) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM, %).

4.4.3.4 Avaliação bioquímica

As amostras sanguíneas foram centrifugadas (3000 rpm/10 min.) para obtenção dos soros, com os quais foram analisados o perfil lipídico, a glicemia, a função renal e a função hepática dos animais. O perfil lipídico foi avaliado a partir das dosagens de triglicerídeos (TG) e colesterol total (CT). A glicemia foi determinada para avaliar a influência causada pela administração do composto nos animais teste em comparação aos controles.

Para avaliar a função renal foram analisadas as concentrações séricas de creatinina e ureia, enquanto as análises das atividades das enzimas aspartato

aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) e proteínas totais (PT) avaliaram a função hepática, como também foi analisada a dosagem de albumina.

As determinações das concentrações séricas de glicose, CT e TG foram realizadas por ensaios enzimático-colorimétricos, enquanto as dosagens de AST, ALT, uréia e creatinina foram realizadas por ensaios enzimáticos. Todas as determinações utilizaram kits Labtest Diagnóstica apropriados ao analisador bioquímico automatizado LabmaxPlenno (Labtest Diagnóstica, Minas Gerais, Brasil) Após a eutanásia dos animais, foram retirados os seguintes órgãos fígado, estômago, baço, rins, pulmão e coração para a análise macroscópica e pesagem dos órgãos. Foi calculada a razão peso do órgão/peso total do animal.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNODULADORA

4.5.1 Avaliação da citotoxicidade em esplenócitos por MTT

O ensaio de citotoxicidade também foi realizado utilizando células provenientes do baço de camundongos Balb/c para verificar se os derivados eram citotóxicos frente a essas células. As células foram retiradas do baço de animais saudáveis com cerca de 45 dias após o desmame. O baço foi triturado para a obtenção das células. As células foram filtradas com auxílio de um filtro de 70µm para a retiradas dos grumos celulares e posteriormente lavadas com meio RPMI 1640. Foi realizado um pool de 3 camundongos para avaliação da viabilidade calculada depois da incubação com os derivados FT-2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13 e 18 nas concentrações de 1, 10 e 100 µM. As células foram plaqueadas (3×10^6) e incubadas durante 48 horas com os derivados. Posteriormente foi adicionado o MTT e após 3 horas o SDS e as placas foram incubadas durante 24 horas para completa solubilização dos cristais. Após esse período as placas foram lidas utilizando a leitora de placas BioTek no comprimento de 570 nm.

4.5.2 Cultura de esplenócitos

Os esplenócitos de camundongos BALB/c foram cultivados em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com L-Glutamina, 10% de Soro Bovino Fetal (Lonza), 10 mM de HEPES e 10.000 U/mL de Penicilina/Estreptomicina (Gibco) em estufa de

CO₂ 5% a 37°C. Os esplenócitos foram estimulados com Concanavalina A (100ng/ml) e posteriormente tratados com os derivados tiazolftalimídicos nas concentrações 1, 10 e 100 µM, para alguns derivados somente foram utilizados a concentração de 1 e 10 µM devido a sua citotoxicidade na dose de 100 µM. Após 48 horas de cultura, os sobrenanantes serão coletados e armazenados em freezer - 20°C para posterior dosagem de citocinas. A metilprednisolona foi utilizada na concentração de 100 µM como controle antiinflamatório.

4.5.3 Quantificação de citocinas por CBA

O Kit que utilizado foi adquirido da BD Biosciences, Kit BD™ CytometricBeadArray (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17, onde a curva padrão (standards) e amostras foram preparadas seguindo o protocolo descrito pelo fabricante para quantificação das citocinas IL17A, IFN-γ, IL2, IL-6, TNF-α, IL-4 e IL-10 em pg/ml. Foi utilizado 50 µL das amostras de sobrenadante de cada condição de cultura, foram analisadas as condições controle não tratado (controle negativo) e Metilprednesolona 100 µM (controle positivo) e as condições tratadas com os derivados avaliados. Posteriormente, foi adicionado em cada tubo, 50 µL do reagente de detecção composto pela ficoeritrina (PE) conjugado com anticorpos específicos e incubado por 3 horas a 25°C em ambiente com pouca luminosidade. Após incubação as amostras foram lavadas com o reagente Wash Buffer e centrifugadas a 200g por 5 minutos e ressuspensas em 300 µl de PBS 1x para aquisição no citômetro. A intensidade de fluorescência emitida pelo complexo “sanduiche” foi determinada pelo citômetro de fluxo BD™ Accuri C6. A análise da quantificação das citocinas testadas foi realizada pelo BD™ FCAP Array Software v3.0 seguindo instruções do fabricante. Os limites de detecção inferior foram IL-2 (0,1 pg/mL), IL-4 (0,03pg/mL), IL-6 (1,4pg/mL), IFN-γ (0,5pg/mL), TNF (0,9pg/mL), IL-17A (0,8pg/mL) e IL-10 (16,8pg/mL).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os cálculos de média, desvio padrão e viabilidade foram realizados utilizando o programa Excel. O CI₅₀ foi calculado a partir da média dos resultados da

viabilidade celular dos compostos com o auxílio do programa OriginPro8 (Originlab Corporation®, EUA).

Os resultados foram analisados por teste t (Student), Anova com pós teste de Bonferonin utilizando-se o programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software®, USA) considerado estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

5 Resultados

5.1 ARTIGO 1

SYNTHESIS, ANTINEOPLASTIC AND IMMUNOMODULATORY EFFECTS OF PHTHALIMIDO-THIAZOLIDINE-2-4-DIONA DERIVATIVES

Flaviana Alves dos Santos^{a*}; Marcel Almeida* Vitor Alfredo de S. Silva^a; MichellyCristinyPereira^a; Mariana Galdino da Rocha-Pitta^b; Maira Galdino da Rocha Pitta^a; Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo^{a#} Ivan da Rocha Pitta^{a,b}.

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

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

**Flaviana Alves Dos Santos and Marcel contributed equally to the writing of this article.*

#Corresponding author: Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

E-mail: moacyr.rego@gmail.com

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

Abstract: Cancer remains a disease with a high mortality, causing millions of deaths in the last decade. Chemotherapy still used for the most of tumors treatment, but side effects and drug resistance is a big challenge. New drugs with different targets need to be synthesized to improve cancer treatment. A series of novel phthalimido-thiazolidine-2-4-diona derivatives were synthesized and their in vitro anti-tumor and immunomodulatory activities against cancer cells were evaluated. Among these derivatives, compound FT-12 exhibited antiproliferative activity against Panc-1 and cells with CI_{50} values of 31.54 ± 1.33 and $71.92 \pm 1.31 \mu M$, respectively. Moreover, FT-12 caused irreversible cancer cell damage by inducing necrosis and apoptosis. In addition, these compounds, especially FT-3 and FT-6 regulated immune factors such as interleukin IL-10, IL-6, INF-g and IL-2 significantly. Overall, these studies suggested that compound FT-12, as the representative compound of those, might be a promising candidate for the treatment of pancreatic cancer and prostate and further studies should be done.

Keywords: Anticancer; Cell death; Immunomodulation;

1. Introduction

Cancer can be defined as a set of diseases that have in common disordered cell growth and invasion of adjacent and non-adjacent tissues and organs. This disease characterized by the uncontrolled cellular growth. Cancer is estimate 12 million deaths in 2030 from cancer worldwide and to continue rising and that they year by year(ZAHRAN et al., 2018). In Brazil according to the national cancer institute (INCA) it is estimated that will have around there will be approximately 600,000 new cases for 2018 2(INCA, 2019).

Number of cancer cases continues to rise, and much of this is due to the aging and growing population worldwide, along with a growing adoption of behaviors that favor the onset of cancer, such as lack of exercise and poor diet. Cancer is the leading cause of death in developed countries, and second cause of death in developing countries, after cardiovascular diseases (FERLAY et al., 2014).

Currently available treatments include surgery, chemotherapy, radiation, hormone, and immune therapy. Thus chemotherapeutic main method of treatment for cancer patients is diffuse systemic chemotherapy using cytostatic agents, which induce apoptosis and or inhibit cell cycle progression (RÜHLE et al., 2018). Majority of chemotherapeutic agents do not act exclusively on neoplastic cells, but on dividing cells, causing numerous systemic side effects that may have varying degrees of toxicity depending on factors such as drug exposure time, age, patient's physical state. Thus, the search for more effective and less toxic drugs for cancer treatment is a constant challenge(WITZ, 2009).

Immunomodulation is composed of agents that can both stimulate and inhibit the production of cytokines that mediate pathological processes(RICCIO; LAURITANO, 2020). Immunomodulators could be used as immunostimulants, immunosuppressants and immunopolarizers. Immunostimulators can be classified as specific or nonspecific. Specifics will provide an antigen and it will stimulate the immune system. Non-specific immunostimulators increase immune responses without antigen specificity. These molecules can be either synthetic or natural in origin. The immunosuppressants were suppress the immune system and immunopolarizers were polarize the response such as stimulating the release of anti-inflammatory cytokines of the th2 profile (RICCIO; LAURITANO, 2020)(SHRESTHA; CLAIR; NEILL, 2014).

Research for new cancer-treatment agents is an important area in both medicinal chemistry. Synthesis of new drugs is the combination of distinct pharmacophoric nuclei in a chemical entity, which is termed as molecular hybridization, one of the important strategies used by Medicinal Chemistry to obtain more powerful, effective and safer drugs (DA ROCHA PITTA et al., 2013). This strategy aims to link two or more pharmacophoric groups with biological activities already reported to give rise to a new chemical entity aiming at an increase in biological activity (CHAGAS et al., 2017) (OLIVEIRA, JAMERSON FERREIRA DE SILVA et al., 2015).

Pharmacophoric group contribute directly to the bioactivity of the molecule and its molecular pathways directly or indirectly. Pharmacophoric groups are used, with known activity giving rise to new structural analogues (SONG et al., 2014). Phthalimide pharmacophoric group have been reported in the literature for several biological activities such as anti-inflammatory activity (ZAHARAN et al., 2014), anti-inflammatory activity (ALIANÇA et al., 2017), anti-tumoral activity (ZAHARAN et al., 2018), analgesic (ALANAZI et al., 2015), anticonvulsant (KAMIŃSKI et al., 2011), antituberculosis (AKGÜN et al., 2012) and hypolipemic (ABDEL-AZIZ et al., 2011).

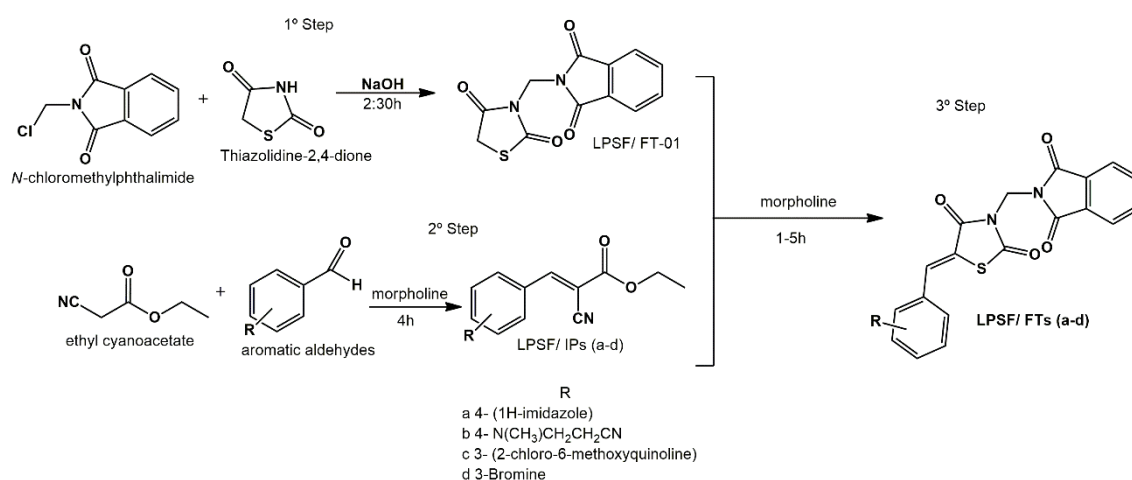
Thiazole nucleus is an important pharmacophore heterocycle present in several molecules and have significance to create privileged chemical structures possessing pharmacological activities. This ring is considered a building block for its versatility. Many drugs currently available in the market have this framework, such as thiazofurin and dasatinib (antineoplastic agents), ritonavir (anti-HIV drug), ravuconazole (antifungal agent), nitazoxanide (antiparasitic agent), phanethizole, meloxicam and fentiazac (anti-inflammatory agents), nizatidine (antiulcerogenic agent) and thiametoxam (insecticide) (AYATI et al., 2015).

Thus a scaffolds with possible biological activity were developed by linking the thiazole ring to the phthalimid ring (GUGGILAPU et al., 2017). Evaluation of new agents is necessary in order to find more selective and efficient treatments for different types of tumors (HAJJI et al., 2018).

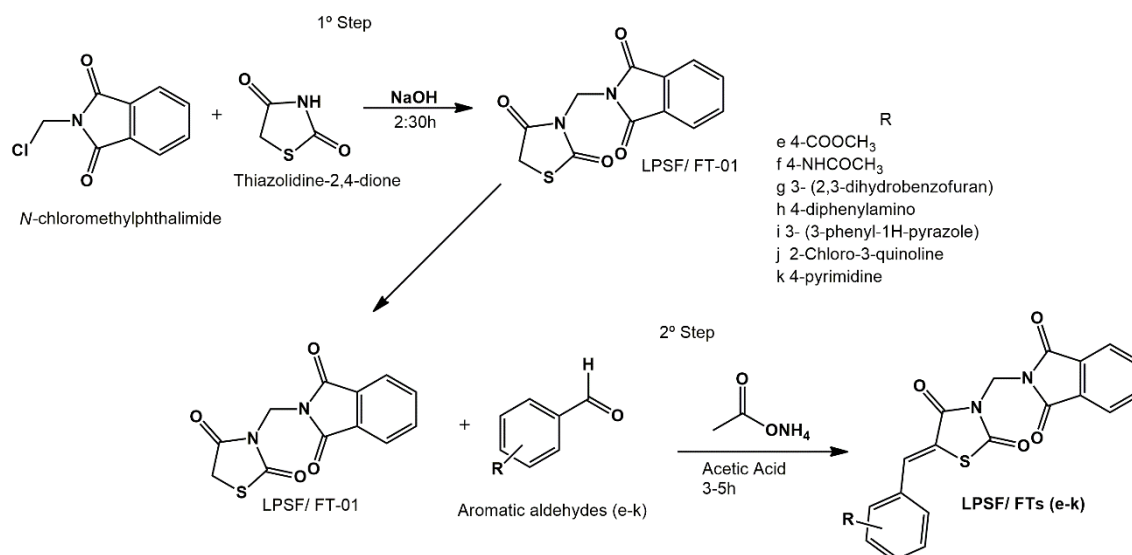
2. Methodology

2.1 Synthesis of derivatives

Synthesis of compounds LPSF/ FTs (a-d), scheme 1: In step 1, thiazolidine-2,4-dione is N-alkylated with N-chloromethylphthalimide at a temperature of 65 °C for 2 hours and 30 minutes, yielding intermediate 3-((1,3-dioxoisindolin-2-yl)methyl)thiazolidine-2,4-dione (LPSF / FT-01). In the second stage, LPSF / IPs (ethyl cyanoacetate esters) were formed from ethyl cyanoacetate with aromatic aldehydes using morpholine as catalyst. In the third step, both FT-01 and synthesized LPSF / IPs were placed to react in the presence of morpholine (catalyst) at a temperature of 65 °C, forming the final compounds (LPSF / FTs).



Synthesis of compounds LPSF/ FTs (e-k), scheme 2: The FT-1 compound synthesized in the first step is placed to react by condensation following the procedures of Harada et al. (2012), with the specific aldehyde (letters e-k of scheme 2) in the presence of ammonium acetate and acetic acid (solvent), at a temperature of 110 °C, which forms the final compounds (LPSF / FTs).



2.2 Chemistry

The structures of compounds LPSF/FTs synthesized were confirmed by spectroscopic techniques such as nuclear magnetic resonance (¹H NMR) model Varian 300 or 400 MHz, using solvent DMSO-*d*₆ and CDCl₃. The peaks of the RMN signals were designated s - singlet; d - doublet; t - triplet; m - multiplet. Melting points were determined in a capillary tube using Buchi, melting point M-565. Infrared spectra (IR) were recorded on a Prestige-21, Shimadzu model 01801. For Mass Spectra (MS), Bruker Daltonics, model auto flex III smart beam, was utilized.

Synthesis of 3-((1,3-dioxoisindolin-2-yl)methyl)thiazolidine-2,4-dione (LPSF/FT-01)

Initially, thiazolidine-2,4-dione (1.2 eq.) is solubilized with acetonitrile. Separately, NaOH (1.2 eq.) is after maceration, solubilized in methanol and acetonitrile. Then, the two products are placed to react for 30 minutes while stirring. Finally, *N*-chloromethylphthalimide (1 eq.) is added. The reaction takes place at 65 °C of temperature for about 2: 30h accompanied by thin layer chromatography (TLC). After the end of the reaction, the product is filtered, with the formed salt remaining in the paper. The liquid product is placed in the refrigerator, where it stays for about 72 hours to form the white crystals then filtered.

The product obtained was a white solid. Formula: C₁₂H₈N₂O₄S. Melting point (m.p.): 172 °C. Yield: 67 %. IR (KBr, cm⁻¹): 3005 (C-H), 1730 (C=O), 1676 (C=O), 1315 (C-N). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.88 (m, 4H, J = 20.7 Hz, ArH), 5.33 (s, 2H, -CH₂), 4.19 (s, 2H, -CH₂). MS m/z (%): 275.95, calculated 276.02.

Preparation of thiazophthalimide derivatives by addition reaction: General procedure 1 (LPSF/FTs) (a-d)

3-((1,3-dioxoisindolin-2-yl)methyl)thiazolidine-2,4-dione (FT-01) (1 eq.) is solubilized in the 250 ml flask with ethanol. Soon after, the specific IP reagent (1.2 eq.) for each reaction is added, while the reagents are stirring, morpholine (2 eq.) is added. The reaction proceeds for about 1 to 5 hours at a temperature of 65 °C accompanied by CCD. The time varies slightly depending on the IPs. Finally, the product is filtered and washed with ethanol.

5-(4-(1H-imidazol-1-yl)benzylidene)-3-((1,3-dioxoisindolin-2-yl)methyl)thiazolidine-2,4-dione (LPSF/FT-07) ()

Yellow solid. $C_{22}H_{14}N_4O_4S$. m.p.: 263 °C. Yield: 44 %. IR (KBr, cm^{-1}): 3136 (C-H), 1732 (C=O), 1598 (C=C), 1320 (C-N), 724 (C-H). 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 8,39 (s, 1H, -CH), 7,89 (m, 8H, J= 42,3 Hz, ArH), 7,74 (d, 2H, J= 8,1 Hz, ArH), 7,14 (s, 1H, ArH), 5,51 (s, 2H, -CH₂). MS m/z (%): (M+H)⁺ 431.03, calculated 430.07.

3-((4-((3-((1,3-dioxoisindolin-2-yl)methyl)-2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl)(methyl)amino) propanenitrile (LPSF/FT-08) ()

Orange solid. $C_{23}H_{18}N_4O_4S$. m.p.: 241 °C. Yield: 61 %. IR (KBr, cm^{-1}): 2917 (C-H), 2248 (-CN), 1721 (C=O), 1582 (C=C), 1319 (C-N). 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 7,88 (m, 5H, J= 34,2 Hz, FtH), 7,45 (d, 2H, J= 9,6 Hz, ArH), 6,91 (d, 2H, J= 9,3 Hz, ArH), 5,48 (s, 2H, -CH₂), 3,77 (t, 2H, J= 13,5 Hz, CH₂), 3,04 (s, 3H, CH₃), 2,76 (t, 2H, J= 12,9 Hz, CH₂). MS m/z (%): 446.07, calculated 446.1.

5-((2-chloro-6-methoxyquinolin-3-yl)methylene)-3-((1,3-dioxoisindolin-2-yl)methyl)thiazolidine-2,4-dione (LPSF/FT-13) ()

Yellow solid. $C_{23}H_{14}ClN_3O_5S$. m.p.: 316.8 °C. Yield: 22,5 %. IR (KBr, cm^{-1}): 3043 (C-H), 1746 (C=O), 1621 (C=C), 1232 (C-O), 717 (C-H). 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 8,30 (s, 1H, ArH), 8,13 (s, 1H, CH), 7,91 (m, 3H, J= 12 Hz, j= 2,4 Hz, ArH), 7,77 (m, 2H, J= 6,3 Hz, 2,4 Hz, ArH), 7,44 (d, 1H, J= 8,7 Hz, j= 4,5 Hz, ArH), 7,09 (d, 1H, J= 2,1 Hz, ArH), 5,70 (s, 2H, CH₂), 3,95 (s, 3H, CH₃). MS m/z (%): 479.90, calculated 479.03.

5-(3-bromobenzylidene)-3-((1,3-dioxoisindolin-2-yl)methyl)thiazolidine-2,4-dione (LPSF/FT-18) ()

White solid. $C_{19}H_{11}BrN_2O_4S$. m.p.: 210 °C. Yield: 68 %. IR (KBr, cm^{-1}): 3088 (C-H), 1748 (C=O), 1602 (C=C), 1313 (C-N), 723 (C-H). 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 7,89 (m, 2H, J= 8,4 Hz, ArH), 7,82 (s, 1H, CH), 7,75 (m, 2H, J= 8 Hz, ArH), 7,61 (t, 1H, J= 3,6 Hz, ArH), 7,55 (dt, 1H, J= 11,2 Hz, ArH), 7,41 (d, 1H, J= 8,4 Hz, ArH), 7,34 (t, 1H, J= 16 Hz, ArH), 5,67 (s, 2H, CH₂). MS m/z (%): (M+H)⁺ 442.9, calculated 441.96.

Preparation of ofthiazophthalimide derivatives by condensation reaction: General procedure 2 (LPSF/FTs) (e-k)

3-((1,3-dioxoisindolin-2-yl)methyl)thiazolidine-2,4-dione (FT-01) (1 eq.) is solubilized in the 250 ml flask with glacial acetic acid (about 4 ml for each 1 mmol of FT-01). Then, the specific aldehyde (1.2 eq.) and ammonium acetate (2 eq.) are added. The flask is heated to 110 ° C in temperature, the reaction is monitored by CCD. The reaction time varies between 3h and 5h. At the end of the reaction, the product is filtered and washed with water.

4-((3-((1,3-dioxoisindolin-2-yl)methyl)-2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl acetate (LPSF/AA-FT-02) ()

Yellow solid. $C_{21}H_{14}N_2O_6S$. m.p.: 263 °C. Yield: 56,7 %. IR (KBr, cm^{-1}): 1745 (C=O), 1722 (C=O), 1585 (C=C), 725 (C-H). 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 7,87 (m, 5H, J = 28,2 Hz, CH, FtH), 7,46 (d, 2H, J = 8,4 Hz, ArH), 6,91 (d, 2H, J = 9 Hz, ArH), 5,49 (s, 2H, -CH₂), 2,29 (s, 3H, -CH₃). MS m/z (%): (M+H)⁺ 423.9, calculated 422.05.

N-(4-((3-((1,3-dioxoisindolin-2-yl)methyl)-2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl)acetamide (LPSF/FT-03) ()

Yellow solid. $C_{21}H_{15}N_3O_5S$. m.p.: 277 °C. Yield: 80.4 %. IR (KBr, cm^{-1}): 3382 (N-H), 1745 (C=O), 1717 (C=O), 1580 (C=C), 726 (C-H). 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 7,88 (m, 5H, J = 24,3 Hz, CH, FtH), 7,74 (d, 2H, J = 8,7 Hz, ArH), 7,55 (d, 2H, J = 9 Hz, ArH), 5,49 (s, 2H, -CH₂), 2,07 (s, 3H, -CH₃). MS m/z (%): (M+H)⁺ 422.02, calculated 421.07.

5-((2,3-dihydrobenzofuran-6-yl)methylene)-3-((1,3-dioxoisindolin-2-yl)methyl)thiazolidine-2,4-dione (LPSF/FT-04) ()

Yellow solid. $C_{21}H_{14}N_2O_5S$. m.p.: 255.9 °C. Yield: 75,5 %. IR (KBr, cm^{-1}): 1779 (C=O), 1736 (C=O), 1594 (C=C), 710 (C-H). 1H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7,88 (m, 3H, J = 12,3 Hz, CH, FtH), 7,74 (m, 2H, J = 8,7 Hz, ArH), 7,30 (dd, 2H, J = 9,6 Hz, ArH), 6,85 (d, 1H, J = 9 Hz, ArH), 5,66 (s, 2H, -CH₂), 4,66 (t, 2H, J = 17,7 Hz), 3,26 (t, 2H, J = 17,7 Hz). MS m/z (%): 406.06, calculated 406.11.

3-((1,3-dioxoisindolin-2-yl)methyl)-5-(4-(diphenylamino)benzylidene)thiazolidine-2,4-dione (LPSF/FT-06) ()

Yellow solid. $C_{31}H_{21}N_3O_4S$. m.p.: 133 °C. Yield: 95,3 %. IR (KBr, cm^{-1}): 3033 (C-H), 1730 (C=O), 1582 (C=C), 1291 (C-N), 725 (C-H). 1H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7,88 (m, 2H, J = 9 Hz, FtH), 7,82 (s, 1H, CH), 7,74 (m, 2H, J = 8,1 Hz, FtH), 7,32 (m, 6H, J = 24,3 Hz, ArH), 7,15 (m, 6H, J = 22,5 Hz, ArH), 7,01 (d, 2H, J = 8,7 Hz, ArH), 5,66 (s, 2H, CH₂). MS m/z (%): 531.38, calculated 531.12.

3-((1,3-dioxoisindolin-2-yl)methyl)-5-((3-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)methylene)thiazolidine-2,4-dione (LPSF/FT-09) ()

Yellow solid. $C_{22}H_{14}N_4O_4S$. m.p.: 214 °C. Yield: 84,3 %. IR (KBr, cm^{-1}): 3321 (N-H), 3015 (C-H), 1710 (C=O), 1610 (C=C), 1318 (C-N). 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 13,82 (s, 1H, NH), 8,24 (s, 1H, CH), 7,87 (m, 4H, J = 27,9 Hz, ArH), 7,61 (t, 6H, J = 39 Hz, ArH), 5,46 (s, 2H, CH_2). MS m/z (%): (M+H) $^+$ 431.19, (M+Na) $^+$ 453.23, calculated 430.07.

5-((2-chloro-6-methylquinolin-3-yl)methylene)-3-((1,3-dioxoisindolin-2-yl)methyl)thiazolidine-2,4-dione (LPSF/FT-12) ()

Yellow solid. $C_{23}H_{14}ClN_3O_4S$. m.p.: °C. Yield: 72,2 %. IR (KBr, cm^{-1}): 1781 (C=O), 1731 (C=O), 1654 (C=C), 1310 (C-N). 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8,10 (s, 1H, ArH), 7,86 (m, 4H, J = 22,8 Hz, ArH), 7,56 (s, 1H, ArH), 7,40 (dd, 2H, J = 10 Hz, ArH), 7,22 (d, 1H, J = 8 Hz, ArH), 5,46 (s, 2H, CH_2), 2,48 (m, 3H, J = 5,6 Hz, CH_3). MS m/z (%): (M+H) $^+$ 464.03, calculated 463.03.

3-((1,3-dioxoisindolin-2-yl)methyl)-5-(4-(pyrimidin-5yl)benzylidene)thiazolidine-2,4-dione (LPSF/FT-15) ()

Yellow solid. $C_{23}H_{14}N_4O_4S$. m.p.: 288 °C. Yield: 87,3 %. IR (KBr, cm^{-1}): 3014 (C-H), 1749 (C=O), 1597 (C=C), 1312 (C-N), 727 (C-H). 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 9,25 (s, 1H, ArH), 8,99 (s, 2H, ArH), 7,96 (s, 1H, CH), 7,90 (m, 4H, J = 8,4 Hz, ArH), 7,72 (m, 4H, J = 45,3 Hz, ArH), 5,69 (s, 2H, CH_2). MS m/z (%): (M+H) $^+$ 443.24, calculated 442.07.

2.3 Cell culture

Cells Du-145(prostate cancer), Panc-1 and SK-mel-28 were cultured in Dulbecco's modified essential medium low glucose (Gibco), Cell Mia- paca-2 Dulbecco's modified essential medium Hight glucose (Gibco), cells HI-60 and K562 were cultured in RPMI 1640(Gibco) and cell PC-3 F12 medium. All were supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco) except Mia-paca-2 and 2,5% horse serum, 10.000 U of penicillin and 10.000 streptomycin (Gibco) and were maintained in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 . Were taken from the Rio de Janeiro cell bank (BCRJ).

2.4 In silico predictions of FT12 functions

First we performed computational analysis using PASS online [<http://geneontology.org/>] for predicting FT12 effects and mechanisms of action. PASS online is a software for evaluating the biological potential of compounds and gives a score for probability to be active (Pa) and inactive (Pi). FT12 was estimated as biological active for a specific activity when $P_a > P_i$ and $P_a > 0.1$ to be considered significant. Genes directly related to FT12 predicted functions were investigated through ENRICH for gene ontology enrichment analysis of associated biological processes (BP) and KEGG pathways using 0.05 as threshold for the Benjamini-Hochberg corrected p-values.

2.5 Cytotoxicity assays

The in vitro cytotoxicity test was performed on neoplastic cells and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with different concentrations. Cellular cytotoxicity was quantified by the colorimetric method 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide (MTT). Cells PBMCs were plated 5×10^5 /well and neoplastic cells were distributed into 96 well plates, at cells and were plated at the concentration according to the NIH recommendations, the number of cells per well/100 μ l. After 24 h, different concentrations of phthalimido-thiazoles derivatives (1, 10, 50, and 100 μ M) in plates incubated in a humid oven at 37°C and 5% CO₂ for 48 h (PBMCs) and 72 h. After the incubation period, 20 μ L of the 5 mg/mL MTT solution diluted in PBS was added; the plates were then protected from light and were incubated once more in a humid oven at 37°C and 5% CO₂ for a period of 3h. 130 μ l of 20% SDS per well and of measured optical density were added after 24 hours at the 560 nm wavelength. The reading was performed on a microplate reader (EL808 - Biotek®). Determination of the cytotoxic potential of the tested compounds was calculated in relation to the control, which was treated with the DMSO vehicle. To determine the concentration of the compound required for 50% inhibition in vitro (IC₅₀), three independent MTT assays were performed.

2.6 Cell cycle analysis

Cells were plated in 6-well plates at a concentration of 5×10^5 cells per well and were treated at IC₅₀ concentration. After 48 hours, the cells were trypsinized and

washed twice with PBS and were fixed in 70% alcohol at 4-6 °C; then, the cells were incubated for 24 hours at -20°C. In the next step, the cells were incubated with propidium iodide (5 mg/mL)/RNase A (0.25 mg / mL) in PBS for 30 minutes on ice and were protected from light. Cellular DNA content was quantified by flow cytometry using the Accuri C6 flow cytometer, wherein the percentage of DNA in each phase of the cycle was obtained by the C6 software program (Becton, Dickinson and Company, USA).

2.7 In-vitro scratch assay

Cells were plated in 24-well plates at a density of 1×10^5 were incubated at 37°C under 5% CO₂ atmosphere for 24 hours. After reaching the necessary confluence, the growth medium was aspirated, and two washes with 1X PBS were performed; then, two perpendicular marking lines (*striae*) were made using a P200 pipette. After the labeling procedure, the cells were treated with complete medium (control), 0.1% DMSO, and FT-12, at concentrations previously determined by IC₅₀. They were photographed under the inverted microscope (eclipse Ts2 Nikon) (t=0) and incubated for 24 hours (t=0, t=6, t=12 and t=24) under the same conditions as above. Migration assay data were obtained from image analysis through the ImageJ program (Version 1.49) (NIH, USA).

2.8 Clonogenic Assay

Cells were initially plated in 24-well cluster plates at a density of 3.0×10^4 cells/well and incubated at 37 °C in atmosphere of 5% CO₂. After 24 h and 48h, the medium was changed, and the cells were treated with 0.1% DMSO (control group) or with phthalimido-thiazoles derivative FT-12 at concentration previously determined by the IC₅₀. After 14 days, the colonies were fixed with paraformaldehyde and stained using Methyl Violet (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The stained colonies were counted under manually.

2.9 Splenocytes isolation

Cytotoxicity assay was also performed using Balb/c splenocyte cells to verify that the derivatives were cytotoxic to mice cells. Cells were removed from the spleen of healthy animals about 45 days after weaning. The spleen was ground to obtain cells and cells were filtered with the aid of a 70 micrometer filter and then washed and counted. A pool of 3 balbs cells was performed to evaluate the viability of FT-2, 3, 4,

6, 7, 8, 9, 10, 11, 13 and 18 derivatives at 1, 10 and 100 μ M doses. Cells were plated 2×10^6 and incubated for 48 hours with the derivatives. After MTT were added at plates and after 3 hours were added SDS overnight plates for complete solubilization and subsequent plate readings using the BioTek plaque reader at 570 nm length.

2.10 Culture cells

Splenocytes from BALB/c mice were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with L-Glutamine, 10% Bovine Fetal Serum (Gibco), 10 mM HEPES and 10,000 U / mL Penicillin / Streptomycin (Gibco) in incubator 5% CO₂ at 37 ° C. Splenocytes were stimulated with Concanavalin A (100ng/mL) and subsequently treated with phthalimido-thiazoles derivatives at concentrations 1, 10 and 100 μ M, for some derivatives only 1 and 10 μ M concentration were used due to their cytotoxicity at 100 μ M. After 48 hours of culture, the supernatants will be collected and stored in a -20°C freezer for subsequent cytokine measurement.

2.11 CBA

The cytokine levels in the culture supernatant were measured and quantitated by multiplex immunoassays using a Cytometric Bead Array (CBA) kit according to the manufacture's instruction (BD Biosciences, San Jose, CA). Cytokines bound to beads were detected by the phycoerythrin (PE- conjugated secondary antibody,) in which the fluorescence intensity of PE for each sandwich complex reveals the concentration of a given sandwich. Cytokine in the sample tested IL17A, IFN- γ , IL2, IL-6, TNF- α , IL-4 and IL-10 in pg / ml. Briefly, 50 μ L bead suspension and 50 μ L of each sample were mixed and incubated at room temperature for 3 h hours at 25 ° C in low light environment. After incubation the samples were washed with the Kit Wash Buffer reagent in a 200g centrifuge for 5 minutes and resuspended in 300 μ L of 1x PBS for acquisition on the cytometer. The fluorescence intensity emitted by the sandwich complex was determined by the BD TM Accuri C6 flow cytometer. Quantitation analysis of the cytokines tested was performed by the BD TM FCAP Array Software v3.0 following manufacturer's instructions. Lower detection limits were IL-2(0.1 pg/mL), IL-4 (0.03 pg/mL), IL-6 (1.4 pg/mL), IFN-g(0.5 pg/mL), TNF-a(0.9 pg/mL), IL-17A (0.8 pg/mL) e IL-10 (16.8pg/mL).

2.12 Statistical analysis

Three independent experiments were performed in triplicate. IC₅₀ values and 95% confidence intervals were obtained with nonlinear regression with the OriginPro program (8.0; OriginLab, Northampton, Massachusetts, USA). Statistical significance was tested with two-tailed unpaired student's *t*-tests in relation to the untreated or positive controls, and differences were considered significant when *p* values were less than 0.05. Values were expressed as the mean $\pm$ SD of three or more replicate experiments.

3 Results

Initially, the compounds were tested against peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). All the synthesized compounds were assessed for in vitro cytotoxic effect in PBMCs using MTT assay, as a primary step for investigating their cytotoxic activity. It was observed that phthalimido-thiazoles derivatives were nontoxic to normal (IC₅₀>100 μ M). Derivatives phthalimido-thiazoles were tested in different cells lines hematopoietic and solid tumors but only FT-9 and FT-12 showed activity antitumoral. The IC₅₀ values for FT-9 were 59.11 $\pm$ 4.48 (in K569 cells) and 64.42 $\pm$ 6.36 μ M (in Molt-4 cells); while for FT-12 were 31.54 $\pm$ 1.33 (in PANC-1 cells), 46.64 $\pm$ 5.85 (in Sk-mel-28 cells) and 71.92 $\pm$ 1.31 μ M (in PC-3 cells), as shown in Table 1.

Through PASS online screening, 32 genes (shown in Table 1) were predicted to be targeted by FT12 in some way (e. g agonist). Also, 12 biological effects (Table 2) were predicted to be associated to FT12. The genes predicted as targets were evaluated through gene ontology enrichment analysis for biological processes and it resulted in many processes associated to apoptosis. Through KEGG analysis, 15 pathways were shown as statistically significant for those target genes. Predictions demonstrated that FT-12 derivative has an action principally in the induction of pro-apoptotic genes (S1).

To evaluate the cytotoxic potential, the highest and lowest IC₅₀ concentrations were chosen. Initially the inhibition of clone formation was evaluated at 24 and 48 hours of treatment. Results in Fig. 1 showed that the number of viable PC-3 cell colonies was significantly decreased after FT-12 treatment. Both in the 24-hour (*p*= 0,0153) and 48-hour (0,0644), there was a reduction in the formation of new clones. We also evaluate the ability to inhibit the formation of colonies in Panc-1 cells (figure

2). Both in the 24-hour ($p=0,0372$) and 48-hour ($0,096$), there was a reduction in the formation of new clones.

Wound healing assay was performed using FT-12 treated PC-3 and Panc-1 cells to investigate the effect of FT-12 on cell migration. The monolayer was wounded and allowed to migrate for 6, 12 and 24 hours with DMSO 0,1% (control), FT-12 at dose IC₅₀. Figure 3 shows that incubation with FT-12 significantly reduced the migration ability of PC-3 and Panc-1 cells compared to untreated cells ($p < 0.05$).

As shown in Fig. 4, FT-12 concentrations, at IC₅₀ after 6 h, reduced PC-3 cell migration with free area 90% and 94.43 % when compared to control; from 12 h the free area 74.84 % and 90.79 %; after 24 h reduced PC-3 cell migration with free area 68,44 % and 84,21%, respectively.

We also evaluated FT-12 derivative effects on cell cycle (table 2) in Panc-1 cells. This derivative did not alter the cell cycle progression significantly. Doxorubicin induced an arrest in G2/M phase compared to untreated ($p=0.0169$). To evaluate if FT-12 derivative induces others cell death process, we analyzed for 7-AAD (early necrosis marker) and annexin V (apoptosis). The derivative induced a significant increase in the number of necrosis ($p=0.0202$) as well doxorubicin treatment ($p=0.0016$; figure 4). Furthermore, FT-12 treatment resulted in a significant increase in apoptosis ($p=0.0017$). To investigate apoptosis molecular pathway, we next evaluated the expression of the PARP, cell apoptosis-related protein Poly (ADP-ribose) polymerase in PANC-1 cells. In figure 5, F-12 treatment (17.35%) did not induce a significant increase in cleaved PARP compared to untreated cells (2.35%). Next, we also investigated the effects of FTs derivatives that did not show antineoplastic activity on immunomodulation in splenocytes stimulated with Conavalin A. The derivatives FT- 3 and FT-4 reduced secretion of IL-4 and IL-10 (figure 6 and 7) by splenocytes treated with ConA. IL-10 and IL-4 were cytokines Th2 pathway. The derivative FT-6 increased cytokines expression both IL-4 and IL-10. The derivative FT-3 also decreased also decreases levels of cytokines TNF and IFN- γ (figure 8 and 9). The derivatives FT-13 and FT-7 increased the of TNF and INF- γ levels, respectively. The pro-inflammatory IL-6 and IL-2 (figure 10 and 11) cytokines are also reduced by the FT-3 derivative. However, the FT-6 derivative increased the levels of IL-6 and the FT-13 derivative increased the levels of IL-2. The FT-3 derivative also reduced IL-17A (figure 12) levels.

4. Discussion

The new intermediate obtained, FT-01, in the first reactions obtained satisfactory yields, between 62-81%. The synthesis is also relatively fast, 2 hours of reaction. Therefore, it was made on a larger scale of production with equivalent yields.

Seven compounds (FT-2, FT-3, FT-4, FT-6, FT-9, FT-12, FT-15) were obtained by the condensation methodology Harada *et al.* 2012 (HARADA *et al.*, 2012). This methodology was used due to the difficulty of synthesis by another method, since it is necessary to synthesize another intermediary (the IPs), which makes the reaction more laborious and costly. Research done on the SciFinder website did not present in the literature compounds with similarity sufficient for a good comparison with the obtained thiazolftalimides (CAS, 2019).

Any derivatives phatilimide did not show cytotoxic activity in normal healthy donor cells (PBMCs). It is an important standard that anti-cancer drugs they are not provoking damaging effects on normal cells. The derivative FT-12 showed larger spectrum of action antineoplastic with IC_{50} between 31.54 and 71.94 μ M. The derivative FT-9 also showed antineoplastic activity with IC_{50} the 59.11 mM in K-562 cells and 64.42 mM in Molt-4 cells, both of leukemic origin.

The FT-12 derivative owns a group quinoline. Quinine and camptothecin are important quinoline alkaloids with important drugs antimalarial and anticancer. Many molecules with a broad range of bioactivities, including antitumor, antimalarial, antibacterial and antifungal, antiparasitic and insecticidal, antiviral, antiplatelet, anti-inflammatory, herbicidal, antioxidant and other activities, were studied (SHANG *et al.*, 2018). Our results demonstrated that the 2-chloro-quinoline ring system is had in antiproliferative activity antiproliferative activity but than other substitutes. Pun *et al.*, 2017 evaluated evaluated 83b1 novel quinoline in proliferation of esophageal cancer model in vivo and they showed that this compound reduced the tumor size in nude mice xenograft (PUN *et al.*, 2017). Mphahlele *et al.*, 2014 thienoquinolines showed cytotoxic effects against human breast adenocarcinoma cell line (MCF-7 cells) with IC_{50} between 0.014 and 1.84 mg/mL (MPHAHLELE *et al.*, 2014). THAPA MAGAR *et al.*, (2017) showed chlorine group at the meta-or para-position of the 2-phenyl ring, displayed highly potent topo II inhibitory activity.

We carried out GO analysis to identify specific pathways that were altered by the compound. This included regulation of cell death, regulation of apoptosis, DNA intercalator, programmed cell death, and signal transduction.

FT-12 induced a decrease in the formation of clones in both Panc-1 and PC-3. This assay can be used to determine the cytotoxic effects of various treatments, including chemotherapeutic and ionizing radiation (FEDR et al., 2013).

FT-12 derivative Inhibit cancer cell migration in PC-3 cell. Which is an attribute of metastasis. To find new drugs that inhibit migration and invasion is a promising strategy against cancer. Inhibiting cell migration is an interesting strategy for new candidates for antitumor drugs, since most deaths from cancer are due to metastases (ZHENG et al., 2013). Belluti and collaborated (2019) phthalimide-based curcumin derivatives exerted inhibitory effects of the migration capacity of PC-3 and Du-145 cells and inhibitory clonogenic with decrease in colony formation reached up to 95% following K3F21 treatment at 5 and 10 μ M in PC3 and DU145 cells (BELLUTI et al., 2019).

We decided to evaluate the cell death mechanism induced by FT-12 compound, in cell Panc-1. FT-12 derivative induced necrosis and apoptosis besides inducing cleaved Parp. Rohitkumar et al 2015 showed thieno(2,3-b) quinoline (BPTQ) derivatives induced arrest cell cycle in phase S and cleaved Parp in MOLT-4 cells leukemia (ROHITKUMAR et al., 2015). Santos and collaborated (2016) showed 1,3-thiazole cause irreversible cancer cell damage by inducing necrosis and apoptosis in HT-29 cells cancer (SANTOS et al., 2016).

FT-13 derivative induced increased IL-2. The use of IL-2 in metastatic melanoma and renal cell carcinoma and IFN- α is currently approved by the FDA for adjuvant therapy for stage III melanoma. Increasing levels of IL-2 appears to be an interesting strategy. FT-3 induced decrease IL-2, INF-g, TNF and IL-6. Apremilast is a phthalimidic derivative, which is approved by the FDA for the treatment of adult patients with active psoriatic arthritis, it has an action in inhibiting the production of TNF α and IFN- α induced via TLR4 and TLR9, respectively (SCHAFFER et al., 2014).

5. Conclusion

In summary, derivatives induced cytotoxic action against tumor cells. FT-12 derivative also inhibitory clonogenic with decrease in colony formation and inhibit

migration in PC-3 and Panc-1. FT-12 derivative also induced necrosis/apoptosis in Panc-1 cells. FT-13 and FT-6 induction and stimulation and inhibited of important cytokines production.

Reference

1. ABDEL-AZIZ, Alaa A. M.; EL-AZAB, Adel S.; ATTIA, Sabry M.; AL-OBAID, Abdulrahman M.; AL-OMAR, Mohamed A.; EL-SUBBAGH, Hussein I. Synthesis and biological evaluation of some novel cyclic-imides as hypoglycaemic, anti-hyperlipidemic agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 46, n. 9, p. 4324–4329, 2011. DOI: 10.1016/j.ejmech.2011.07.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.07.002>.
2. AKGÜN, Hülya; KARAMELEKOGLU, Irem; BERK, Barkin; KURNAZ, Işıl; SARIBIYIK, Gizem; ÖKTEM, Sinem; KOCAGÖZ, Tanil. Synthesis and antimycobacterial activity of some phthalimide derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 20, n. 13, p. 4149–4154, 2012. DOI: 10.1016/j.bmc.2012.04.060.
3. ALANAZI, Amer M.; EL-AZAB, Adel S.; AL-SUWAIDAN, Ibrahim A.; ELTAHIR, Kamal Eldin H.; ASIRI, Yousif A.; ABDEL-AZIZ, Naglaa I.; ABDEL-AZIZ, Alaa A. M. Structure-based design of phthalimide derivatives as potential cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: Anti-inflammatory and analgesic activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 92, p. 115–123, 2015. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.12.039. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.12.039>.
4. ALIANÇA, Amanda Silva dos Santos; OLIVEIRA, Arsênio Rodrigues; FEITOSA, Ana Paula Sampaio; RIBEIRO, Karla Raíza Cardoso; DE CASTRO, Maria Carolina Accioly Brelaz; LEITE, Ana Cristina Lima; ALVES, Luiz Carlos; BRAYNER, Fábio André. In vitro evaluation of cytotoxicity and leishmanicidal activity of phthalimido-thiazole derivatives. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 105, p. 1–10, 2017. DOI: 10.1016/j.ejps.2017.05.005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2017.05.005>.
5. AYATI, Adile; EMAMI, Saeed; ASADIPOUR, Ali; SHAFIEE, Abbas; FOROUMADI, Alireza. Recent applications of 1,3-thiazole core structure in the identification of new lead compounds and drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 97, n. 1, p. 699–718, 2015. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.04.015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.015>.
6. BELLUTI, Silvia; ORTECA, Giulia; SEMEGHINI, Valentina; RIGILLO, Giovanna; PARENTI, Francesca; FERRARI, Erika; IMBRIANO, Carol. Potent anti-cancer properties of phthalimide-based curcumin derivatives on prostate tumor cells. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 1, 2019. DOI: 10.3390/ijms20010028.
7. CAS (American Chemical Society). SciFinder, 2019. Disponível em: <<https://scifinder.cas.org>>. Acesso em: 19 ago. 2019.
8. CHAGAS, Mbo; CORDEIRO, NCC; MARQUES, KMR; ROCHA PITTA, MG;

- RÊGO, MJB; LIMA, MCA; PITTA, MGR; PITTA, IR. New thiazacridine agents: Synthesis, physical and chemical characterization, and in vitro anticancer evaluation. **Human & Experimental Toxicology**, [S. l.], v. 36, n. 10, p. 1059–1070, 2017. DOI: 10.1177/0960327116680274. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0960327116680274>.
9. DA ROCHA PITTA, Marina Galdino; SOUZA, Érika Silva; BARROS, Francisco Washington Araújo; MORAES FILHO, Manoel Odorico; PESSOA, Cláudia O.; HERNANDES, Marcelo Zaldini; DO CARMO ALVES DE LIMA, Maria; GALDINO, Suely Lins; DA ROCHA PITTA, Ivan. Synthesis and in vitro anticancer activity of novel thiazacridine derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, [S. l.], v. 22, n. 5, p. 2421–2429, 2013. DOI: 10.1007/s00044-012-0236-2. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00044-012-0236-2>.
10. FEDR, Radek; PERNICOVÁ, Zuzana; SLABÁKOVÁ, Eva; STRAKOVÁ, Nicol; BOUCHAL, Jan; GREPL, Michal; KOZUBÍK, Alois; SOUČEK, Karel. Automatic cell cloning assay for determining the clonogenic capacity of cancer and cancer stem-like cells. **Cytometry Part A**, [S. l.], v. 83 A, n. 5, p. 472–482, 2013. DOI: 10.1002/cyto.a.22273.
11. FERLAY, J. et al. **GLOBOCAN 2012 v1.0, cancer incidence and mortality worldwide: IARC cancer base no. 11 [Internet]**. International Agency for Research on Cancer, Lyon. [s.l: s.n.].
12. GUGGILAPU, Sravanthi Devi; GUNTUKU, Lalita; REDDY, T.Srinivasa; NAGARSENKAR, Atulya; SIGALAPALLI, Dilep Kumar; NAIDU, V. G. M.; BHARGAVA, Suresh K.; BATHINI, Nagendra Babu. Synthesis of thiazole linked indolyl-3-glyoxylamide derivatives as tubulin polymerization inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 138, p. 83–95, 2017. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.06.025. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.06.025>.
13. HAJJI, Nabil; GARCÍA-DOMÍNGUEZ, Daniel J.; HONTECILLAS-PRIETO, Lourdes; O'NEILL, Kevin; DE ÁLAVA, Enrique; SYED, Nelofer. The bitter side of epigenetics: variability and resistance to chemotherapy. **Epigenomics**, [S. l.], v. 1, 2018. DOI: 10.2217/epi-2017-0112. Disponível em: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/epi-2017-0112>.
14. HARADA, Koichiro; KUBO, Hideki; ABE, Jun; HANETA, Mari; CONCEPTION, Arnel; INOUE, Shinichi; OKADA, Satoshi; NISHIOKA, Kazuhiko. Discovery of potent and orally bioavailable 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 3 inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 20, n. 10, p. 3242–3254, 2012. DOI: 10.1016/j.bmc.2012.03.052. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2012.03.052>.
15. INCA. **Estimativa 2020**. [s.l: s.n.].
16. KAMIŃSKI, Krzysztof; OBNISKA, Jolanta; WIKLIK, Beata; ATAMANYUK, Dmytro. Synthesis and anticonvulsant properties of new acetamide derivatives of phthalimide, and its saturated cyclohexane and norbornene analogs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 46, n. 9, p. 4634–4641, 2011. DOI: 10.1016/j.ejmech.2011.07.043.
17. MPHAHLELE, Malose; MALULEKA, Marole; MAKHAFOLA, Tshepiso; MABETA, Peace. Novel Polycarbo-Substituted Alkyl (Thieno[3,2-c]quinoline)-2-Carboxylates: Synthesis and Cytotoxicity Studies. **Molecules**, [S. l.], v. 19, n. 11, p. 18527–18542, 2014. DOI: 10.3390/molecules191118527. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1420-3049/19/11/18527/>.

18. OLIVEIRA, JAMERSON FERREIRA DE SILVA, Anekécia Lauro Da et al. Synthesis of thiophene-thiosemicarbazone derivatives and evaluation of their in vitro and in vivo antitumor activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 104, p. 148–156, 2015. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.09.036. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.09.036>.
19. PUN, Ivan Ho Yuen et al. Anti-cancer effects of a novel quinoline derivative 83b1 on human esophageal squamous cell carcinoma through down-regulation of COX-2 mRNA and PGE2. **Cancer Research and Treatment**, [S. l.], v. 49, n. 1, p. 219–229, 2017. DOI: 10.4143/crt.2016.190.
20. RICCIO, Gennaro; LAURITANO, Chiara. Microalgae with immunomodulatory activities. **Marine Drugs**, [S. l.], v. 18, n. 1, 2020. DOI: 10.3390/md18010002.
21. ROHITKUMAR, Heggodu G.; ASHA, Kittur R.; RAGHAVAN, Sathees C.; ADVI RAO, Gopal M. DNA intercalative 4-butylaminopyrimido[4???;5???;4,5]thieno(2,3-b)quinoline induces cell cycle arrest and apoptosis in leukemia cells. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, [S. l.], v. 75, n. 6, p. 1121–1133, 2015. DOI: 10.1007/s00280-015-2735-6.
22. RÜHLE, Alexander; HUBER, Peter E.; SAFFRICH, Rainer; LOPEZ PEREZ, Ramon; NICOLAY, Nils H. The current understanding of mesenchymal stem cells as potential attenuators of chemotherapy-induced toxicity. **International Journal of Cancer**, [S. l.], p. 1–42, 2018. DOI: 10.1002/ijc.31619. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.31619>.
23. SANTOS, Thiago André R.; DA SILVA, Aline Caroline; SILVA, Elany Barbosa; DE MORAES GOMES, Paulo André Teixeira; ESPÍNDOLA, José Wanderlan Pontes; DE OLIVEIRA CARDOSO, Marcos Veríssimo; MOREIRA, Diogo Rodrigo Magalhaes; LEITE, Ana Cristina Lima; PEREIRA, Valéria R. A. Antitumor and immunomodulatory activities of thiosemicarbazones and 1,3-Thiazoles in Jurkat and HT-29 cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 82, p. 555–560, 2016. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.05.038. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.05.038>.
24. SHANG, Xiao-Fei; MORRIS-NATSCHKE, Susan L.; LIU, Ying-Qian; GUO, Xiao; XU, Xiao-Shan; GOTO, Masuo; LI, Jun-Cai; YANG, Guan-Zhou; LEE, Kuo-Hsiung. Biologically active quinoline and quinazoline alkaloids part I. **Med Res Rev.**, [S. l.], v. 38, n. 3, p. 775–828, 2018. DOI: 10.1016/j.physbeh.2017.03.040. Disponível em: [file:///C:/Users/Carla Carolina/Desktop/Artigos para acrescentar na qualificação/The impact of birth weight on cardiovascular disease risk in the.pdf](file:///C:/Users/Carla%20Carolina/Desktop/Artigos%20para%20acrescentar%20na%20qualifica%C3%A7%C3%A3o/The%20impact%20of%20birth%20weight%20on%20cardiovascular%20disease%20risk%20in%20the.pdf).
25. SHRESTHA, Gajendra; CLAIR, Larry L.St; NEILL, Kim L. O. The Immunostimulating Role of Lichen Polysaccharides: A Review. **PHYTOTHERAPY RESEARCH**, [S. l.], n. September, 2014.
26. SONG, Yu'ning; CHEN, Wenmin; KANG, Dongwei; ZHANG, Qingzhu; ZHAN, Peng; LIU, Xinyong. “Old friends in new Guise”: exploiting privileged structures for scaffold re-evolution/refining. **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, [S. l.], v. 17, n. 6, p. 536–53, 2014. DOI: 10.2174/1386207317666140122101631. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24446784>.
27. THAPA MAGAR, Til Bahadur; KADAYAT, Tara Man; LEE, Hwa Jong; PARK, Seojeong; BIST, Ganesh; SHRESTHA, Aarajana; KWON, Youngjoo; LEE, Eung Seok. 2-Chlorophenyl-substituted benzofuro[3,2-b]pyridines with enhanced topoisomerase inhibitory activity: The role of the chlorine substituent. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, [S. l.], v. 27, n. 15, p. 3279–3283, 2017. DOI:

10.1016/j.bmcl.2017.06.025.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.06.025>.

Disponível

em:

28. WITZ, Isaac P. The Tumor Microenvironment: The Making of a Paradigm. **Cancer Microenvironment**, [S. l.], v. 2, n. S1, p. 9–17, 2009. DOI: 10.1007/s12307-009-0025-8. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12307-009-0025-8>.

29. ZAHRAN, Magdy A. H.; ABDIN, Yasmin G.; OSMAN, Amany M. A.; GAMAL-ELDEEN, Amira M.; TALAAT, Roba M.; PEDERSEN, Erik B. Synthesis and evaluation of thalidomide and phthalimide esters as antitumor agents. **Archiv der Pharmazie**, [S. l.], v. 347, n. 9, p. 642–649, 2014. DOI: 10.1002/ardp.201400073.

30. ZAHRAN, Magdy A. H.; EL-AARAG, Bishoy; MEHANY, Ahmed B. M.; BELAL, Amany; YOUNES, Ali S. Design, synthesis, biological evaluations, molecular docking, and in vivo studies of novel phthalimide analogs. **Archiv der Pharmazie**, [S. l.], n. March, p. 1–12, 2018. DOI: 10.1002/ardp.201700363.

31. ZHENG, Shilong; ZHONG, Qiu; JIANG, Quan; MOTTAMAL, Madhusoodanan; ZHANG, Qiang; ZHU, Naijue; BUROW, Matthew E.; WORTHYLAKE, Rebecca A.; WANG, Guangdi. Discovery of a series of thiazole derivatives as novel inhibitors of metastatic cancer cell migration and invasion. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, [S. l.], v. 4, n. 2, p. 191–196, 2013. DOI: 10.1021/ml300322n.

[illegible]

Table 2. Analysis of the results in silico genes induced by the FT-12 derivative obtained through the Gene Ontology.

Gene			
Pa	Pi	Symbol	Activity
0.758	0.016	C5AR1	Anaphylatoxin receptor antagonist
0.458	0.004	DUSP1	Dual specificity phosphatase inhibitor
0.43	0.01	CAD	Dihydroorotase inhibitor
0.404	0.013	MCL1	Mcl-1 antagonist
0.403	0.01	APP	Amyloid beta precursor protein antagonist
0.359	0.069	CYP2C19	CYP2C19 inducer
0.352	0.059	MYC	Mycin inhibitor
0.347	0.062	CFTR	CF transmembrane conductance regulator agonist
0.338	0.002	PIM2	Pim-2 kinase inhibitor
0.329	0.004	PIM1	Pim kinase inhibitor
0.326	0.054	GYS1	Glycogen synthase stimulant
0.309	0.003	PTPRB	Protein-tyrosine phosphatase beta inhibitor
0.302	0.079	PTK2	Focal adhesion kinase 2 inhibitor
0.281	0.004	BCL2	Bcl2 antagonist
0.261	0.002	ENPP2	Autotaxin inhibitor
0.23	0.085	NISCH	Imidazoline I1 receptor agonist
0.212	0.005	IL12	Interleukin 12 agonist
0.205	0.022	CDA	Cytidine deaminase inhibitor
0.199	0.012	CHRNA3	Nicotinic alpha3beta4 receptor agonist
0.195	0.028	PTGS1	Cyclooxygenase 1 inhibitor
0.186	0.043	ADH1B	Alcohol dehydrogenase inhibitor
0.179	0.094	GABBR1	GABA receptor agonist
0.177	0.047	HCRTR1	Orexin receptor 1 antagonist
0.156	0.014	TERT	Telomerase inhibitor

Gene			
Pa	Pi	Symbol	Activity
0.152	0.053	ACP1	Acidphosphataseinhibitor
0.151	0.096	NAT1	Arylamine N-acetyltransferaseinhibitor
0.147	0.041	PTPN11	Protein-tyrosinephosphataseinhibitor
0.142	0.046	ADRA1A	Alpha adrenoreceptorantagonist
0.139	0.024	IL2	Interleukin 2 antagonist
0.128	0.039	ALOX5	Lipoxygenaseinhibitor
0.126	0.039	PTGS2	Cyclooxygenase 2 inhibitor
0.111	0.015	AKR1A1	Aldose reductaseinhibitor

Table 3. Effects of phthalimido-thiazolidine-2-4-dione derivatives and doxorubicin on cell cycle progression of Pan-1 cells after 48 h of treatment.

	Sub-G0	G0/G1	S	G2/M
NT	1.20 ± 0.3	49.53 ± 6.5	10.37 ± 5.4	38.57 ± 5.0
FT-12	1.87 ± 0.6	43.50 ± 7.9	14.57 ± 1.8	38.17 ± 6.4
Doxorubicin	5.53** ± 1.1	21.87** ± 3.7	17.10 ± 4.0	53.37* ± 4.1

Figures

Figure 1. Colony formation assay for analyzing the effect of FT-12 derivative in PC-3 cell.

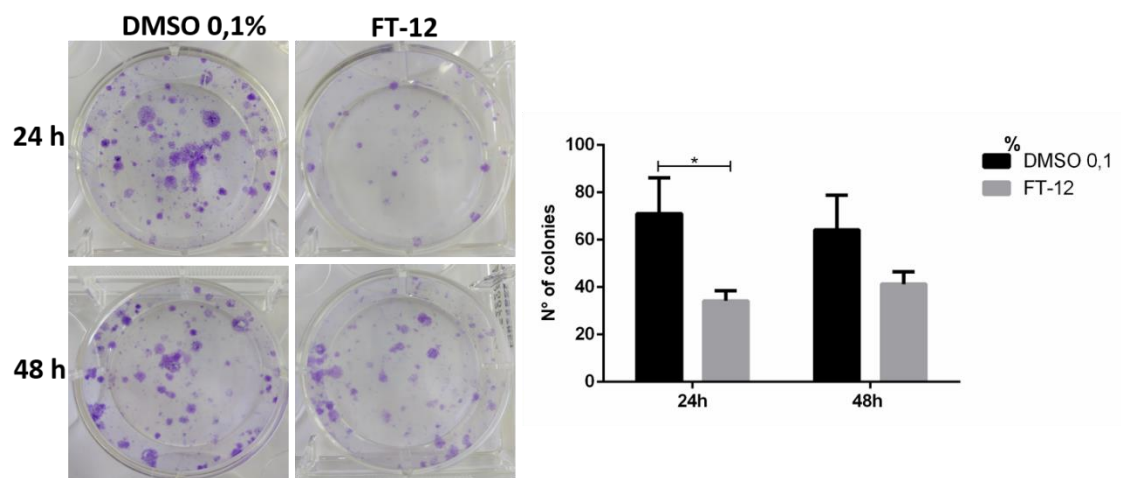


Figure 2. Colony formation assay for analyzing the effect of FT-12 derivative in Panc-1 cells.

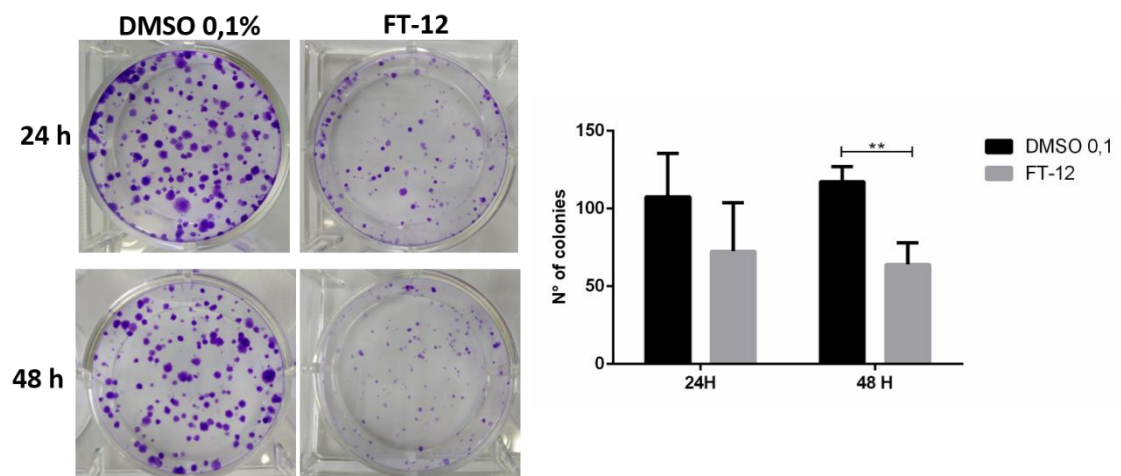


Figure 3. Effects of FT-12 on cell migration after 6,12 and 24 h of treatment in PC-3 cells. DMSO 0.1%. **P<0.001. Data are expressed as mean±SEM of three independent experiments. DMSO, dimethyl sulfoxide.

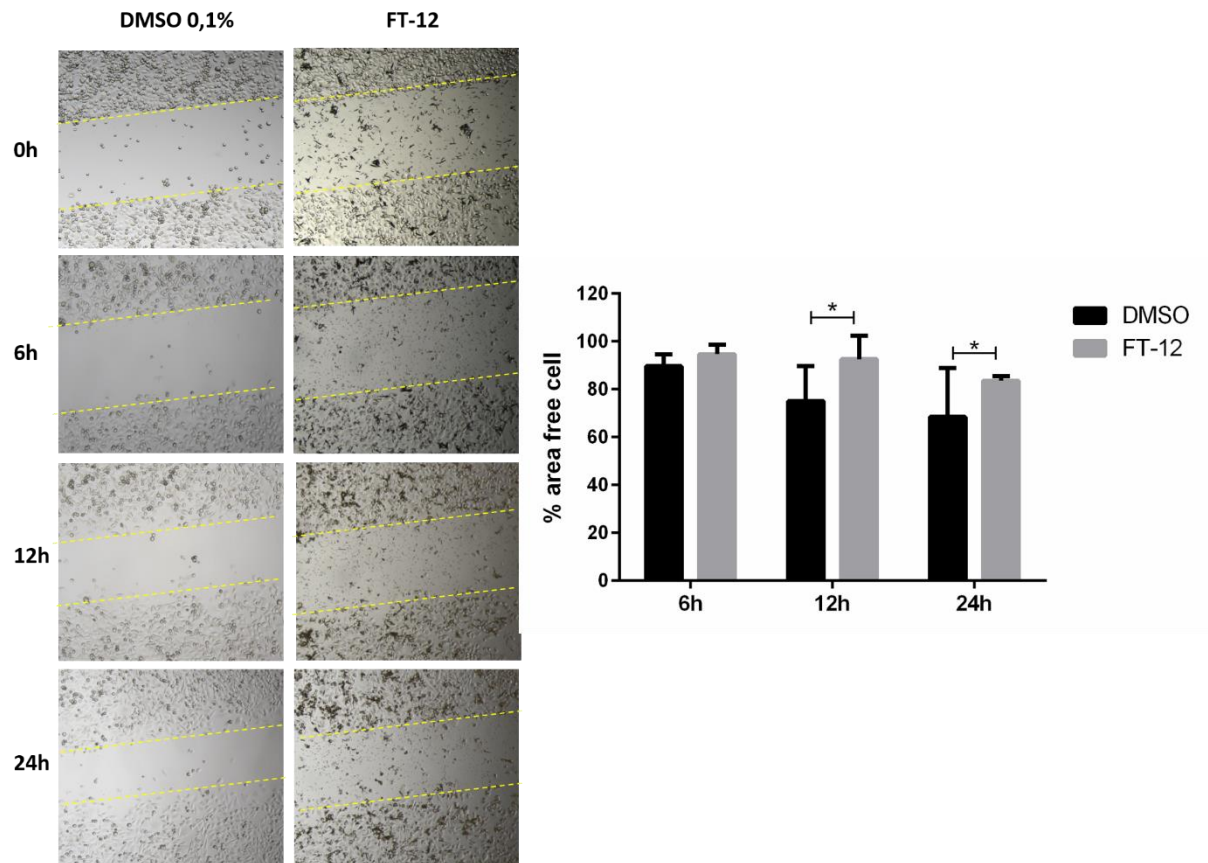


Figure 4. Effect in Panc-1 of FT-12 derivative and doxorubicin in apoptosis/necrosis by flow cytometry.

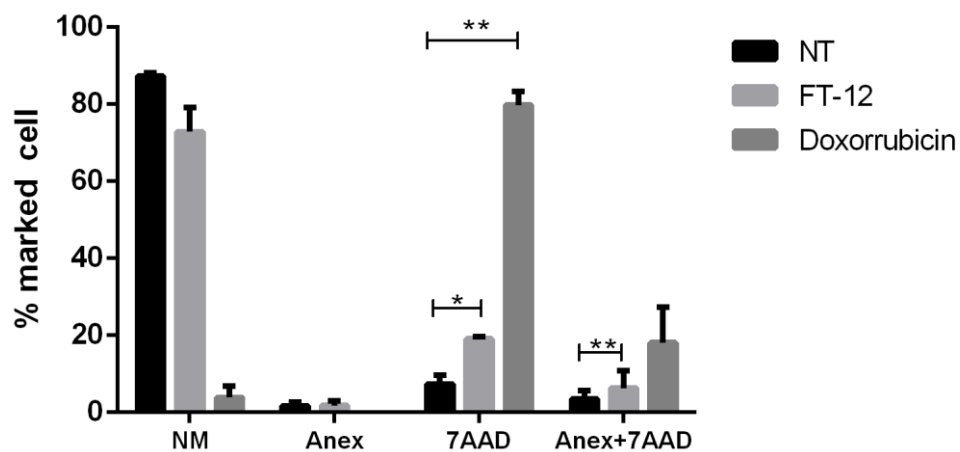


Figure 5. Effect in Panc-1 of FT-12 derivative and doxorubicin in cleavage parp by flow cytometry.

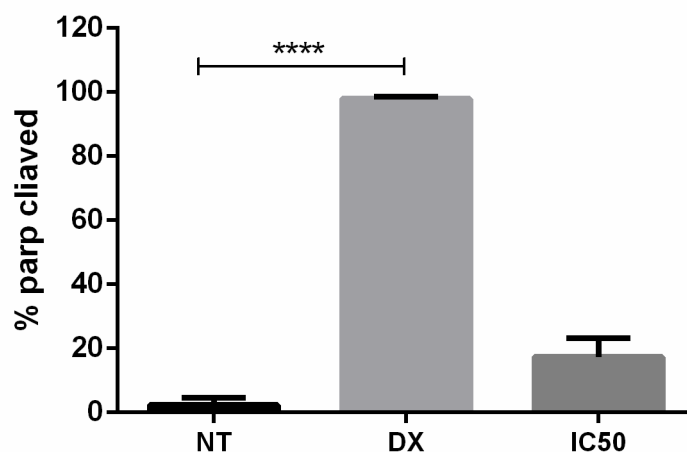


Figure 6. Evaluation of levels of the pro-inflammatory cytokine IL-4 against Balb / C splenocytes treated with phthalimido-thiazolidine-2-4-diona derivatives stimulated with Concanavalin A for 48 hours.

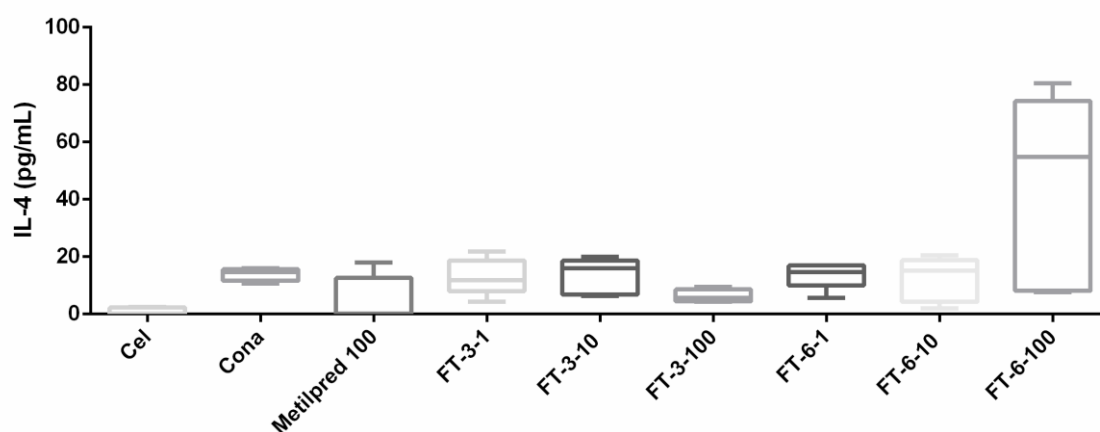


Figure 7. Evaluation of levels of the pro-inflammatory cytokine IL-10 against Balb / C splenocytes treated with phthalimido-thiazolidine-2-4-diona derivatives stimulated with Concanavalin A for 48 hours.

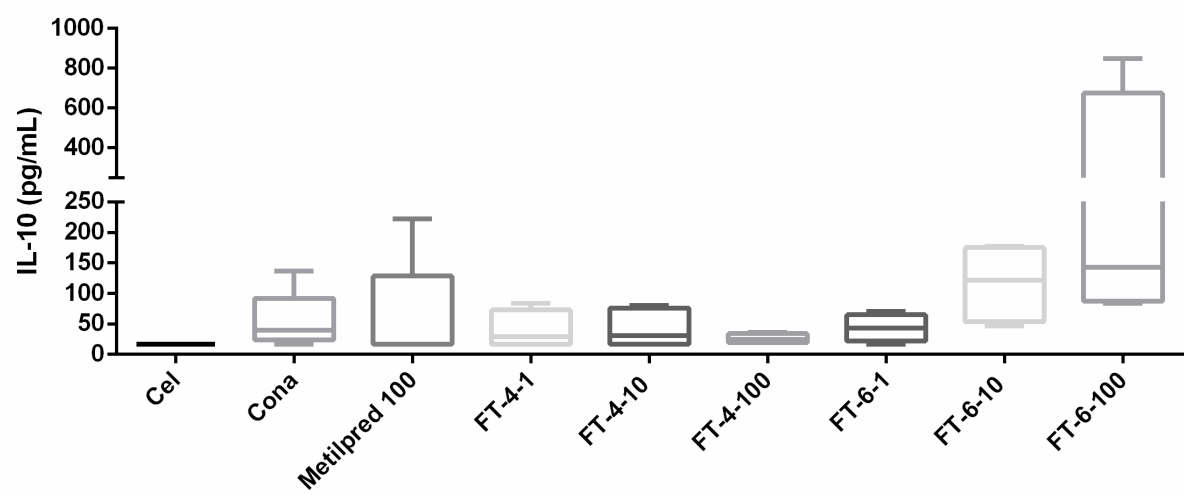


Figure 8. Evaluation of levels of the pro-inflammatory cytokine TNF against Balb / C splenocytes treated with phthalimido-thiazolidine-2-4-diona derivatives stimulated with Concanavalin A for 48 hours.

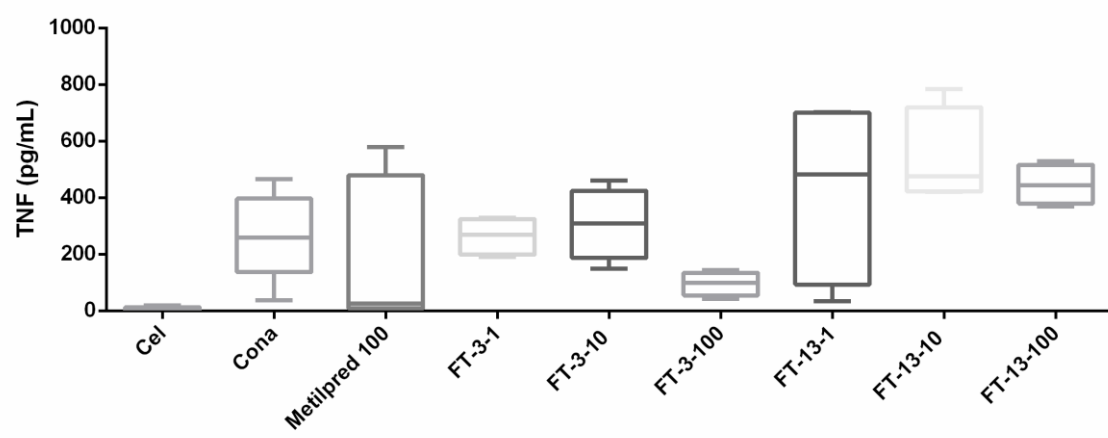


Figure 9. Evaluation of levels of the pro-inflammatory cytokine INF-g against Balb / C splenocytes treated with phthalimido-thiazolidine-2-4-diona derivatives stimulated with Concanavalin A for 48 hours.

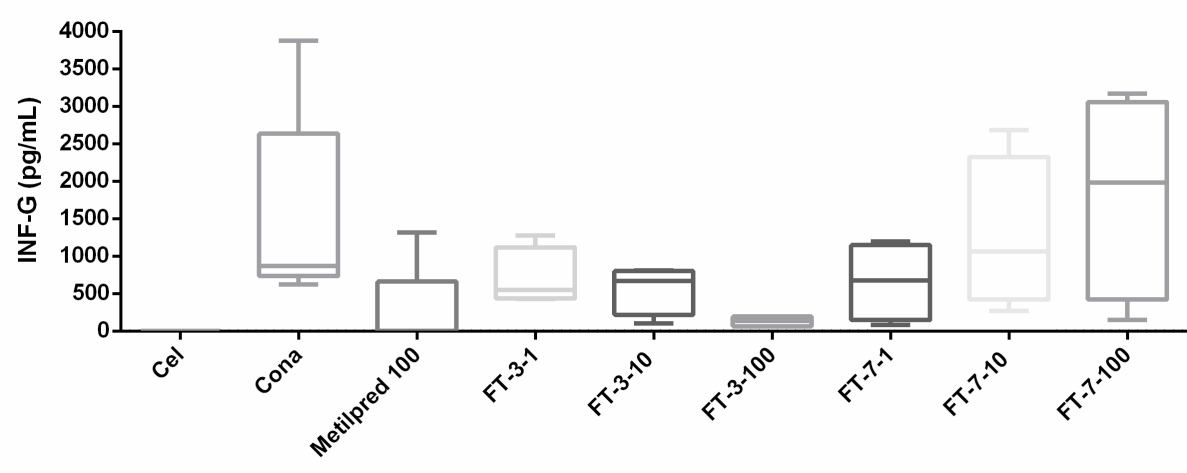


Figure 10. Evaluation of levels of the pro-inflammatory cytokine IL-6 against Balb / C splenocytes treated with phthalimido-thiazolidine-2-4-dione derivatives stimulated with Concanavalin A for 48 hours.

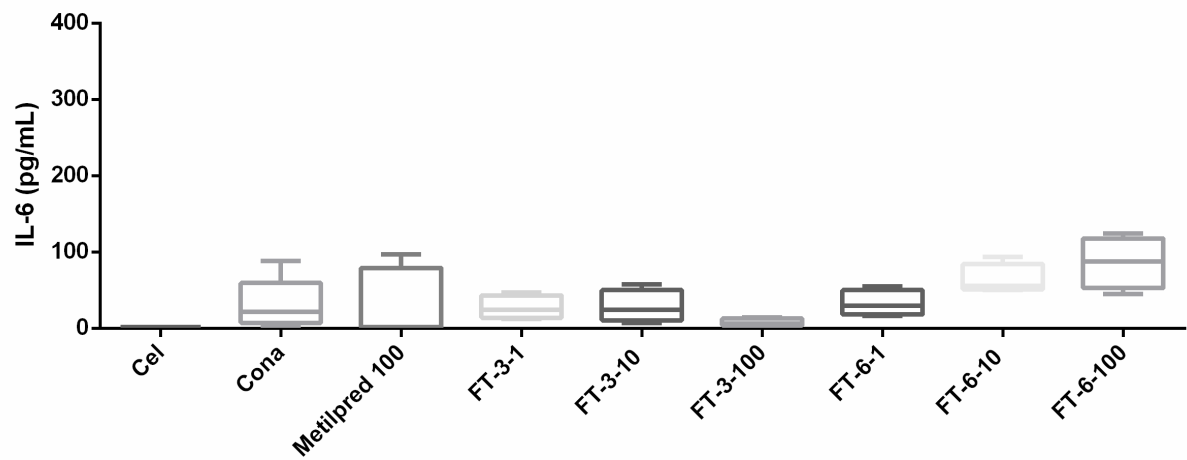


Figure 11. Evaluation of levels of the pro-inflammatory cytokine IL-2 against Balb / C splenocytes treated with phthalimido-thiazolidine-2-4-dione derivatives stimulated with Concanavalin A for 48 hours.

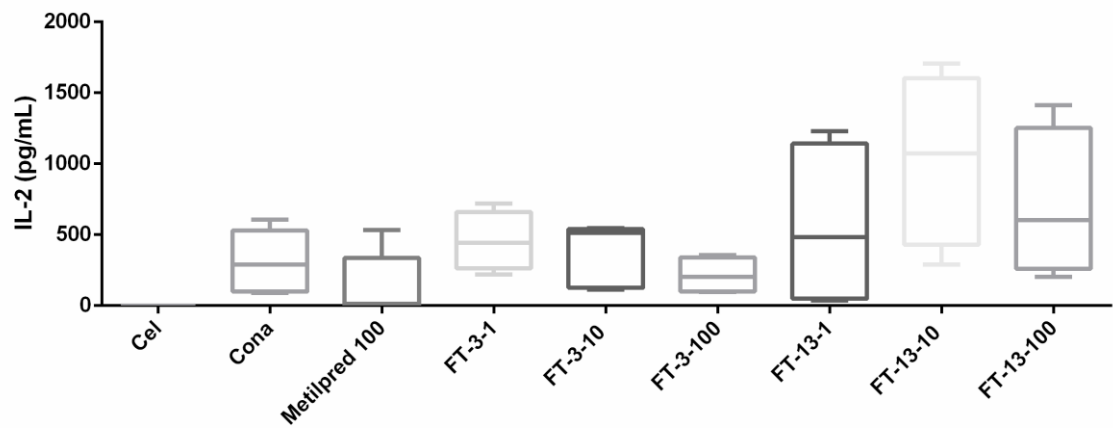
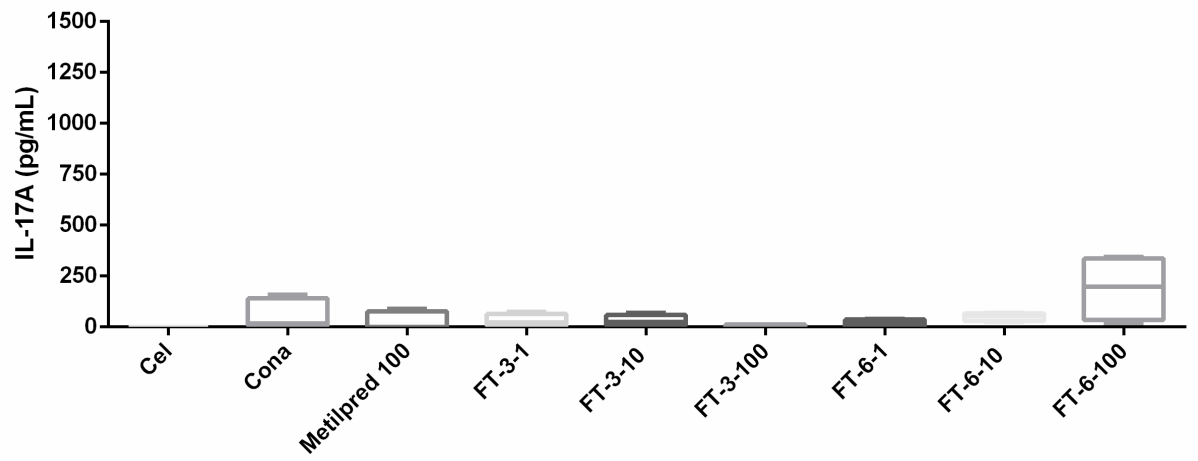


Figure 12. Evaluation of levels of the pro-inflammatory cytokine IL-17A against Balb / C splenocytes treated with phthalimido-thiazolidine-2-4-dione derivatives stimulated with Concanavalin A for 48 hours.



Supplementary material

S1- tables in silico analyze material obtained gene ontology

Pa	Pi	Activity
0.483	0.043	Apoptosisagonist
0.400	0.023	Chemoprotective
0.369	0.048	Antimycobacterial
0.294	0.079	Antipsoriatic
0.276	0.055	Antidiabeticsymptomatic
0.267	0.037	Metabolicdiseasetreatment
		Antiprotozoal
0.250	0.065	(Trichomonas)
0.194	0.082	Thrombolytic
0.187	0.064	Antineoplastic (lymphoma)
0.120	0.054	Antiadrenergic
0.106	0.029	DNA intercalator
0.101	0.065	Allergicrhinitistreatment

S2- tables in silico analyze material obtained gene ontology (ENRICH gene ontology analysis)

	Name	P-value	Adjusted p-value	OddsRatio	Combined score
1	cellular response to cytokine stimulus (GO:0071345)	4.467e-7	0.002279	10.96	160.32
2	negative regulation of anoikis (GO:2000811)	0.000001671	0.004263	125.00	1662.78
3	negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway in absence of ligand (GO:2001240)	0.000006447	0.004700	81.52	974.34
4	negative regulation of	0.000003025	0.005146	10.72	136.27

	Name	P-value	Adjusted p-value	OddsRatio	Combined score
	programmed cell death (GO:0043069)				
5	cytokine-mediated signaling pathway (GO:0019221)	0.000005171	0.005278	7.90	96.15
6	regulation of anoikis (GO:2000209)	0.000004163	0.005311	93.75	1161.49
7	negative regulation of signal transduction in absence of ligand (GO:1901099)	0.000006447	0.005483	81.52	974.34
8	negative regulation of apoptotic process (GO:0043066)	0.000009396	0.005993	9.02	104.42
9	regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway in absence of ligand (GO:2001239)	0.00001060	0.006011	69.44	795.45
10	regulation of apoptotic process (GO:0042981)	0.00003234	0.01650	6.13	63.43
11	intracellular pH elevation (GO:0051454)	0.00003705	0.01719	208.33	2125.67
12	positive regulation of cell proliferation (GO:0008284)	0.00004975	0.02116	8.84	87.63
13	arachidonic acid metabolic process (GO:0019369)	0.00007354	0.02887	36.76	349.92
14	positive regulation of intracellular signal transduction (GO:1902533)	0.00009763	0.03558	7.83	72.29
15	cyclooxygenase pathway (GO:0019371)	0.0001352	0.04599	113.64	1012.38
16	cellular response to	0.0001451	0.04627	29.30	258.94

Name	P-value	Adjusted p-value	OddsRatio	Combined score
decreased oxygen levels (GO:0036294)				

S3- tables in silico analyze material obtained gene ontology (ENRICH gene ontology analysis)

	Name	P-value	Adjusted p-value	OddsRatio	Combined score
1	Serotonergicsynapse	2.287e-8	0.000007044	33.19	583.85
	JAK-STAT				
2	signalingpathway	1.959e-7	0.00003017	23.15	357.54
3	Pathways in cancer	0.000001385	0.0001422	9.43	127.26
4	Arachidonicacidmetabolism	0.000003008	0.0002316	39.68	504.53
5	Chemical carcinogenesis	0.000008647	0.0005326	30.49	355.44
6	Smallcelllungcancer	0.00001426	0.0007319	26.88	299.95
7	PI3K-Akt signalingpathway	0.00001810	0.0007965	10.59	115.67
8	Drugmetabolism	0.00002573	0.0009907	23.15	244.62
9	MicroRNAs in cancer	0.0001044	0.003574	10.45	95.81
10	Acutemyeloidleukemia	0.0001590	0.004896	28.41	248.49
	Neuroactiveligand-receptor				
11	interaction	0.0001852	0.005186	9.25	79.46
	C-type lectin receptor				
12	signaling pathway	0.0006071	0.01558	18.03	133.54
13	AMPK signalingpathway	0.0009202	0.02180	15.63	109.23
	Fluid shear stress and				
14	atherosclerosis	0.001406	0.03093	13.49	88.59
15	Gastriccancer	0.001715	0.03522	12.58	80.14

5.2 ARTIGO 2

Avaliação da atividade antineoplásica do derivado tiazolftalimidico AM1f em células de câncer de próstata.

Flaviana Alves dos Santos^a; Eduardo Davi Lima da Silva; Arsênio Rodrigues Oliveira^c; Ana Cristina Lima Leite^c; Maira Galdino da Rocha Pitta^a; Michelly Cristiny Pereira^a; Ivan da Rocha Pitta^{a,b}; Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo^{a#}

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

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

c-Laboratório de Planejamento em Química Medicinal (LpQM), Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-520, Recife, PE, Brazil.

#Corresponding author: Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

E-mail: moacyr.rego@gmail.com

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

1. Introdução

O câncer é umas das principais causas de morte no Mundo e no Brasil. No mundo segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) no ano de 2018 ocorreram 18 milhões de novos casos de câncer e 9,2 milhões de óbitos. No mundo o câncer de próstata corresponde a 7,1% de todos os casos. Já no Brasil sua incidência é maior chegando a 29,2% (Bray *et al.*, 2018;INCA, 2019).

Apesar do avanço no desenvolvimento de novos quimioterápicos e do uso da terapia multimodal, o câncer de próstata continua tendo uma alta taxa de recidiva e metástase(WANG *et al.*, 2018). As terapias disponíveis são a terapia de privação de andrógenos, a cirurgia, a braquiterapia, a imunoterapia e a quimioterapia. Outras terapias, principalmente para os pacientes com câncer de próstata metastático vem sendo desenvolvidas, como por exemplo, terapia com prótons e íons de carbono ou rádio-223 (GASNIER; PARVIZI, 2017).

Desta forma, o estudo de desenvolvimento de novos fármacos é de fundamental importância. Uma das ferramentas para o desenvolvimento de novos medicamentos é a hibridização molecular. Essa técnica fusiona diferentes grupos farmacofóricos com conhecida atividade na elaboração de novas moléculas que podem conter um ou mais grupos (ZHUANG *et al.*, 2017). Essa estratégia é interessante principalmente no desenvolvimento de novos quimioterápicos pois o novo composto sintetizado pode desempenhar mais de um mecanismo de ação nas células (ASADI *et al.*, 2017).

Neste contexto as ftalimidas possuem diversas atividades biológicas reportadas na literatura, como por exemplo, atividade antiinflamatória(ZAHRAN *et al.*, 2014), leishmanicida(ALIANÇA *et al.*, 2017), antitumoral (ZAHRAN *et al.*, 2018), analgésica (ALANAZI *et al.*, 2015), anticonvulsivante (KAMIŃSKI *et al.*, 2011), antituberculose (AKGÜN *et al.*, 2012) e hipolipêmica(ABDEL-AZIZ *et al.*, 2011). Estudos utilizando análogos e metabólitos da talidomida vêm demonstrando que a ftalimida é um grupamento farmacofórico que desempenha função fundamental para atividade destas moléculas (ZAHRAN *et al.*, 2014).

Outro núcleo farmacofórico importante é o tiazol, um anel heterocíclico presente, em diversas moléculas tanto de ocorrência natural como sintética, que serve de base para a síntese de novas moléculas, pela sua versatilidade (KAUR MANJAL *et al.*, 2017). Muitos medicamentos atualmente disponíveis no mercado

possuem esse arcabouço, como por exemplo, a tiazofurina e dasatinibe (agentes antineoplásicos), ritonavir (fármaco anti-HIV), ravuconazol (agente antifúngico), nitazoxanida (agente antiparasitário), fanetizol, meloxicam e fentiazac (agentes antiinflamatórios), nizatidina (agente antiúlcero-gênico) e tiametoxam (inseticida) (AYATI et al., 2015). Assim neste presente trabalho foi avaliado a atividade antineoplásica frente as células de câncer de próstata estudando sua influência sobre a formação de clone, inibição da migração, ação sobre o ciclo celular além da indução de morte e senescência celular.

2. Metodologia

2.1. Derivado Tiazolftalimidico

A síntese dos derivados AM1b e AM1f encontra-se sobre processo de patenteamento (COA 229). Eles foram sintetizados no Laboratório de Planejamento em Química Medicinal (LpQM). Tanto o derivado AM1b(2-((4-methyl-5-(1-(2-(4-(naphthalen-2-yl)thiazol-2-yl)hydrazono)ethyl)thiazol-2-yl)amino)Isoindoline-1,3-dione) como o derivado AM1f ((2-((5-(1-(2-(4-(4-chlorophenyl)thiazol-2-yl)hydrazono)ethyl)-4-methylthiazol-2-yl)amino)isoindoline-1,3-dione) foram diluídos em dimetilsufóxido (DSMO) para avaliação da sua atividade antineoplásica. A doxorubicina foi utilizada como controle antineoplásico.

2.2. Cultura de células

As linhagens neoplásicas DU-145 (câncer de próstata) e PC-3 (adenocarcinoma de próstata) foram cultivadas em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂ em meio DMEM e F-12, respectivamente, suplementado com 10% de soro fetal bovino. A troca de meio foi realizada sempre que necessário.

2.3. Citotoxicidade em células neoplásicas

O teste de citotoxicidade foi realizado *in vitro* nas células neoplásicas citadas acima nas seguintes concentrações: 1µM, 5µM, 10 µM, 25 µM e 50 µM, além dos controles doxorubicina testado nas concentrações de 0,5, 1,5 e 10 µM, célula e veículo DMSO (0,1% e 0,2%). A citotoxicidade celular foi avaliada pelo método MTT. As células foram plaqueadas 1x10⁴ células por poços em placas de 96 poços e incubadas durante a noite. Após esse período as células foram tratadas por 72 horas e mantidas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Foi adicionado 20 µM da solução de

MTT-sal tetrazolium (0,5 mg/ml) e levado novamente para a estufa por mais 3 horas. Após esse período foi adicionado 130 μ M de SDS 20% para dissolução dos cristais de formazam. As leituras foram feitas em espectrofotômetro de placa, a 570 nm.

2.4. Ensaio clonogênico

Foram plaqueadas 3.10^4 células por poço, em placa de 24 poços e realizado o tratamento nas condições: branco (meio completo), DMSO 0,1% e AM1f na concentração do CI50, nos tempos de 24 e 48h. Em seguida, foi retirado o meio, feita a lavagem com PBS 1x filtrado e as células foram tripsinizadas, centrifugadas e contadas. Após isso, as células foram plaqueadas (300 células por poço de cada condição) em duplicata, numa placa de 6 poços e mantidas na estufa úmida até o surgimento dos clones (14 dias). Depois, as células foram fixadas com Metanol/Acetona na proporção 1:1 por 10 minutos a -20°C e posteriormente foram coradas com cristal violeta 0,1%. Após lavagem com PBS para retirada do excesso do corante foi mantida a temperatura ambiente por 24h e realizada a contagem dos clones, foram realizados os experimentos replicatas técnicas e triplicata de experimentos. Após retiradas as fotos, realizou-se a contagem de colônias.

2.5. Ensaio de avaliação da inibição da migração

As células Du-145 e PC-3 foram plaqueadas em placas de 24 poços na densidade de 1.10^5 células/poço e incubadas a 37°C à 5% CO_2 por 24h. Após atingir aproximadamente 90% de confluência necessária. Em seguida, com o auxílio de uma pipeta P200 foram feitas duas linhas (estrias) perpendiculares em forma de cruz realizado duas lavagens com PBS 1x filtrado. Após a marcação das estrias, as células foram tratadas com o veículo (DMSO 0,1%) e com o derivado AM1f na concentração do CI50. Posteriormente, foram fotografados em um microscópio invertido Leica BZ nos intervalos de 0h, 6h, 12h e 24h. As fotos foram analisadas utilizando o software ImageJ (licença livre) ImageJ (Versão 1.49) (NIH, USA). Em seguida, foram colocados os valores em uma planilha Excel e avaliado correlacionando o percentual de área livre do tempo 0h à área livre nos tempos 6, 12 e 24h.

2.6. Avaliação da inibição do ciclo celular

As células Du-145 e PC-3 foram distribuídas em placas de 6 poços, com 3×10^5 células por poço e incubadas por 24h. Após esse período foi realizado o tratamento na concentração do CI50 e do dobro do CI50 o controle Doxorubicina ($6 \mu\text{M}$) foi utilizado como controle antitumoral. Após 48 horas, as células foram tripsinizadas e lavadas duas vezes com PBS 1x filtrado e fixado em álcool 70% por 2 horas a temperatura ambiente (ou por um período de até 20 dias à -20°C). Posteriormente as células foram marcadas com iodeto de propídeo (5mg/mL)/RNase A ($0,25\text{mg/mL}$) por 30 min ao abrigo da luz e feita a leitura pelo Citômetro de Fluxo Accuri C6. A análise dos resultados foi feita utilizando o Citômetro de fluxo Accuri C6, onde a porcentagem de DNA em cada fase do ciclo foi calculada utilizando o programa C6 software (Becton, Dickinson and Company, USA).

2.7. Avaliação da indução da morte celular

A avaliação da apoptose foi realizada através da dupla marcação com Anexina V-APC e Iodeto de Propídeo (PI). As células foram distribuídas em placas de 6 poços com 3×10^5 células por poço e incubadas por 24h. Após esse período foi realizado o tratamento com a concentração do CI50 e o dobro do CI50 para a linhagem de Du-145 durante 48 e 72 horas. Já para a linhagem PC-3 foram tratadas com o derivado AM1f e o controle antitumoral Doxorubicina durante 48 horas. Após esse período as células foram tripsinizadas e lavadas 2 vezes com solução (10 mM HEPES/NaOH, 140 mM NaCl, $2,5 \text{ mM}$ CaCl_2 -pH 7.4,). Após esse processo as células foram marcadas com $2,5 \mu\text{M}$ iodeto de propídeo (5mg/mL) e $5 \mu\text{M}$ de Anexina V-APC por 30 min protegido da luz, seguida pela leitura no Citômetro de Fluxo Accuri C6 plus (BD).

2.8. Avaliação da indução da senescência celular

As células Du-145 foram plaqueadas em placas de 24 poços com 3×10^4 por poço e incubadas por 24h. Após esse período foi realizado o tratamento com a concentração do CI50 e a metade do CI50 do derivado Am1f e o controle DMSO 0,1% durante 72 horas de incubação. Após esse período o meio foi aspirado e as células foram lavadas duas vezes com 1 ml de PBS 1X. Posteriormente foi adicionado 300 μl por poço de solução de fixação e incubadas durante 7 minutos a temperatura ambiente após esse período as células foram lavadas 2 vezes com 1 ml

de PBS 1X. Em seguida foi adicionada 300 μ l da mistura de coloração, seguindo as recomendações do Kit senescência (CS0030). As placas foram incubadas a 37°C sem CO₂ durante a noite. A coloração das células senescentes é pH dependente. Posteriormente as células foram fotografadas utilizando o utilizando o microscópio invertido e avaliadas qualitativamente através do aumento da expressão da enzima Beta-galactosidase, indicativa de indução de senescência (Leica, BZ).

2.9. Análise estatística

Os cálculos de média, desvio padrão e viabilidade foram realizados utilizando o programa Excel. O CI₅₀ foi calculado a partir da média dos resultados da viabilidade celular dos compostos com o auxílio do programa OriginPro8 (Originlab Corporation®, EUA). Os resultados foram analisados por teste t (Student), utilizando-se o programa GraphPad Prism versão 6 (GraphPad Software®, USA) considerado estatisticamente significativa quando inferiores $p < 0,05$.

3. Resultados

Foi avaliado inicialmente a atividade citotóxica dos derivados AM1b e AM1f, os dois derivados exibiram atividade citotóxica frente as linhagens de próstata Du-145 com CI₅₀ de $17,19 \pm 0,82 \mu\text{M}$ e $14,07 \pm 1,21 \mu\text{M}$ respectivamente. No entanto, frente a linhagem PC-3, somente o derivado AM1f exibiu atividade com CI₅₀ de $24,04 \pm 2,61 \mu\text{M}$. Desta forma os outros ensaios só foram realizados utilizando o derivado AM1f.

Posteriormente foi avaliado a capacidade de inibir a formação de clones após o tratamento com o derivado AM1f durante 24 e 48 horas na concentração do CI₅₀ (figura 1). Na linhagem Du-145 houve a inibição de cerca de 20% da formação de novos clones reduzindo em 24 horas. Já após 48 horas de tratamento não foi observado a diminuição da formação de clones para essa linhagem. Na linhagem PC-3 tanto após 24 horas ($p=0,0331$) como em 48 horas ($p=0,0044$) houve redução significativa na formação de clones tumorais. Houve diminuição de 99% depois de 24 horas e de 100 % em 48 horas (figura 2).

Outro aspecto avaliado foi a capacidade de inibição da migração celular quando tratado com o derivado AM1f em ambas as linhagens avaliadas nesse estudo. Frente a Du-145 o derivado AM1f retardou a migração das células em todos

os tempos avaliados (figura 3). No tempo de 6 horas em comparação a condição tratada somente com veículo (DMSO 0,1%) houve inibição de 10,9% ($p=0,036$). No tempo de 12 horas a condição que só recebeu o veículo tinha migrado 45,5% já a condição tratada tinha migrado 31,54%. Após 24 horas a condição veículo tinha ocupado 75% da área livre, no entanto, às células tratadas 54% ($p=0,0391$). Demonstrando assim que o derivado conseguiu retardar a migração das células de câncer de próstata Du-145.

Na linhagem PC-3 também foi observado o retardo da migração celular (figura 4). No tempo de 6 horas as células tratadas com o veículo tinham migrado 21,32% já as células tratadas somente 7,15%. No tempo de 12 horas foi observado uma migração de 36,44% já na condição tratada com o derivado 29,52%. Assim após 24 horas houve a ocupação de 62,17% da área livre em relação a 49,88% da condição tratada. Esses dados demonstram que em ambas as linhagens de câncer e próstata houve o retardo significativo da migração celular.

Posteriormente foi avaliado a influência do derivado AM1f no ciclo celular (figura 5). Na linhagem Du-145 não foi observado influência sobre o ciclo celular nas concentrações testadas (CI_{50} e $2xCI_{50}$). Já na linhagem PC-3 foi observado influência sobre o ciclo com a indução de um aprisionamento na fase S-G2/M, somente na concentração de $2xCI_{50}$ (figura 6). Houve uma diminuição das células na fase G0/G1 de 54,2% na condição sem tratamento para 15,55% ($p=0,0082$) na condição tratada com o derivado AM1f. Na fase S-G2/M houve o aprisionamento de 80,9% ($p=0,0092$), demonstrando assim influência sobre o ciclo celular. Não foi observado influência da doxorrubicina ($CI_{50}=1 \mu M$, para pc-3 e $CI_{50}=6 \mu M$ na linhagem Du-145) frente a ciclo celular em nenhuma das linhagens avaliadas.

Após a avaliação do ciclo partimos para avaliação da indução da morte, frente a Du-145 avaliamos tanto o CI_{50} como $2xCI_{50}$ nos tempos de 48 e 72 horas (figura 7). Tanto após 48 como 72 horas a concentração do CI_{50} não induziu a morte. Na concentração $2xCI_{50}$ em 72 horas houve um aumento na indução de morte, principalmente no percentual de células duplamente marcadas, caracterizado pela apoptose tardia ou necrose.

Já na linhagem PC-3 foi observado aumento da morte celular caracterizado pelo aumento da apoptose tardia e da necrose, principalmente na condição $2xCI_{50}$. Houve diminuição significativa do percentual de células não marcadas (27,7%; $p=0,0315$) nas células tratadas, além da indução de aumento de 39,46% ($p=0,0441$) das células duplamente marcadas (figura 8).

Foi avaliada na linhagem Du-145 a capacidade de indução da senescência celular do tratamento com o derivado AM1f através da avaliação qualitativa da expressão da enzima beta-galactosidade, quando comparada a condição tratada somente com o veículo (figura 9). Foi Observado aumento da marcação da enzima após 72 horas de tratamento com o derivado AM1f. Esse resultado indica que o derivado pode induzir a senescência celular nas células de câncer de próstata DU-145.

4. Discussão

Os derivados AM1b e AM1f exibiram atividade citotóxica frente linhagem DU-145. Mas frente a linhagem PC-3 somente o derivado AM1f exibiu citotoxicidade. A citotoxicidade demonstrada nesse estudo com CI_{50} entre 14,04 a 24,04 μM . A linhagem PC-3 apresenta uma deleção no gene Kras (gene homólogo do oncogene viral do sarcoma de rato Kirsten, no entanto, a linhagem DU-145 não apresenta essa deleção, sendo assim Kras positiva, esse gene está intimamente ligado a via do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), que exerce influência sobre o crescimento celular. Essas mutações na linhagens podem exercer papel fundamental na resposta ao tratamento (GHIMESSY et al., 2020; BELLUTI et al., 2019). Assim nas linhagens Kras positiva ambos os derivados exibiram atividade citotóxicas já na linhagem Kras nulo somente o derivado AM1f exibiu atividade citotóxica. O derivado AM1b é diferente estruturalmente do derivado AM1f pois o Am1b possui um naftil na posição 2 do anel tiazol já o derivado AM1f possui um cloro-fenil na mesma posição. Essa diferença estrutural provavelmente influenciou na sua atividade. O grupo cloro dá a molécula um perfil mais eletronegativo que pode influenciar na ligação com proteínas e influenciar na sua atividade (ZIMMERMANN et al., 2014).

Belluti et al., 2019 testaram novos derivados ftalimidos ligados a curcumina frente as linhagens de câncer de prostata DU-145 e PC-3 e encontraram CI_{50} entre 7,9 a 23,3 μM . Esses derivados também induziram arrasto no ciclo celular e inibição da migração tanto na linhagem Du-145 como na linhagem PC-3. LI et al., (2018) avaliaram a atividade de novos derivados ftalimídicos frente a linhagem Hep-G2 e além de inibirem a proliferação tumoral induziram alteração no ciclo celular, indução da autofagia e apoptose celular. Cardoso, et al., 2015 avaliou a atividade citotóxica frente a linhagem MDA/MB-435 com CI_{50} entre 5,3 e 7,5 $\mu g/mL$ frente a linhagem

HCT-8 com CI_{50} 5,2e 5,8 μ g/mL além de apresentar atividade imunomoduladora inibindo a produção das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-2 e IL-6.

O derivado AM1f diminuiu a formação de novos clones principalmente na linhagem PC-3 do que Du-145. O ensaio clonogênico é utilizado para determinar os efeitos citotóxicos de vários tratamentos, incluindo quimioterapêuticos e radiação ionizante(FEDR et al., 2013).

Quase 90% das mortes associadas ao câncer é atribuída à disseminação metastática da doença e não ao tumor primário propriamente dito (ZHENG et al., 2013). Desta forma inibir a migração celular das células neoplásica é de fundamental importância para evitar o desenvolvimento de metástases. O derivado AM1f inibiu a migração tanto das células Du-145 como da PC-3.

O derivado AM1f não influenciou na progressão do ciclo celular na linhagem Du-145, no entanto na linhagem PC-3 utilizando $2xCI_{50}$ induziu um arrasto na fase S-G2/M. A indução do arrasto do ciclo celular é uma estratégia interessante para um novo agente antitumoral. Chagas *et al.*, (2017) avaliou a atividade de derivados tiazacridínicos como também encontrou arrasto no ciclo celular na fase G2/M em células Raji (leucemia de células T0 e Jukart (Linfoma de Burkitt). Interferir na divisão celular para tratar o câncer é uma estratégia que se mostrou altamente bem-sucedido na eliminação de células tumorais. O alcalóides da vinca e taxanos interferem na dinâmica dos microtúbulos desta forma induzem a morte celular por impedir que o fuso mitótico se ligue e que a divisão ocorra. Esses medicamentos são usados para tratar pacientes com diferentes tipos de câncer hematopoiéticos ou sólido há mais de 20 anos (HASCHKA et al., 2018).

O derivado AM1f induziu o aumento da apoptose e da necrose na concentração do dobro do CI_{50} induzindo o aumento de morte para 72,3%. As células tumorais inibe a apoptose celular, por aumento da expressão de proteínas antiapoptóticas, desta forma induzir o aumento desse evento é uma estratégia para o desenvolvimento de novos derivados antitumorais (SANTOS et al., 2016).

O derivado AM1f induziu o aumento da expressão de beta-galactosidade indicando que o tratamento pode levar a um aumento da senescência celular. NARESH et al., 2014 demonstrou que derivados oxazolidínicos também induziram a senescência celular na linhagem de câncer de próstata Du-145 entre 5 e 25 μ M. A senescência celular é um processo patológico no qual as células perdem sua capacidade proliferativa mas permanecem metabolicamente ativas, desta forma esse processo não é considerado um tipo de morte celular(GALLUZZI; VITALE,

2018). No entanto impedir a capacidade proliferativa das células tumorais é uma estratégia interessante, desta forma foram desenvolvidos compostos indutores de senescência, incluindo inibidores de CDK4/6, como Abemaciclib, Palbociclib e Ribociclib. Essa classe de medicamentos mostrou-se promissora no tratamento de vários cânceres em estudos pré-clínicos e clínicos, principalmente em uso combinado com outras terapias já existentes (SIEBEN et al., 2018).

As linhagens Du-145 e PC-3 são ambas linhagens de câncer de próstata que possuem o fenótipo do tipo não luminal, no entanto, elas guardam algumas diferenças diferem no status do gene *p53* e na expressão de PTEN. As células PC3 não expressão *p53*, elas possuem a deleção desse gene, já as células DU-145 expressam *p53* mutante (P223L / V274F). No entanto em relação ao gene antiapoptótico PTEN, um dos genes frequentemente mutados no câncer de próstata, na linhagem PC3 elas não expressão PTEN. Já as células DU-145 possuem a proteína funcional (BELLUTI et al., 2019). Na linhagem Du-145 que é Kras positiva, *p53* e PTEN houve a indução de senescência celular já na linhagem PC-3 que é Kras, *p53* e PTEN negativas houve a indução de morte celular por necrose e apoptose celular além de influenciar na migração e na capacidade de formação de novos clones. Essas diferenças na expressão de proteínas que regulam o ciclo celular e que influenciam no crescimento e indução de morte das células pode justificar diferenças nos resultados encontrados.

5. Conclusão

Os derivados avaliados apresentaram citotoxicidade em ambas as linhagens de câncer de próstata. O derivado AM1f demonstrou efeito diferentes nas linhagens celulares tanto na indução de morte, na migração celular e inibição na formação de clones. Houve inibição a formação de colônias principalmente na linhagem PC-3. E redução da migração em ambas as linhagens, além de causar arrasto sobre o ciclo celular somente na linhagem PC-3. Em relação a indução de morte houve indução de necrose e apoptose tardia também na linhagem PC-3, mas não na Du-145. Também foi demonstrado que o derivado AM1f induza senescência celular na linhagem Du-145.

6. Referência

- ABDEL-AZIZ, A. A. M. et al. Synthesis and biological evaluation of some novel cyclic-imides as hypoglycaemic, anti-hyperlipidemic agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 4324–4329, 2011.
- AKGÜN, H. et al. Synthesis and antimycobacterial activity of some phthalimide derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 13, p. 4149–4154, 2012.
- ALANAZI, A. M. et al. Structure-based design of phthalimide derivatives as potential cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: Anti-inflammatory and analgesic activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 92, p. 115–123, 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, p. 1–10, 2017.
- ASADI, P. et al. Synthesis, characterization, molecular docking studies and biological evaluation of some novel hybrids based on quinazolinone, benzofuran and imidazolium moieties as potential cytotoxic and antimicrobial agents. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 20, n. 9, p. 975–989, 2017.
- AYATI, A. et al. Recent applications of 1,3-thiazole core structure in the identification of new lead compounds and drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, n. 1, p. 699–718, 2015.
- BELLUTI, S. et al. Potent anti-cancer properties of phthalimide-based curcumin derivatives on prostate tumor cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 1, 2019.
- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.
- CARDOSO, M. V. D. O. 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.
- CHAGAS, M. et al. New thiazacridine agents: Synthesis, physical and chemical characterization, and in vitro anticancer evaluation. **Human & Experimental Toxicology**, v. 36, n. 10, p. 1059–1070, 2017.
- FEDR, R. et al. Automatic cell cloning assay for determining the clonogenic capacity of cancer and cancer stem-like cells. **Cytometry Part A**, v. 83 A, n. 5, p. 472–482, 2013.
- GALLUZZI, L.; VITALE, I. Molecular mechanisms of cell death : recommendations of

- the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, p. 486–541, 2018.
- GASNIER, A.; PARVIZI, N. Updates on the diagnosis and treatment of prostate cancer. **British Journal of Radiology**, v. 90, n. 1075, p. 2–4, 2017.
- GHIMESSY, A. et al. Current therapy of KRAS-mutant lung cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 39, p. 1159–1177, 2020.
- HASCHKA, M. et al. Perturbing mitosis for anti-cancer therapy: is cell death the only answer? **EMBO reports**, v. 19, n. 3, p. 1–20, 2018.
- INCA. **Estimativa 2020**. [s.l: s.n.].
- KAMIŃSKI, K. et al. Synthesis and anticonvulsant properties of new acetamide derivatives of phthalimide, and its saturated cyclohexane and norbornene analogs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 4634–4641, 2011.
- KAUR MANJAL, S. et al. Synthetic and medicinal perspective of thiazolidinones: A review. **Bioorganic Chemistry**, v. 75, p. 406–423, 2017.
- LI, W. et al. Phthalimide conjugations for the degradation of oncogenic PI3K. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 151, p. 237–247, 2018.
- NARESH, A. et al. Oxazolidinone derivatives: Cytoxazone–Linezolid hybrids induces apoptosis and senescence in DU145 prostate cancer cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 80, p. 295–307, 2014.
- SANTOS, T. A. R. 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.
- SIEBEN, C. J. et al. Two-step senescence-focused cancer therapies. **Trends Cell Biol.**, v. 28, n. 9, p. 723–737, 2018.
- WANG, G. et al. Genetics and biology of prostate cancer. **Genes and Development**, v. 32, n. 17–18, p. 1105–1140, 2018.
- ZAHRAN, M. A. H. et al. Synthesis and evaluation of thalidomide and phthalimide esters as antitumor agents. **Archiv der Pharmazie**, v. 347, n. 9, p. 642–649, 2014.
- ZAHRAN, M. A. H. et al. Design, synthesis, biological evaluations, molecular docking, and in vivo studies of novel phthalimide analogs. **Archiv der Pharmazie**, n. March, p. 1–12, 2018.
- ZHENG, S. et al. Discovery of a series of thiazole derivatives as novel inhibitors of metastatic cancer cell migration and invasion. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 4, n. 2, p. 191–196, 2013.
- ZHUANG, C. et al. Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry.

Chemical Reviews, v. 117, n. 12, p. 7762–7810, 2017.

ZIMMERMANN, M. O. et al. Halogen-enriched fragment libraries as chemical probes for harnessing halogen bonding in fragment-based lead discovery. **Future Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 6, p. 617–639, 2014.

Figuras

Figura 1. Avaliação da inibição da formação de clones celulares de Du-145 tratados após 24 e 48 horas com o derivado AM1f.

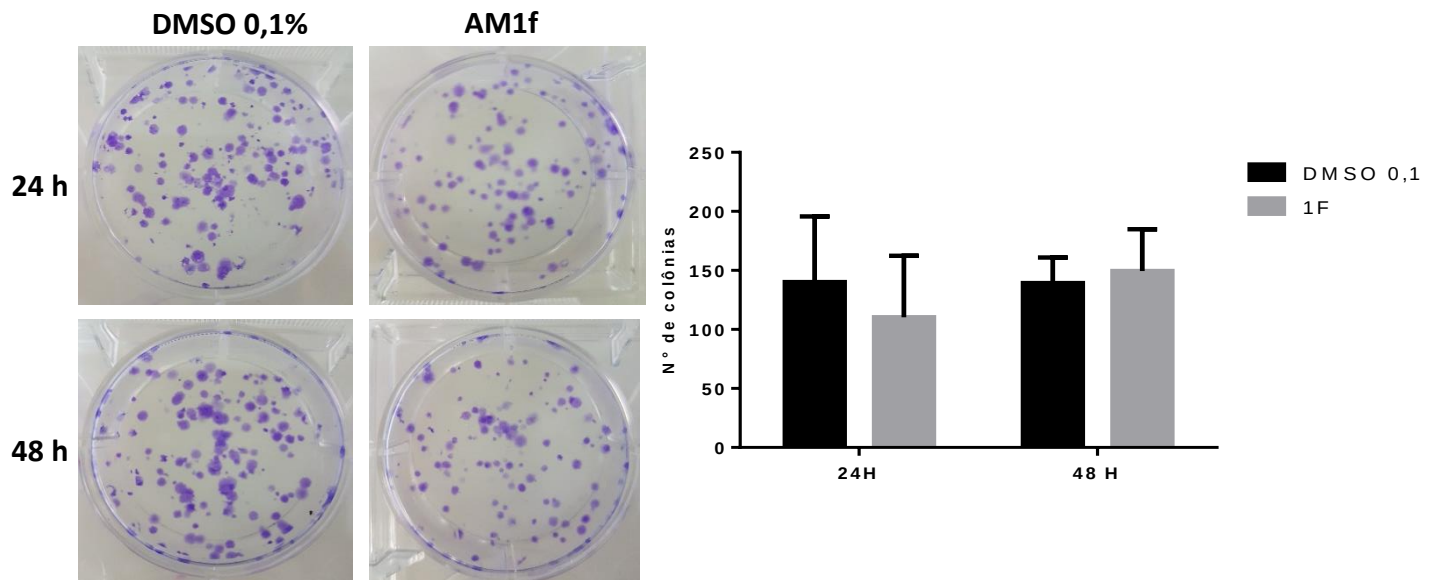


Figura 2. Avaliação da inibição da formação de clones celulares de PC-3 tratados após 24 e 48 horas com o derivado AM1f.

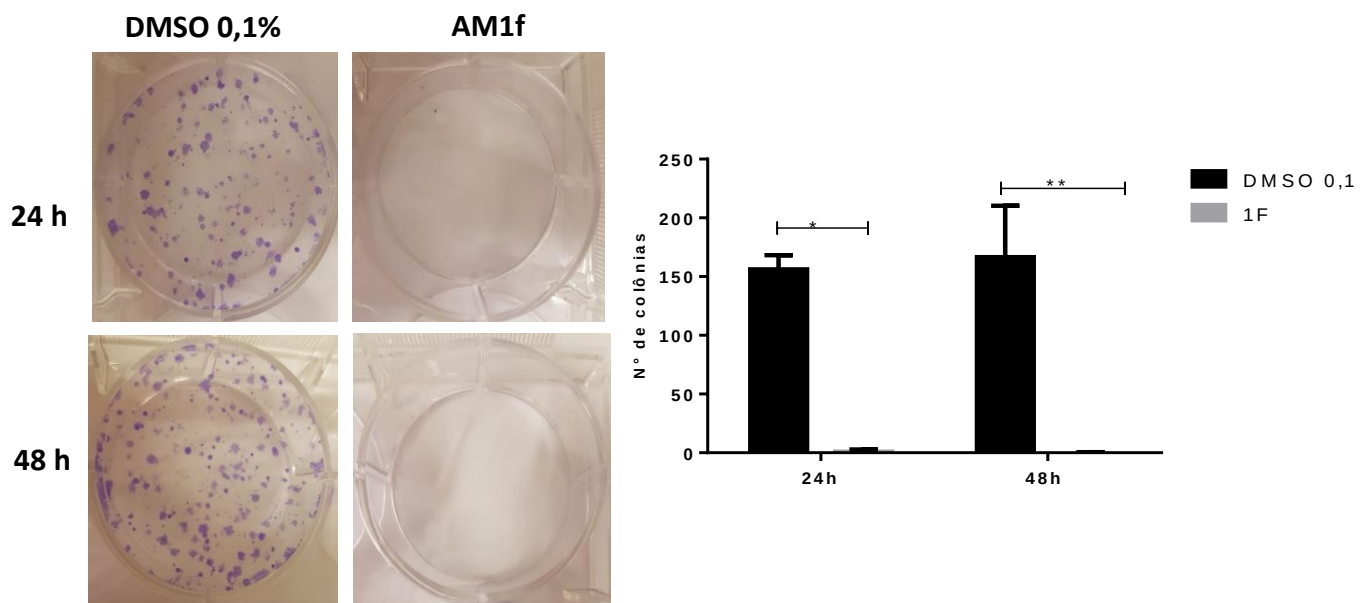


Figura 3. Avaliação da inibição da migração celular na linhagem de câncer de próstata Du-145 tratados durante 6, 12 e 24 horas com o derivado AM1f e com o veículo (DMSO 0,1%).

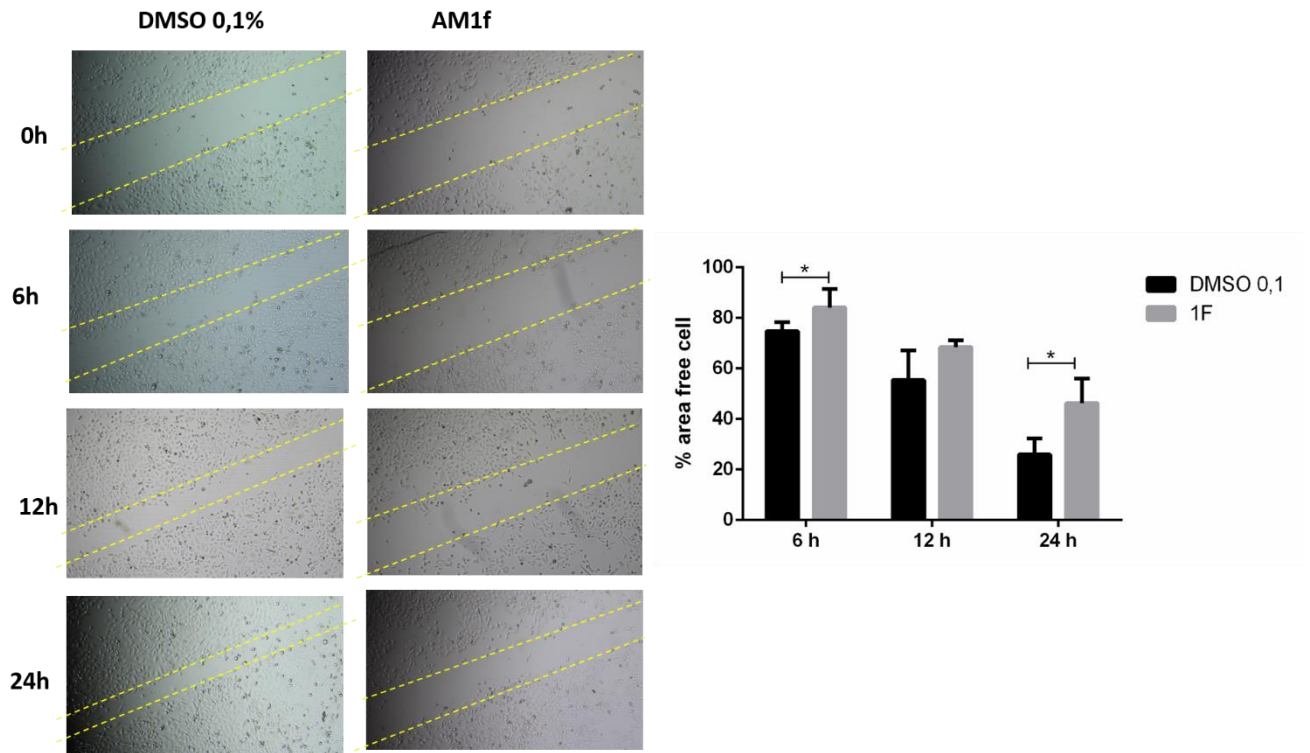


Figura 4. Avaliação da inibição da migração celular na linhagem de câncer de próstata PC-3 tratados durante 6, 12 e 24 horas com o derivado AM1f e com o veículo (DMSO 0,1%). Sem diferença estatisticamente significativa.

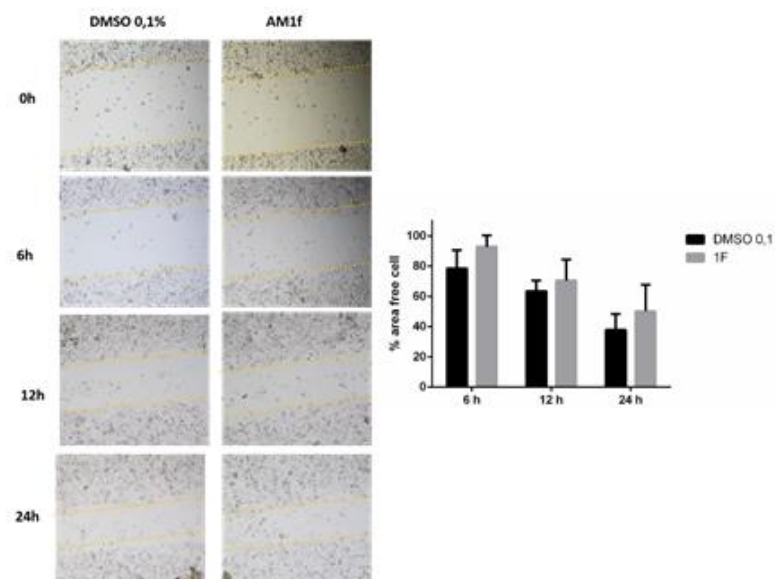


Figura 5. Avaliação da influência sobre o ciclo celular do tratamento com Cl_{50} e o dobro do Cl_{50} tratado com o derivado AM1f e a condição sem tratamento na linhagem de câncer de próstata Du-145 tratados 48 horas.

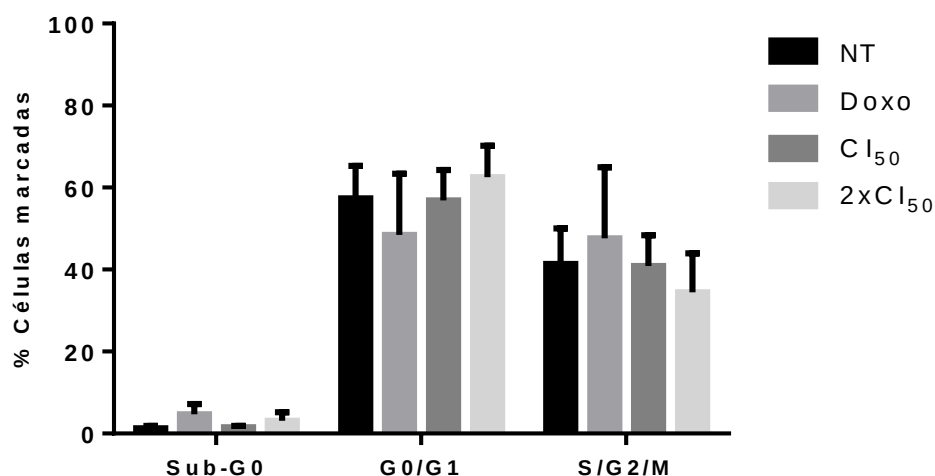


Figura 6. Avaliação da influência sobre o ciclo celular do tratamento com Cl_{50} e o dobro do Cl_{50} tratado com o derivado AM1f e a condição sem tratamento (controle positivo) na linhagem de câncer de próstata PC-3 tratados 48 horas.

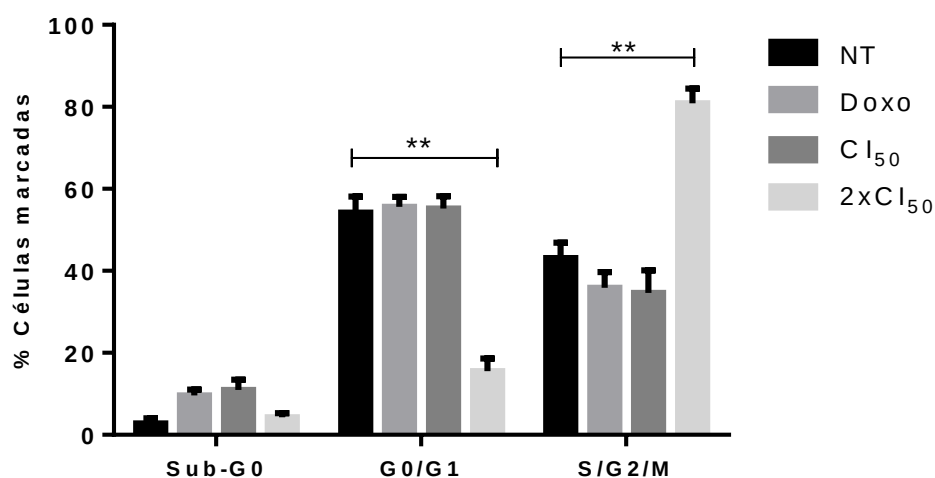


Figura 7. Avaliação da indução da morte celular durante 48(a) e 72 horas(b) do tratamento com Cl_{50} , dobro do Cl_{50} ($2 \times Cl_{50}$) do derivado AM1f, da condição sem tratamento (controle negativo) e do Doxorubicina (controle positivo) na linhagem de câncer de próstata Du-145. (DN= Duplamente negativo; Apop+ = Apoptose inicial; Necro+ = Necrose; DP= Duplamente positivo.)

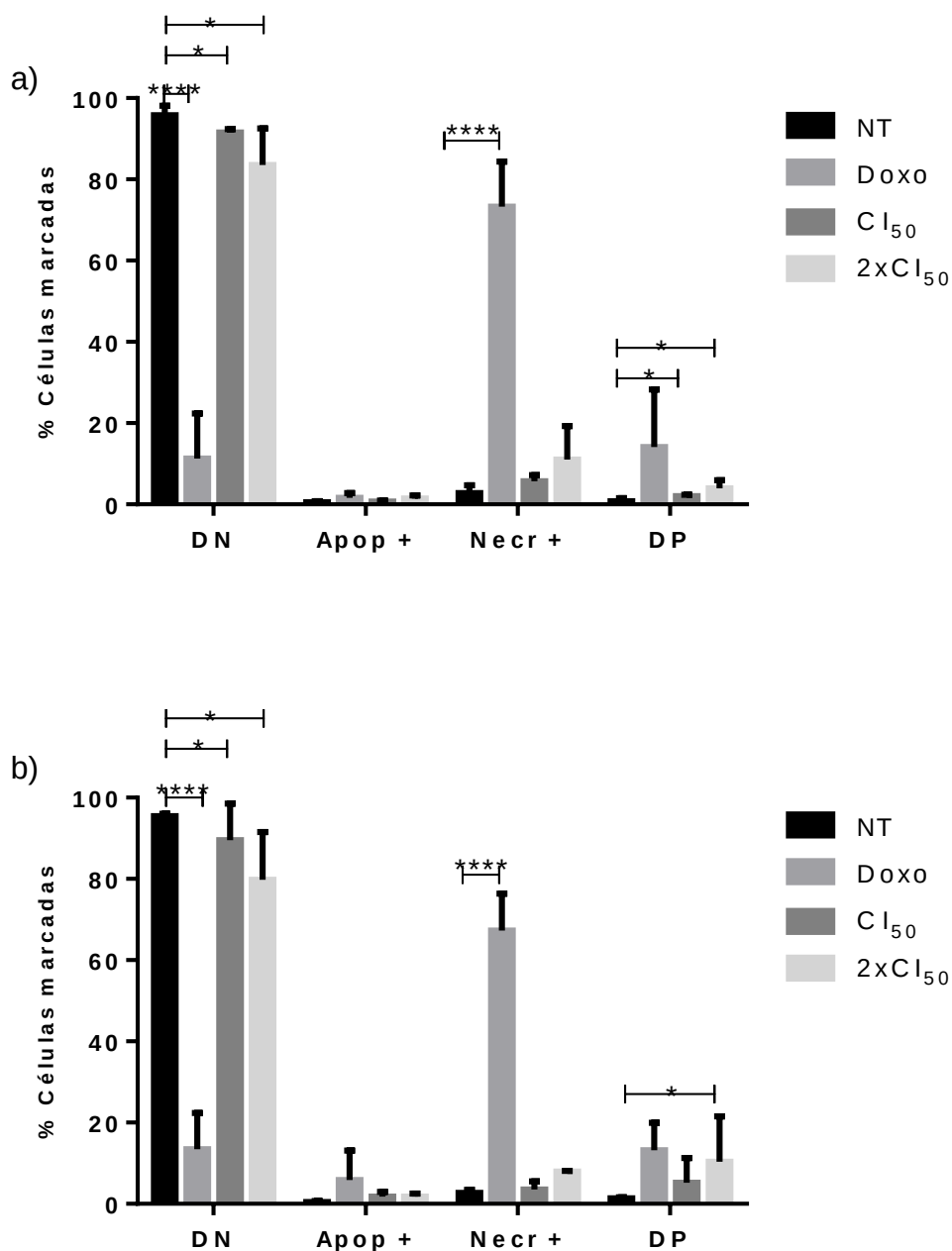


Figura 7. Avaliação da indução da morte celular durante 48 do tratamento com CI₅₀, dobro do CI₅₀ do derivado AM1f, da condição sem tratamento (controle negativo) e do Doxorubicina (controle positivo) na linhagem de câncer de próstata PC-3. (DN= Duplamente negativo; Apop+ = Apoptose inicial; Necro+ = Necrose; DP= Duplamente positivo.)

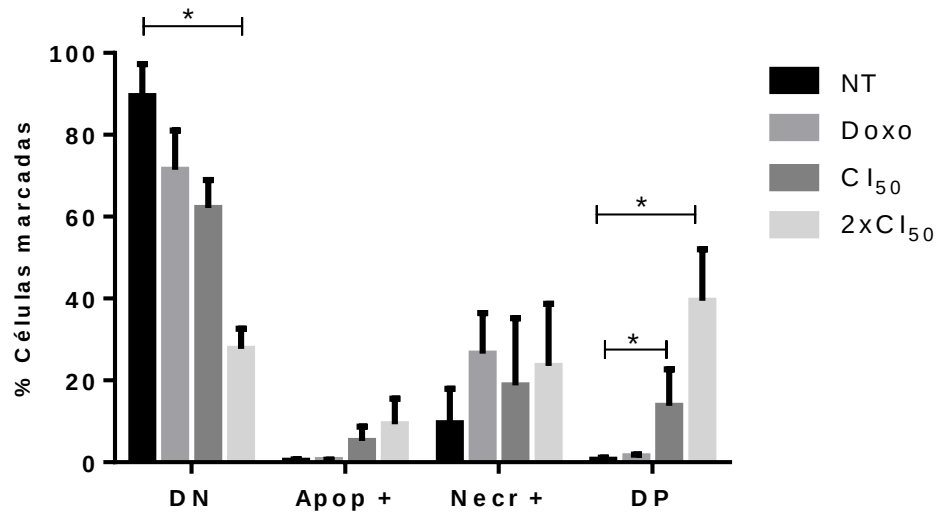
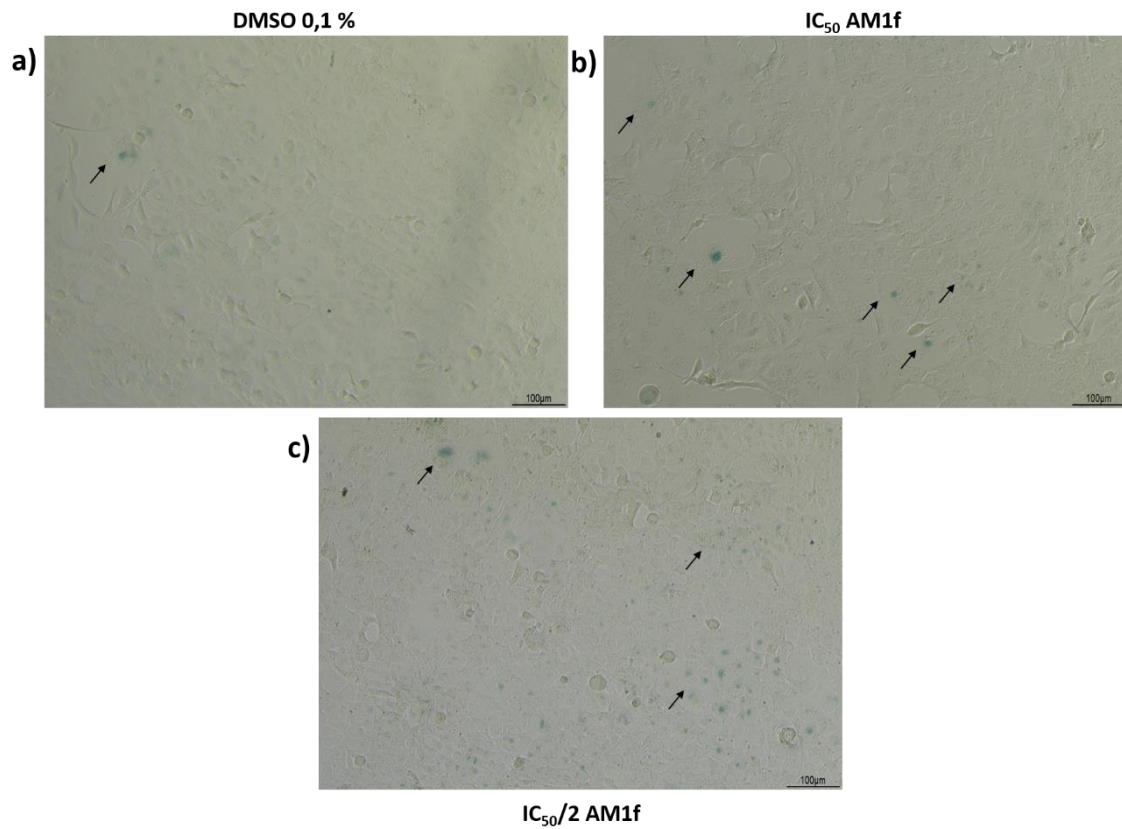


Figura 7. Avaliação da indução de senescência celular após 72 horas do tratamento com C_{I50} (b), com metade do C_{I50} (c) do derivado AM1f e a condição somente com o veículo DMSO 0,1% (controle negativo) na linhagem de câncer de próstata Du-145.



5.3 ARTIGO 3

Avaliação da citotoxicidade do derivado AM1F em células de câncer de pâncreas e da toxicidade aguda e subcrônica

Flaviana Alves dos Santos^a; Aldilane Gonçalves da Fonseca; Arsênio Rodrigues Oliveira^c; Ana Cristina Lima Leite^c; Maira Galdino da Rocha Pitta^a; Michelly Cristiny Pereira^a; Ivan da Rocha Pitta^{a,b}; Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo^{a#}

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

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

c-Laboratório de Planejamento em Química Medicinal (LpQM), Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-520, Recife, PE, Brazil.

d- Laboratório de Pesquisa em Bioquímica Clínica e Experimental, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil.

#Corresponding author: Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

E-mail: moacyr.rego@gmail.com

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

1. Introdução

O câncer de pâncreas é um dos cânceres mais letais em países desenvolvidos e no mundo. O adenocarcinoma ductal pancreático (PDA) é a neoplasia mais comum e letal resultando em mais de 250.000 mortes por ano em todo o mundo, sendo considerada a sétima causa de morte em todo o mundo (ILIC; ILIC, 2016; MCGUIGAN et al., 2018).

O único tratamento considerado potencialmente curativo é a ressecção cirúrgica. No entanto cerca de 15 a 20 % não são candidatos a intervenção cirúrgica devido ao diagnóstico tardio da doença. Outro fato importante é a baixíssima sobrevida em cinco anos após a pancreaticoduodenectomia é de 25 a 30%. Assim a maioria dos pacientes com PDA se beneficiam somente dos tratamentos paliativos (TEMPERO, 2019; FOGEL et al., 2017).

Embora a gemcitabina ainda é o quimioterápico padrão, no entanto, ele produz apenas um modesto aumento na sobrevida dos pacientes. Alguns pacientes podem se beneficiar da quimioterapia combinada clássica do combo FOLFIRINOX (oxaliplatina, irinotecano, leucovorina e 5-fluorouracil), que alcançou um benefício significativo na sobrevida de pacientes com PDA metastático em comparação à gemcitabina (11,1 versus 6,8 meses). No entanto, essa combinação é indicada apenas para pacientes com bom estado de saúde devido ao aumento da toxicidade. Portanto, novas abordagens são extremamente necessárias para a grande maioria dos pacientes com PDA (FEIG et al., 2012).

A hibridização molecular é uma técnica que funde um ou mais grupos farmacofóricos diferentes que já tenham alguma atividade relatada na literatura (ZHUANG et al., 2017). Essa estratégia visa aumentar ou potencializar a ação de novas moléculas visando o desenvolvimento de novos medicamentos (ASADI et al., 2017).

Os compostos heterocíclicos, como o anel tiazol possui papel crucial nos sistemas biológicos com diversas atividades biológicas como por exemplo, atividade antineoplásica, antiviral, antifúngica, antiparasitária e antiinflamatória (AYATI et al., 2015). Os derivados tiazóis exercem efeitos na inibição do crescimento e proliferação de células tumorais (CHAGAS et al., 2017; SALEM et al., 2016). O Dasatinib que é um representante da classe dos tiazóis é utilizado no tratamento de pacientes portadores de leucemia mieloide crônica e leucemia linfoblástica aguda que

apresentem mutação no cromossomo Filadélfia, esse medicamento age inibindo a proteína quinase tumoral BCR/ABL (ZHENG et al., 2013a).

Estudos de relação estrutura-atividade (SARs) utilizando análogos e metabólitos da talidomida vêm demonstrando que a ftalimida é um fragmento farmacofórico fundamental para sua atividade (ZAHARAN et al., 2014). A lenalidomida, um derivado que possui o anel ftalimidico, é um medicamento imunomodulador que é utilizada para o tratamento de mieloma múltiplo, linfomas e leucemia crônica linfocítica (KIM et al., 2017). Desta forma esse grupo tem sido empregado no planejamento de potenciais candidatos a fármacos. Assim avaliamos a atividade antineoplásica dos derivados tiazol-ftalimidicos AM1b e AM1f frente as células de câncer de pâncreas como também toxicidade aguda e subcrônica por via oral dos derivados.

2. Metodologia

2.1. Derivado Tiazol-ftalimidico

A síntese dos derivados AM1b e AM1f está sobre processo de patenteamento (COA 229). Eles foram sintetizados no Laboratório de Planejamento em Química Medicinal (LpQM). Tanto o derivado AM1b (2-((4-methyl-5-(1-(2-(4-(naphthalen-2-yl)thiazol-2-yl)hydrazono)ethyl)thiazol-2-yl)amino) Isoindoline-1,3-dione) como o derivado AM1f ((2-((5-(1-(2-(4-(4-chlorophenyl)thiazol-2-yl)hydrazono)ethyl)-4-methylthiazol-2-yl)amino) isoindoline-1,3-dione) foram diluídos em DMSO para avaliação da sua atividade antineoplásica. A doxorrubicina foi utilizada como controle antineoplásico.

2.2. Cultura de células

As linhagens neoplásicas Panc-1 (carcinoma pancreático) e Mia-paca-2 (carcinoma pancreático) foram cultivadas a 37°C contendo 5% de CO₂ em meio DMEM Low glicose e DMEM High glicose, respectivamente, suplementado com 10% de soro fetal bovino. Na linhagem Mia-paca-2 também foi suplementada com 2,5% de soro de cavalo. A troca de meio foi realizada sempre que necessário. O repique das células aderentes foi utilizado tripsina/EDTA (0,25%).

2.3. Citotoxicidade em células neoplásicas

O teste de citotoxicidade foi realizado para avaliação da citotoxicidade utilizando o método do MTT. O teste foi realizado *in vitro* nas células neoplásicas citadas acima nas seguintes concentrações: 1µM, 5µM, 10 µM, 25 µM e 50 µM, além dos controles positivos doxorrubicina, célula e veículo DMSO, controle negativo, (0,1% e 0,2%). As células foram plaqueadas 1×10^4 células por poços em placas de 96 poços incubadas overnight. Depois desse período as células foram tratadas por 72 horas e mantidas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Foi adicionado aos poços 20 µM da solução de MTT-sal tetrazolium (0,5 mg/ml) e levado novamente para a estufa por mais 3 horas. Depois desse tempo foi adicionado 130 µM de SDS 20% para dissolução do precipitado e as leituras foram feitas em espectrofotômetro de placa, a 570 nm.

2.4. Ensaio clonogênico

As células Panc-1 e Mia-paca-2 foram plaqueadas $3 \cdot 10^4$ células por poço, em placa de 24 poços e realizado o tratamento nas condições: Não tratadas (meio completo), DMSO 0,1% e AM1f nas concentrações de seus CI₅₀, nos tempos de 24 e 48h. Posteriormente o meio foi retirado e foi feita uma lavagem com PBS 1x filtrado. Posteriormente as células foram tripsinizadas e centrifugadas e contadas. Após essas etapas, as células plaqueadas 300 células por poço de cada condição, em duplicata de poços, numa placa de 6 poços e mantidas na estufa úmida até o surgimento dos clones. Após 14 dias o meio foi retirado e as células foram lavadas com PBS 1x depois as células foram fixadas com Metanol/Acetona na proporção 1:1 por 10 minutos a -20°C e posteriormente foram coradas com cristal violeta 0,1%, após a lavagem com PBS para retirada do excesso do corante foi mantida a temperatura ambiente por 24h e realizada a contagem dos clones, foram realizados os experimentos em duplicata de poços e triplicata de experimentos. Após a retiradas as fotos, realizou-se a contagem de colônias.

2.5. Ensaio de avaliação da inibição da migração

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços na densidade de $1 \cdot 10^5$ células/poço e incubadas a 37°C à 5% CO₂ por 24h. Após atingir aproximadamente 90% de confluência necessária, com o auxílio de uma pipeta P200 foram feitas duas linhas (estrias) perpendiculares em forma de cruz realizado duas lavagens com PBS 1x filtrado. Depois as células foram tratadas com o controle (DMSO 0,1%) e o com o derivado AM1f na concentração do CI₅₀. Posteriormente, foram fotografados

em um microscópio invertido Leica BZ nos intervalos de 0h, 6h, 12h e 24h. As fotos foram analisadas utilizando o software ImageJ (licença livre) ImageJ. (Versão 1.49) (NIH, USA). Em seguida, foram colocados os valores em uma planilha Excel e avaliado correlacionando o percentual de área livre do tempo 0h à área livre nos tempos 6, 12 e 24h.

2.6. Avaliação da inibição do ciclo celular

As células Pac-1 e Mia-paca-2 foram plaqueadas em placas de 6 poços, com 3×10^5 células por poço e incubadas por 24h. Após esse período foi realizado o tratamento na concentração do CI50 e do dobro do CI50 o (controle positivo) Doxorubicina foi utilizado como controle antitumoral. Depois de 48 horas, as células foram tripsinizadas e lavadas duas vezes com PBS 1x filtrado e fixado em álcool 70% por 2 horas a temperatura ambiente (ou por um período de até 20 dias à -20°C). Posteriormente as células foram marcadas com iodeto de propídio (5mg/mL)/RNase A (0,25mg/mL) por 30 min ao abrigo da luz e feita a leitura pelo Citômetro de Fluxo Accuri C6. A análise dos resultados foi feita utilizando o Citômetro de fluxo Accuri C6 plus, onde a porcentagem de DNA em cada fase do ciclo foi calculada utilizando o programa C6 software (Becton, Dickinson and Company, USA).

2.7. Avaliação da indução da morte celular

A avaliação da morte celular foi realizada através da dupla marcação com Anexina V-APC e Iodeto de Propídio (PI). As células foram distribuídas em placas de 6 poços com 3×10^5 células por poço e incubadas por 24h. Depois desse tempo foi realizado o tratamento com a dose do CI50 e o dobro do CI50 para a linhagem de Panc-1 e Mia-paca-2 com o derivado AM1f e o controle antitumoral Doxorubicina durante 48 horas. Posteriormente as células foram tripsinizadas e lavadas 2 vezes com solução (10 mM HEPES/NaOH, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2 - pH 7.4.). Após esse processo as células foram marcadas com 2,5 μM iodeto de propídio (5mg/mL) e 5 μM de Anexina V-APC por 30 min protegido da luz, seguida pela leitura no Citômetro de Fluxo Accuri C6 plus (BD).

2.8. Avaliação da indução da senescência celular

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços com 3×10^4 por poço e incubadas por 24h. Posteriormente foi realizado o tratamento com a dose do CI50 e a metade do CI50 do derivado AM1f e o controle DMSO 0,1%(veículo) durante 72 horas de incubação. Após esse período o meio foi aspirado e as células lavadas duas vezes com 1 ml de PBS 1X. Posteriormente foi adicionado 300 µl por poço de solução de fixação e incubadas durante 7 minutos a temperatura ambiente após esse período as células foram lavadas 2 vezes com 1 ml de PBS 1X. Depois foi adicionada 300 µl da mistura de coloração, seguindo as recomendações do Kit senescência (CS0030). As placas foram incubadas a 37 °C sem CO₂ durante a noite. A coloração das células senescentes é o pH dependente. Posteriormente as células lavadas com PBS 1X e depois as células foram fotografadas utilizando o microscópio invertido (Leica, BZ). A análise foi realizada de forma qualitativa através da observação dos campos fotografados (10 campos por condição).

2.9. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E SUB-CRÔNICA

Os compostos AM1B e AM1F foram diluídos em DMSO puro e completada a solução para concentração final de DMSO 2%. Camundongos *Swiss* (linhagem *Mus musculus*) adultos, de ambos os sexos (fêmeas nulíparas e não grávidas), foram divididos aleatoriamente em grupos controle e teste para todas as avaliações. Os animais foram mantidos no biotério do Centro de Ciências da Saúde da UFRN, sob condições controladas de iluminação (ciclo 12h claro/escuro) e de temperatura (23 ± 2 °C) recebendo ração comercial (Supralab® - Supra) e água *ad libitum* (CONCEA, 2015; MCTI, 2016). Os protocolos experimentais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética de Uso Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, sob número 087.008/2018.

2.9.1. Avaliação Toxicológica *in vivo*

2.9.2. Análise de Toxicidade Aguda

Uma avaliação prévia foi realizada, na qual foram utilizados 2 animais (fêmeas), que receberam duas doses diferentes dos compostos, foi selecionada a dose máxima a ser testada foi de 8mg/Kg, a qual não induziu os camundongos à morte. Após esta observação, o grupo teste (6 machos e 6 fêmeas) recebeu por

gavagem a dose selecionada dos compostos e o grupo controle (6 machos e 6 fêmeas) recebeu o mesmo volume de solução DMSO 2% também por gavagem. Todos os animais (testes e controles) foram observados cuidadosamente durante as primeiras 24 horas (pesquisa de sinais tóxicos imediatos) e diariamente durante o período de 14 dias (pesquisa de sinais tóxicos retardados agudos). Ao final, todos foram anestesiados com tiopental 50mg/Kg associado a Lidocaína 2% 10 mg/Kg, e eutanasiados por deslocamento cervical, de acordo com as Normativas do CONCEA (2015). Amostras de sangue foram coletadas para análises hematológicas ou bioquímicas e órgãos selecionados (fígado, estômago, rins direito e esquerdo e baço) para avaliação macroscópica.

2.9.3 Análise de Toxicidade Subcrônica

Grupos testes (5 machos e 5 fêmeas) foram tratados por gavagem durante um período de 30 dias com diferentes doses dos compostos que foram 2, 4 e 8 mg/Kg, definidas pelo ensaio da toxicidade aguda. Os grupos controles (5 machos e 5 fêmeas) receberam o mesmo volume de solução DMSO 2% também por gavagem. O consumo de ração e água, assim como o peso corporal, foram medidos três dias por semana. Durante o período experimental, todos os animais foram observados cuidadosamente e qualquer sinal de toxicidade foi avaliado.

2.9.4 Avaliação hematológica

De todos os animais foram obtidas amostras sanguíneas por punção cardíaca, após a anestesia com Tiopental (Tiopentax®, Cristália) associado a Lidocaína 10 mg/Kg. Essas amostras foram homogeneizadas com proporções adequadas do anticoagulante EDTA 1% para a realização do hemograma. Foi utilizado o analisador hematológico automatizado ABX Micros ES60 (HORIBA ABX Diagnostics) para obter o número total de eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$), hematócrito (%), hemoglobina, contagem global de hemácias, leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$) e plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$), contagem diferencial de leucócitos (%), concentração de hemoglobina (g/dL) e determinação do hematócrito (%) e dos índices hematimétricos, tais como: volume corpuscular médio (VCM, fL), hemoglobina corpuscular média (HCM, pg) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM, %).

2.9.5 Avaliação bioquímica

As amostras sanguíneas foram centrifugadas (3000 rpm/10 min.) para obtenção dos soros, com os quais foram analisados o perfil lipídico, a glicemia, a função renal e a função hepática dos animais. O perfil lipídico foi avaliado a partir das dosagens de triglicerídeos (TG) e colesterol total (CT). A glicemia foi determinada para avaliar a influência causada pela administração do composto nos animais teste em comparação aos controles. Para avaliar a função renal foram analisadas as concentrações séricas de creatinina e ureia, enquanto a análise das atividades das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) e proteínas totais (PT) avaliaram a função hepática, como também foi analisada a dosagem de albumina. As determinações das concentrações séricas de glicose, CT e TG foram realizadas por ensaios enzimático-colorimétricos, enquanto as dosagens de AST, ALT, uréia e creatinina foram realizadas por ensaios enzimáticos. Todas as determinações utilizaram kits Labtest Diagnóstica apropriados ao analisador bioquímico automatizado LabmaxPlenno (Labtest Diagnóstica, Minas Gerais, Brasil).

2.9.6 Avaliação dos órgãos

Após a eutanásia dos animais, foram retirados os seguintes órgãos (fígado, estômago, baço, rins, pulmão e coração) para a análise macroscópica e pesagem dos órgãos. Foi calculada a razão peso do órgão/peso total do animal.

2.10. Análise estatística

Os cálculos de média, desvio padrão e viabilidade foram realizados utilizando o programa Excel. O CI50 foi calculado a partir da média dos resultados da viabilidade celular dos compostos com o auxílio do programa OriginPro8 (Originlab Corporation®, EUA). Os resultados foram analisados por teste t (*Student*), utilizando-se o programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software®, USA) considerando significância estatística quando $p < 0,05$.

3. Resultados

Inicialmente a atividade dos derivados AM1b e AM1f foi avaliada pelo método de citotoxicidade utilizando o MTT. Os dois derivados exibiram atividade citotóxicas frente à linhagem Panc-1 com CI_{50} de $11,22 \pm 2,75 \mu M$ para o AM1b e $15,58 \pm 3,91 \mu M$ para o derivado AM1f. No entanto, frente a linhagem Mia-Paca-2, somente o derivado AM1f exibiu atividade com CI_{50} de $26,58 \pm 2,00 \mu M$. Desta forma os outros ensaios só foram realizados utilizando o derivado AM1f.

A influência do tratamento com o derivado AM1f sobre a formação de clones após o tratamento durante 24 e 48 horas com a concentração do CI_{50} . Na linhagem Panc-1 (figura 1) houve redução em cerca de 62,46 % ($p=0,0372$) do número de clones no tempo de 24 horas e 40,47% no tempo de 48 horas. Já na linhagem Mia-Paca-2 a redução do número de clones foi mais discreta, no tempo de 24 horas de 16,8% e no tempo de 48 horas de 13,68%, como pode ser observado a figura 2, mas sem significância estatística.

Posteriormente avaliamos a capacidade de inibição da migração após o tratamento com o derivado AM1f. Frente a Panc-1 houve diminuição da migração das células em todos os tempos avaliados (figura 4). No tempo de 12 horas o controle tinha 74,86% de área livre já o tratado 84,77% ($p=0,0417$). Já no tempo de 24 horas o controle tinha 48,68% da área livre, já as células tratadas 60,30%. Na linhagem Mia-Paca-2 também foi observado a diminuição da migração (figura 4). No entanto só foi observado maior diferença no tempo de 24 horas no qual houve 59,26% de área livre na condição somente com o veículo, já as células tratadas apresentaram 68,16% de área livre.

Em seguida foi avaliada a influência do tratamento na progressão do ciclo celular. Na linhagem Panc-1 não foi observada alteração significativa no ciclo celular no tratamento com CI_{50} (figura 5). Mas na concentração do dobro da CI_{50} foi observado um arrasto do ciclo celular na fase G0/G1. Houve um aumento das células na fase G0/G1 que foi de 56,1% no não tratado para 74,7% dos tratados com AM1f. A doxorrubicina ($CI_{50}=6 \mu M$) exerceu o mesmo efeito frente a ciclo celular aumentando para 81,65% o percentual de células nessa fase do ciclo. Na linhagem Mia-paca 2 foi observado aumento da concentração de células na fase sub-G0(19,7) na concentração do CI_{50} já a doxorrubicina induziu um arrasto na fase S/G2-M. Na linhagem Mia-paca-2 (figura 6) induziu a aumento de células na fase sub-G0 e o controle antitumoral doxorrubicina ($CI_{50}=1 \mu M$) induziu o arrasto na fase S/G2-M.

Foi avaliado também a indução da morte utilizando anexina V/Iodeto de propídeo nas linhagens Panc-1 e Mia-paca-2 não foi observado indução

expressivamente de morte celular nem por apoptose nem necrose (figura 6; figura 7). Assim foi investigada a capacidade de indução de senescência celular do tratamento com o derivado AM1f através da avaliação da expressão da enzima beta-galactosidade. Observamos um aumento da marcação da enzima quando comparada as células tratadas com DMSO 0,1% após 72 horas de tratamento com o derivado AM1f. Esse resultado indica que o derivado pode esta induz a entrada de células em senescência celular tanto na linhagem Panc-1 como na linhagem Mia-paca-2 principalmente na concentração da metade da CI50, no entanto outros ensaios são necessários para confirmação desse achado.

Foi avaliado também a toxicidade aguda e subcrônica em camundongos *Swiss* com os derivados AM1b e AM1f. Primeiramente foi avaliado a toxicidade aguda, administrando a dose de 8 mg/Kg dos derivados em camundongos *Swiss* machos e fêmeas. Essadose não provocou nenhuma alteração nos parâmetros comportamentais analisados, nos intervalos estabelecidos, quando comparados aos obtidos com o grupo controle (DSMO 0,2%) e não houve morte durante o período de análise (14 dias). Não houve nem ganho nem perda de peso corpóreo dos animais (tabela 1). Em relação ao pesotanto do rim direito como do rim esquerdo nos machos não foi observado diferença para nenhum dos derivados testados. Já em relação as fêmeas o derivado AM1b causou uma leve diminuição no peso ($p=0,040$) somente do rim esquerdo. O fígado também foi avaliado e somente o derivado AM1b para o grupo de macho exibiu diminuição do peso do fígado ($p=0,004$), mas isso não foi observado no grupo das fêmeas nem para ambos os grupos tratados com o derivado AM1f. Em relação ao peso do baço somente o derivado AM1b promoveu um aumento no peso deste órgão ($p=0,012$) no grupo fêmea. Já para o grupo fêmea ambos os derivados AM1b e AM1f exibiram aumento do estômago com diferença estatisticamente ($p=0,12$; $p=0,21$).

Os parâmetros bioquímicos foram avaliados (tabela 2), e em relação aos níveis de triglicerídeos (AM1b $p=0,018$; AM1f $p=0,025$) e colesterol total (para o grupo macho AM1b $p=0,0002$; AM1f $p=0,0007$; para o grupo fêmea AM1b $p=0,013$; AM1f $p=0,0005$) ambos os tratamentos em ambos os grupos foi capaz de reduzir os níveis. Os níveis de proteínas totais foram reduzidos em ambos os grupos em relação aos animais controle tanto com o AM1b ($p=0,04$) quanto com o AM1f ($p=0,012$). Em relação a Albumina somente no grupo de fêmeas ambos os derivados apresentaram redução sendo significativamente somente para o AM1f ($p=0,044$).

Em relação a avaliação de enzimas hepáticas foi observado aumento na enzima AST nas fêmeas houve o aumento tanto o AM1b ($p=0,036$) quanto o AM1f($p=0,0005$). Já para ALT também houve aumento em ambos os sexos tanto para o AM1b ($p=0,035$; $p=0,029$) quanto para o derivado AM1f ($p=0,013$; $p=0,031$). Em relação a creatinina houve uma diminuição em ambos os tratamentos e em ambos os sexos, mas só com estatisticamente significativa para o derivado AM1B no sexo feminino($p=0,049$). Já os níveis da uréia apresentaram aumentando em ambos os tratamentos e sexos (para o grupo macho AM1b $p=0,0044$; AM1f $p=0,001$; para o grupo fêmea AM1b $p=0,02$; AM1f $p=0,0006$).

Os parâmetros hematológicos também foram avaliados como pode ser observado na tabela 3. Só houve diferença significativa para os valores de VCM no sexo masculino tanto para o AM1b ($p=0,027$) quanto para o derivado AM1f ($p=0,027$). Já em relação ao CHCM, apenas o derivado AM1f diminuiu este parâmetro em fêmeas ($p=0,026$). Após o tratamento com os derivados foi observado um aumento no RDW para ambos os compostos, principalmente nos animais do sexo masculino com estatística significativa somente para o derivado AM1b ($p=0,001$). Mesmo que os derivados tenham diminuído alguns dos parâmetros hematimétricos todos os valores estão dentro são considerados valores normais para camundongos da raça *Swiss*(WEISS; WARDROP, 2010). Também foi avaliado a série branca e plaquetas. Houve aumento considerável na quantidade de células brancas circulantes em ambos os sexos para o derivado AM1b principalmente nas fêmeas ($p< 0,0001$), isso não foi observado para o derivado AM1f. O percentual das células granulócíticas no sexo masculino aumento significativamente somente no tratamento com o derivado AM1b ($p=0,003$). Em relação aos monócitos houve uma diminuição no percentual para ambos os derivados (AM1b $p=0,036$; AM1f $p=0,035$), mas nas fêmeas, o mesmo, não foi observado. Não houve diferença estatística entre o percentual de linfócitos, contagem de plaquetas e volume plaquetário em nenhum dos tratamentos avaliados em ambos os sexos.

Também foi avaliado o consumo de ração e água (tabela 4) durante os quatorze dias após a administração dos compostos e do veículo. Houve diferença no consumo da ração dos animais principalmente para o derivado AM1b quando comparado ao controle, com significância somente para o grupo macho ($p< 0,0001$). Já em relação ao consumo de água houve diferença significativa para os derivados quando comparados aos controles em ambos os sexos (para o grupo macho AM1B $p=0,0009$; AM1F $p=0,097$; para o grupo fêmea AM1b $p< 0,0001$; AM1fp $< 0,0001$).

Após o ensaio de avaliação da toxicidade aguda prosseguimos para avaliação da toxicidade sub-crônica na qual os animais de ambos os sexos são tratados com diferentes doses. Para o derivado AM1b na dose de 2 mg/Kg dois machos apresentaram patas edemaciadas e deformadas e uma fêmea apresentou dispneia leve. Na dose de 4 mg/Kg foi observado morte de um macho após 10 dias da primeira administração e uma fêmea morta após 25 dias de tratamento. Já na dose de 8 mg/Kg foi observado a morte de um macho morte após 25 dias de tratamento duas fêmeas mortas uma após 23 dias após o início do tratamento.

Em relação ao peso corpóreo não houve diferença entre os grupos tratado e controle em nenhum dos tratamentos em ambos os sexos para o derivado AM1b (tabela 5). Houve diminuição no peso dos rins, fígado, estômago e coração nas doses de 2 e 4 mg/Kg e aumento dos mesmos órgãos na dose de 8 mg/Kg. Houve alteração nos parâmetros bioquímicos (tabela 6) somente com o aumento do colesterol ($p=0,033$) somente na dose de 2 mg/Kg e elevação dos níveis de AST ($p=0,0019$) na dose de 8 mg/Kg e uréia na dose de 2 mg/Kg e 4 mg/Kg ($p=0,005$; $p=0,05$). Os parâmetros hematológicos (tabela 7) também foram avaliados e somente o volume corpuscular médio (VCM) apresentou leve diminuição principalmente nas doses de 4 ($p=0,005$) e 8 ($p=0,05$) mg/Kg doses no sexo masculino, mas nas fêmeas não houve diferença significativa entre os grupos avaliados.

Também foi avaliado o consumo de ração e água durante a administração dos compostos e do veículo. Houve diferença no consumo da ração dos animais principalmente nas doses de 8 mg/Kg no macho e com diminuição diretamente proporcional com a dose, sendo significativo para todos os grupos testados ($p<0,0001$). Já em relação ao consumo de água houve diferença significativa nas doses de 2 ($p=0,005$) e 8 mg/Kg ($p=0,05$). Já em relação as fêmeas houve diminuição do consumo para todas as doses com diferença estatisticamente significante somente na dose de 4 mg/Kg ($p=0,05$), como pode ser observado na tabela 8.

O derivado AM1f não casou nenhuma morte durante os 30 dias de tratamento e nenhuma característica de toxicidade foi observada. Em relação ao peso corpóreo não houve diferença, também não houve alteração significativa no peso dos órgãos avaliados (tabela 9).

Os parâmetros bioquímicos para o derivado AM1f e podem ser observados na tabela 10. Em relação aos níveis de glicosehouve um aumento causado pelo o derivado AM1f na dose de 8 mg/Kg ($p=0,0429$) em fêmeas. Em relação aos níveis de triglicerídeos e colesterol total para todos os grupos e ambos os sexos foi

evidenciado redução dos níveis, com diferença significativa para o grupo das fêmeas apenas na dose de 4 mg/Kg ($p=0,033$). Em ambos os grupos não foi observado diferença estatisticamente significativa nos níveis de AST, ALT proteínas totais e albumina em nenhum dos tratamentos. Os níveis de creatinina no grupo de macho na dose de 4 mg/Kg ($p<0,0001$) houve um aumento nas concentrações. Já em relação ao grupo de fêmeas houve uma diminuição dos níveis em todas as doses avaliadas. Já os níveis da ureia não apresentaram alteração significativa em ambos os tratamentos.

Não houve alteração na maioria dos parâmetros hematológicos em nenhuma das doses e dos grupos avaliadas (tabela 11). No entanto em relação aos parâmetros de volume corpuscular médio (VCM) foi observado um aumento principalmente na dose de 4 ($p=0,005$) mg/Kg no sexo feminino, mas nos machos não houve diferença significativa entre os grupos avaliados. Também foi avaliado o RDW e nos animais do sexo masculino houve poucas alterações, no entanto nas fêmeas houve diminuição em todas as concentrações avaliadas com diferença estatisticamente significativa nas concentrações de 2 e 8 mg/Kg($p=0,0052$) quando comparados ao controle. Em relação ao percentual de granulócitos houve um aumento significativo apenas nas fêmeas na dose de 4mg/Kg ($p=0,018$). Esse dados se repetiram com o número de linfócitos ($p=0,013$) e monócitos onde apenas a dose de 4mg/kg ($p=0,004$) em fêmeas foi capaz de alterar significativamente sua contagem não houve alteração para os outros significantes parâmetros avaliados.

Os animais tratados com AM1f tiveram o consumo de ração (tabela 12) aumentado nas doses de 2 e 4 mg/Kg e uma diminuição na dose de 8 mg/Kg ($p=0,005$) no grupo dos machos. Para as fêmeas houve um aumento no consumo ($<0,0001$) em todas as doses. Já em relação ao consumo de água não houve diferença significativa no grupo de machos, mas às fêmeas diminuirão o consumo somente na dose de 8 mg/Kg ($p=0,0030$).

4. Discussão

Os derivados AM1b e AM1f exibiram atividade citotóxica frente linhagem Panc-1 no entanto, frente a linhagem Mia-paca-2 somente o derivado AM1f exibiu citotoxicidade. A diferença em sua estrutura química é a presença um grupo naftil na posição 2 do segundo anel tiazol já o AM1f possui na mesma posição um grupo cloro-fenil. O grupo cloro faz com que a molécula fique mais carregada eletronegativamente do que o grupo naftil, esse perfil de eletronegatividade pode

influenciar na interação com possíveis alvos terapêuticos. Além de aumentar a lipofilicidade favorecendo a entrada da molécula nas células, como também auxilia na formação de pontes de halogênios (ZIMMERMANN et al., 2014). YEH et al., (2017) avaliaram novos derivadostiazolidinadionas, que possuíam o anel fenol como substituinte com o grupo haleto Bromo em vez do Cloro, em células de câncer de pâncreas (AsPC-1) e demonstrou a diminuição da viabilidade celular como também da capacidade de formação de novos clones. THAPA MAGAR et al., (2017) avaliaram a atividade de 2-clo-fenil-substituídos e demonstraram que a presença do cloro na posição meta e para do anel influencia na inibição da Topo isomerase, enzima importante na divisão celular além de induzir citotoxicidade nas linhagens T47D (câncer de mama), Hela (câncer de colo de útero) e HCT-15 (adenocarcinoma de colorretal) com CI_{50} entre 076 a 40,72 μM .

O tratamento com o derivado AM1f diminuiu a formação de novos clones principalmente na linhagem Panc-1 no tempo de 24 horas na linhagem Mia-paca-2. OU et al., (2018) avaliou o RG108, um derivado ftalímídico inibidor de metil-trasferases, em células de esôfago e demonstraram que esse derivado aumentou a radiosensibilidade das células (25 μM) diminuindo a formação de novos clones e a viabilidade celular após a radiação.

Houve retardo na migração das células tratadas com o derivado AM1f tanto na linhagem Panc-1 como na linhagem Mia-paca-2. Influenciar na migração celular é uma estratégia importante para novos fármacos antitumorais, pois grande parte das mortes causadas pelo câncer são em decorrência das metástases. ZHENG et al., 2013 avaliou derivados Tiazóis, que também possuíam cloro-fenil como radical, a diminuir a migração das células MDA-MB-231 na dose de 10 μM , além de induzir a citotoxicidade na concentração 1,12 μM .

Assim, novas abordagens para desenho novos medicamentos inovadores contra o câncer visando a interferência entre eventos simultâneos do ciclo celular são interessantes para novos medicamentos (DIAZ-MORALLI et al., 2013). O derivado AM1f influenciou no ciclo celular na linhagem Panc-1. A indução do arrasto do ciclo celular é uma estratégia interessante para um novo agente antitumoral. Alguns quimioterápicos, como por exemplo paclitaxel, agem inibindo a divisão celular e essa inibição leva a morte das células (HASCHKA et al., 2018).

O tratamento com o derivado AM1f não induziu a morte celular por via apoptótica e nem por necrose. No entanto foi observado um aumento de marcação de beta-galactosidade indicando que o tratamento pode levar a um aumento da senescência

celular. A indução da senescência vem se tornando uma nova abordagem terapêutica paratratar cânceres. O uso tanto da quimioterapia quanto da radioterapia padrão causa danos no DNA e esses podem desencadear uma resposta de indução da senescência. A terapia pró-senescência também pode ser alcançada com toxicidade bastante reduzida(MASSAOKA et al., 2014). A radioterapia induz o aumento da senescência celular além de inúmeros medicamentos que estão atualmente a disposição dos pacientes com câncer, como a bleomicina, cisplatina, doxorubicina, etoposídeo, mitoxantrona, retinóis, hidroxiureia, carboplatina combinada com docetaxel e muitos outros. Outro fato importante é que a senescência é iniciada em doses mais baixas do que aquelas que causam morte celular, o que em relação a quimioterapia pode minimizar os efeitos colaterais(MIKUŁA-PIETRASIK et al., 2020).

O derivado AM1b e o AM1f no ensaio de avaliação aguda aumentou as enzimas hepática ALT e os níveis de ureia e creatinina que indicam a função renal, indicando dano hepático e renal leves. Em relação aos parâmetros hematológicos somente o derivado AM1b induziu um aumento as serie branca (principalmente granulócitos e monócitos), indicando que o tratamento pode induz uma inflamação sistêmica.

Em relação a toxicidade subcrônica o tratamento com o derivado AM1b levou a diminuição do peso do fígado e baço somente nos machos. Em relação aos parâmetros bioquímicos houve aumento do dano hepático pela elevação dos níveis de AST e do dano renal pelo aumento dos níveis de ureia, e em relação aos parâmetros hematimétricos houve alteração somente tamanho dos glóbulos vermelhos (VCM) assim como foi observado no ensaio de toxicidade aguda.

ABDEL-AZIZ et al., (2011) demosntrou que derivados ftalimidicos tem ação anti-hiperlipemica. Em relação aos parâmetros bioquímicos houve diminuição do colesterol tanto no derivado AM1b como no derivado AM1f esses dados corroboram os encontrados nesse estudo. Em relação aos parâmetros bioquímicos houve aumento do dano renal pelo aumento dos níveis de uréia, e em relação aos parâmetros hematimétricos houve alteração somente tamanho dos glóbulos vermelhos (VCM) e aumento de células brancas do sangue. Houve diminuição do consumo de comida e água nas doses de 2 e 4 mg/kg e diminuição na maior dose.

Houve diminuição do consumo de comida e água dos animais avaliados. O derivado AM1b foi considerado tóxicos pois induziu edema nas patas dos animais como também levou a morte 5 animais principalmente nas maiores doses testadas.

Desta forma o derivado AM1b é considerado muito tóxico inviabilizando o estudo dessa molécula. De acordo com a OECD (do inglês, OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS) esse derivado é considerado muito tóxico pois induziu a morte em doses menores que 5 mg/Kg. A escolha para tornar um derivado um candidato a fármaco passa não só pela sua eficácia, mas como também por sua segurança. Desta forma, não há mortalidade e sinais de toxicidade, como redução no peso corporal, ingestão de alimentos, peso relativo dos órgãos, patologia bruta dos órgãos vitais durante o tratamento com doses diferentes em comparação com o controle no estudo de toxicidade aguda trás robustez para o estudo de novos candidatos a fármacos (KUMAR et al., 2018).

5. Conclusão

Os derivados avaliados apresentaram citotoxicidade contra as linhagens de câncer de pâncreas Panc-1 e Mia-paca-2. O derivado AM1f inibiu a formação de colônias principalmente na linhagem Panc-1. Houve redução da migração em ambas as linhagens. Já sobre o ciclo celular houve um arrasto na fase G0/G1 em Panc-1 e aumento do percentual de células Mia-paca-2 na fase Sub-G0. No entanto, não houve marcada indução de morte. No entanto houve indução da senescência celular nas linhagens tratadas Panc-1 e Mia-paca-2 com o derivado AM1f. O derivado AM1b foi considerado tóxico, pois, além de induzir aumento dos níveis séricos de proteínas de avaliação hepática e renal levou a morte de 5 animais durante os ensaios da avaliação subcrônica. O derivado AM1f apresentou tolerabilidade nos animais testados, pois o derivado não exibiu danos nos órgãos e poucas alterações bioquímicas e hematológicas além de não ter induzido a morte de nenhum animal.

6. Referências

1. ABDEL-AZIZ, A. A. M. et al. Synthesis and biological evaluation of some novel cyclic-imides as hypoglycaemic, anti-hyperlipidemic agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 4324–4329, 2011.
2. ASADI, P. et al. Synthesis, characterization, molecular docking studies and biological evaluation of some novel hybrids based on quinazolinone, benzofuran and imidazolium moieties as potential cytotoxic and antimicrobial agents. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 20, n. 9, p. 975–989,

- 2017.
3. AYATI, A. et al. Recent applications of 1,3-thiazole core structure in the identification of new lead compounds and drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, n. 1, p. 699–718, 2015.
 4. CHAGAS, M. et al. New thiazacridine agents: Synthesis, physical and chemical characterization, and in vitro anticancer evaluation. **Human & Experimental Toxicology**, v. 36, n. 10, p. 1059–1070, 2017.
 5. DIAZ-MORALLI, S. et al. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 138, n. 2, p. 255–271, 2013.
 6. FEIG, C. et al. The pancreas cancer microenvironment. **Clin Cancer Res.**, v. 18, n. 16, p. 4266–4276, 2012.
 7. FOGEL, E. L. et al. A Multidisciplinary Approach to Pancreas Cancer in 2016: A Review. **Am J Gastroenterol**, v. 112, n. 4, p. 537.554, 2017.
 8. HASCHKA, M. et al. Perturbing mitosis for anti-cancer therapy: is cell death the only answer? **EMBO reports**, v. 19, n. 3, p. 1–20, 2018.
 9. ILIC, M.; ILIC, I. Epidemiology of pancreatic cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 44, p. 9694–9705, 2016.
 10. KIM, E. J. et al. Enhanced immune-modulatory effects of thalidomide and dexamethasone co-treatment on T cell subsets. **Immunology**, v. 152, p. 628–637, 2017.
 11. KUMAR, D. et al. Antitumour, acute toxicity and molecular modeling studies of 4-(pyridin-4-yl)-6-(thiophen-2-yl) pyrimidin-2(1H)-one against Ehrlich ascites carcinoma and sarcoma-180. **Heliyon**, v. 4, n. 6, p. e00661, 2018.
 12. MASSAOKA, M. H. et al. A novel cell-penetrating peptide derived from WT1 enhances p53 activity, induces cell senescence and displays antimelanoma activity in xeno- and syngeneic systems. **FEBS Open Bio**, v. 4, p. 153–161, 2014.
 13. MCGUIGAN, A. et al. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. **World Journal of Gastroenterology**, v. 24, n. 43, p. 4846–4861, 2018.
 14. MIKUŁA-PIETRASIĆ, J. et al. Mechanisms and significance of therapy-induced and spontaneous senescence of cancer cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, n. 2, p. 213–229, 2020.
 15. OU, Y. et al. DNA methylation enzyme inhibitor RG108 suppresses the radioresistance of esophageal cancer. **Oncology Reports**, v. 39, n. 3, p. 993–

- 1002, 2018.
16. SALEM, O. M. et al. New spiro tria(thia)zolidine-acridines as topoisomerase inhibitors, DNA binders and cytostatic compounds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 690–700, 2016.
 17. TEMPERO, M. A. NCCN Guidelines Updates: Pancreatic Cancer. **J Natl Compr Canc Netw**, v. 17, n. 5.5, p. 603–605, 2019.
 18. THAPA MAGAR, T. B. et al. 2-Chlorophenyl-substituted benzofuro[3,2-b]pyridines with enhanced topoisomerase inhibitory activity: The role of the chlorine substituent. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 15, p. 3279–3283, 2017.
 19. WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's veterinary hematology 6th ed.** [s.l: s.n.]. v. XXXIII
 20. YE, T. K. et al. Design, Synthesis, and Evaluation of Thiazolidine-2,4-dione Derivatives as a Novel Class of Glutaminase Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 13, p. 5599–5612, 2017.
 21. ZAHARAN, M. A. H. et al. Synthesis and evaluation of thalidomide and phthalimide esters as antitumor agents. **Archiv der Pharmazie**, v. 347, n. 9, p. 642–649, 2014.
 22. ZHENG, S. et al. Discovery of a series of thiazole derivatives as novel inhibitors of metastatic cancer cell migration and invasion. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 4, n. 2, p. 191–196, 2013a.
 23. ZHENG, S. et al. Discovery of a series of thiazole derivatives as novel inhibitors of metastatic cancer cell migration and invasion. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 4, n. 2, p. 191–196, 2013b.
 24. ZHUANG, C. et al. Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 12, p. 7762–7810, 2017.
 25. ZIMMERMANN, M. O. et al. Halogen-enriched fragment libraries as chemical probes for harnessing halogen bonding in fragment-based lead discovery. **Future Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 6, p. 617–639, 2014.

Tabelas

Tabela 1- Avaliação dos parâmetros de peso corpóreo e peso dos órgãos de camundongos Swiss após 14 dias da realização do ensaio de toxicidade aguda com os derivados AM1B e AM1F comparados ao controle que recebeu DMSO 2%. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$

	Macho			Fêmea		
	Controle	AM1B	AM1F	Controle	AM1B	AM1F
Peso corpóreo (g)	38,95 ± 2,89	37,64 ± 1,84	38,59 ± 1,95	33,8 ± 2,55	34,71 ± 1,33	33,11 ± 2,76
Peso Rim direito (g)	0,28 ± 0,73	0,29 ± 0,06	0,34 ± 0,03	0,20 ± 0,01	0,24 ± 0,06	0,21 ± 0,02
Peso Rim esquerdo (g)	0,31 ± 0,07	0,27 ± 0,06	0,33 ± 0,03	0,25 ± 0,06	0,18 ± 0,02*	0,21 ± 0,03
Peso fígado (g)	2,51 ± 0,16	2,12 ± 0,15*	2,33 ± 0,45	2,06 ± 0,36	2,16 ± 0,28	1,92 ± 0,24
Peso baço (g)	0,19 ± 0,03	0,18 ± 0,04	0,20 ± 0,04	0,18 ± 0,22	0,23 ± 0,02*	0,19 ± 0,05
Peso estômago (g)	0,39 ± 0,09	0,41 ± 0,11	0,53 ± 0,22	0,33 ± 0,11	0,50 ± 0,12*	0,59 ± 0,21*
Peso coração (g)	0,24 ± 0,03	0,20 ± 0,05	0,21 ± 0,05	0,19 ± 0,03	0,18 ± 0,04	0,16 ± 0,01

Tabela 2- Avaliação bioquímica dos camundongos da raça Swiss grupos controle e tratados com os derivados AM1B e AM1F após 14 dias do tratamento com apenas uma dose (8mg/Kg) administrado via gavagem. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$

	Macho			Fêmea		
	Controle	AM1B	AM1F	Controle	AM1B	AM1F
Glicose (mg/dL)	159,17 ± 57,42	165,33 ± 16,35	179,17 ± 35,15	161,67 ± 14,28	177,16 ± 45,41	173,00 ± 10,77
Triglicerídeos (mg/dL)	203,5 ± 75,85	99 ± 27,49*	158 ± 15,11	180,16 ± 89,28	110,5 ± 28,19	66,33 ± 8,91*
Coles.Total (mg/dL)	127,5 ± 12,47	90,66 ± 7,44***	90,83 ± 2,13***	106 ± 14,28	83,16 ± 11,68*	67,16 ± 6,27***
Prot.Totais(g/dL)	6,54 ± 0,93	5,16 ± 1,16	4,66 ± 0,45*	5,70 ± 1,08	4,48 ± 0,22*	4,75 ± 0,55
Albumina	2,09 ±	2,13 ±	2,07 ±	2,29 ±	2,09 ±	2,07 ±

(g/dL)	0,19	0,21	0,12	0,16	0,23	0,16*
Aspartato	126,33 ±	169 ±	135 ±	93 ±	301,33 ±	208,83
transaminase	61,83	18,45	4,19	21,92	179,92*	±43,22***
(AST) (U/L)						
Alanina	58,83 ±	70,76 ±	73,83	55,83 ±	104,66 ±	80,5 ±
transaminase	9,96	6,09*	± 6,58*	10,26	40,19*	20,38*
(ALT) (U/L)						
Creatinina	0,33 ±	0,26 ±	0,27 ±	0,45 ±	0,20 ±	0,24 ±
(mg/dL)	0,12	0,06	0,02	0,23	0,02*	0,07
Uréia (mg/dL)	36,33 ±	47,83 ±	51,83	29,5 ±	55,00 ±	55,67 ±
	6,21	3,43 **	±	10,23	10,97**	6,80***
			5,38**			

Tabela 3 - Avaliação dos parâmetros hematológicos dos camundongos da raça Swiss grupos controle e tratados com os derivados AM1B e AM1F após 14 dias de tratamento com apenas uma dose (8mg/Kg) administrado via gavagem. * p< 0,05, ** p<0,001 e *** p<0,0001

	Macho			Fêmea		
	Controle	AM1B	AM1F	Controle	AM1B	AM1F
Hematócrito (%)	53,08±	54,1 ±	49,85 ±	53,18 ±	49,35 ±	52,91 ±
	4,96	7,54	3,64	5,55	4,69	2,26
Hemoglobina	15,02 ±	16,40 ±	15,00±	16,72±	15,64 ±	15,41 ±
(g/dL)	2,12	1,72	0,87	1,64	1,43	1,26
RBC (x10⁶ mm⁻³)	9,34 ±	9,46 ±	9,39 ±	9,34 ±	9,47 ±	9,50 ±
	0,44	0,29	0,47	0,50	0,42	0,41
VCM (fl)	57,5 ±	52,33 ±	52,33 ±	53,33 ±	52,5 ±	53,16 ±
	4,18	1,36*	1,36*	2,50	2,42	1,47
HCM (pg)	16,32 ±	15,68 ±	15,55 ±	16,13 ±	15,86 ±	16,66 ±
	2,50	1,34	0,79	1,26	1,43	1,37
CHCM (g/dL)	28,45 ±	29,42 ±	29,92 ±	31,4 ±	29,80 ±	29,85 ±
	4,06	0,96	0,61	1,23	2,03	0,21*
RDW	14,16 ±	17,05 ±	15,95 ±	15,35 ±	15,66 ±	15,00 ±
	1,08	0,22**	0,93	0,26	0,81	0,96
WBC (x10³ mm⁻³)	3,06 ±	4,38 ±	3,5 ±	2,6 ±	9,64 ±	2,23 ±

	1,37	0,86	1,07	0,90	0,24****	0,98
Granulócitos (%)	8,91 ±	13,08 ±	7,33 ±	7,78 ±	10,41 ±	15,10 ±
	1,81	2,03**	1,86	4,57	3,53	6,47
Linfócitos (%)	79,66 ±	74,53 ±	77,23 ±	78,28 ±	72,63 ±	72,25 ±
	8,62	2,22	7,83	5,82	5,90	9,27
Monócitos (%)	17,43 ±	12,28 ±	11,66 ±	14,31 ±	14,35 ±	14,46 ±
	4,46	1,18*	3,65*	2,41	4,39	1,44
Cont. de	568,5 ±	616,83 ±	669,33	486,71 ±	605,66 ±	492,67
plaquetas (x 10³	78,03	167,53	±	207,74	60,63	± 60,13
mm⁻³)			125,83			
Volume	9,1 ±	8,18 ±	7,11 ±	8,06 ±	8,06 ±	7,68 ±
plaquetáriomédio	3,05	1,07	0,24	1,07	1,66	0,25

Tabela 4– Valores médios do consumo de ração e água dos animais durante os quatorze dias após a administração com derivados para avaliação da toxicidade aguda dos animais expostos aos derivados AM1B e AM1F (8mg/Kg) administrado via gavagem. * p< 0,05, ** p<0,001 e *** p<0,0001

	Macho			Fêmea		
	Controle	AM1B	AM1F	Controle	AM1B	AM1F
Consumo de						
ração/Animal/Dia	7,61 ±	6,39 ±	6,63 ±	6,87 ±	5,34 ±	7,61 ±
(g)	0,31	0,33****	1,69	0,33	2,48	0,31
Consumo de			12,33			
água /nimal/Dia	15,67 ±	8,67 ±	±	16,33	7,0 ±	15,67 ±
(mL)	1,36	2,73***	3,14*	± 1,94	1,76****	1,36****

Tabela 5 - Avaliação dos parâmetros de peso corpóreo e peso dos órgãos de camundongos Swiss tratados nas doses de 2 ,4 e 8 mg/Kg no ensaio de toxicidade subcrônica com o derivado AM1B comparados aos controles tratados com o veículo DMSO 2% . * p< 0,05, ** p<0,001 e *** p<0,0001

	Macho				Fêmea			
	CT	AM1B-2	AM1B-4	AM1B-8	CT	AM1B-2	AM1B-4	AM1B-8
Peso corpóreo (g)	40,00 ± 3,90	39,60 ± 0,42	41,8 ± 2,89	39,10 ± 3,09	34,00 ± 1,24	35,90 ± 1,71	32,30 ± 4,76	32,60 ± 4,37
Peso Rim direito (g)	0,33 ± 0,05	0,31 ± 0,08	0,29 ± 0,10	0,35 ± 0,01	0,26 ± 0,07	0,24 ± 0,05	0,23 ± 0,09	0,17 ± 0,01
Peso Rim esq. (g)	0,33 ± 0,05	0,29 ± 0,09	0,25 ± 0,14	0,32 ± 0,08	0,22 ± 0,03	0,23 ± 0,04	0,18 ± 0,04	0,17 ± 0,02
Peso fígado (g)	2,27 ± 0,24	1,95 ± 0,46*	1,97 ± 0,60	2,17 ± 0,05	1,86 ± 0,16	2,36 ± 0,26	1,82 ± 0,16	2,30 ± 0,31
Peso baço (g)	0,28 ± 0,07	0,24 ± 0,07	0,15 ± 0,02*	0,22 ± 0,05	0,17 ± 0,13	0,22 ± 0,05	0,18 ± 0,03	0,23 ± 0,08
Peso estômago (g)	0,51 ± 0,09	0,48 ± 0,15	0,42 ± 0,09	0,59 ± 0,15	0,62 ± 0,10	0,60 ± 0,10	0,48 ± 0,14	0,73 ± 0,01
Peso coração (g)	0,23 ± 0,01	0,22 ± 0,05	0,18 ± 0,05	0,23 ± 0,06	0,18 ± 0,02	0,30 ± 0,20	0,43 ± 0,22	0,31 ± 0,29

Tabela 6 - Avaliação bioquímica dos camundongos da raça Swiss grupos controle e tratados com o derivado AM1B nas doses de 2, 4 e 8 mg/Kg no ensaio de toxicidade subcrônica administrado via gavagem. * p< 0,05, ** p<0,001 e *** p<0,0001

	Macho				Fêmea			
	CT	AM1B-2	AM1B-4	AM1B-8	CT	AM1B-2	AM1B-4	AM1B-8
Glicose (mg/dL)	146,2 ± 46,96	224,74 ± 85,50	201,0 ± 4,34	165,1 ± 44,3	163,20 ± 50,39	178,53 ± 11,11	211,2 ± 14,0	199,35 ± 15,30
Triglicerídeos (mg/dL)	170,80 ± 104,15	76,66 ± 24,96	96,61 ± 3,69	99,24 ± 6,06	164,20 ± 79,59	116,35 ± 53,81	70,31 ± 15,63	125,33 ± 30,03
Colestetol	124,60	102,78	117,0	111,7	98,80 ±	97,56	83,19	93,97

Total	±	±	8	2	17,09	±	±12,2	±
(mg/dL)	10,43	8,97*	±26,7	±11,0		10,68	5	11,03
			5	3				
ProtéinasTot	5,80 ±	4,96 ±	5,17 ±	5,15 ±	5,54 ±	4,94 ±	5,19 ±	4,77 ±
ais (g/dL)	1,01	0,29	0,52	0,54	0,72	0,33	0,28	0,38
Albumina	1,85 ±	1,59 ±	1,62 ±	1,97 ±	2,24 ±	2,13 ±	2,11 ±	1,88 ±
(g/dL)	0,32	0,09	0,18	0,48	0,17	0,23	0,18	0,34
Aspartato	182,80	145,92	136,9	161,7	81,00 ±	107,90	113,9	208,83
trans. (AST)	±133,8	±	4 ±	7	16,00	±23,99	8	±43,22
(U/L)	9	21,28	0,08	±29,8			±23,0	**
				8			1	
Alanina	67,00	62,24	58,18	54,41	46,40 ±	42,70	44,94	56,74
trans.	±	±	± 3,09	± 7,85	3,64	±	± 4,08	± 6,41
(ALT)(U/L)	13,76	10,79				10,32		
Creatinina	0,29 ±	0,44 ±	0,44 ±	0,28 ±	0,40 ±	0,29 ±	0,30 ±	0,26 ±
(mg/dL)	0,12	0,17	0,19	0,12	0,23	0,15	0,06	0,08
Uréia	44,24	64,14	58,82	53,18	39,60 ±	51,17	42,35	49,30
(mg/dL)	± 7,56	±	±	± 0,48	16,93	± 6,16	± 6,05	± 5,85
		11,45*	7,31*					
		*						

Tabela 7 - Avaliação dos parâmetros hematológicos dos camundongos da raça Swiss grupos controle e tratados com o derivado AM1B nas doses de 2, 4 e 8 mg/Kg no ensaio de toxicidade subcrônica administrado via gavagem. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$

	Macho				Fêmea			
	CT	AM1B- 2	AM1 B-4	AM1B- 8	CT	AM1B- 2	AM1B- 4	AM1 B-8
Hematócrito (%)	52,16 ± 5,26	53,26 ± 3,65	50,30 ± 5,52	49,60 ± 1,64	49,35 ± 4,69	53,14 ± 4,77	52,43 ± 5,22	50,66 ± 2,53
Hemoglobina (g/dL)	15,52 ± 1,64	15,27 ± 0,83	15,12 ± 2,01	15,35 ± 1,42	16,44 ± 1,30	15,19 ± 1,39	14,71 ± 0,81	14,31 ± 0,86
RBC ($\times 10^6$ mm⁻³)	9,29 ± 0,41	9,72 ± 0,59	9,57 ± 0,01	10,06 ± 0,56	9,68 ± 0,64	9,75 ± 1,16	9,23 ± 0,70	9,50 ± 0,41
VCM(fl)	57,26 ± 4,62	55,53 ± 3,08	51,34 ± 1,27**	53,80 ± 2,49*	51,62 ± 1,08	53,18 ± 0,76	54,60 ± 2,96	53,16 ± 1,47
HCM(pg)	17,18 ± 1,64	15,74 ± 1,07	15,80 ± 2,12	15,55 ± 1,26	15,92 ± 1,35	15,62 ± 0,55	15,95 ± 0,34	16,30 ± 1,95
CHCM(g/dL)	30,12 ± 1,37	28,95 ± 0,72	29,45 ± 0,20	30,90 ± 1,17	30,92 ± 1,91	29,70 ± 0,73	29,43 ± 0,57	30,45 ± 1,42
RDW	14,50 ± 1,38	15,13 ± 0,63	15,50 ± 0,55	15,45 ± 1,14	15,18 ± 0,32	14,22 ± 0,42	14,52 ± 0,45	15,01 ± 1,00
WBC ($\times 10^3$ mm⁻³)	3,73 ± 0,76	3,53 ± 1,58	2,35 ± 1,48	3,36 ± 0,79	2,78 ± 0,95	2,89 ± 0,77	4,32 ± 1,73	3,06 ± 0,79
Granulócitos (%)	12,13 ± 6,63	19,26 ± 6,11	14,00 ± 1,83	14,54 ± 7,39	6,46 ± 2,36	7,31 ± 1,26	7,87 ± 1,34	10,14 ± 0,75
Linfócitos (%)	72,98	60,50	68,03	61,32	80,22 ±	79,21	75,36	70,73

	± 3,11	± 9,64	± 11,07	± 11,6	3,25	± 5,37	± 0,93	± 7,83
Monócitos (%)	17,50	19,43	23,60	18,32	14,35 ± 4,39	13,78 ± 2,29	10,91 ± 1,26	16,67 ± 1,76
Cont. de plaquetas (x 10³ mm⁻³)	609,3 ± 100,40	766,87 ± 80,26	800,98 ± 161,23	719,2 ± 4,44	469,60 ± 181,94	686,60 ± 102,36	736,10 ± 41,67	509,7 ± 273,54
Volume plaquetário médio	7,07 ± 0,45	6,82 ± 0,42	7,09 ± 0,001	7,03 ± 0,69	7,60 ± 1,46	6,86 ± 0,32	7,11 ± 0,35	7,27 ± 0,80

Tabela 8 - Valores médios do consumo de ração e água dos animais durante dias após a administração com derivado o derivado AM1B nas doses de 2,4 e 8 mg/Kg administrado via gavagem. * p< 0,05, ** p<0,001 e *** p<0,0001

	Macho				Fêmea			
	CT	AM1B-2	AM1B-4	AMB1-8	CT	AM1B-2	AM1B-4	AM1B-8
Consumo de ração/Animal/Dia (g)	6,34 ± 0,33	4,15 ± 1,07*	6,21 ± 1,92	3,87 ± 1,17**	10,91 ± 2,74	6,08 ± 0,35***	5,30 ± 0,68***	3,74 ± 1,78***
Consumo de água/Animal/Dia (mL)	12,12 ± 3,27	7,16 ± 2,01**	11,41 ± 1,62*	8,25 ± 2,54	9,75 ± 2,78	7,66 ± 1,80	6,83 ± 1,35*	9,25 ± 2,44

Tabela 9 - Avaliação dos parâmetros de peso corpóreo e peso dos órgãos de camundongos Swiss tratados nas doses de 2,4 e 8 mg/Kg no ensaio de toxicidade subcrônica com o derivado AM1F comparados aos controles que receberam DMSO 2% * p< 0,05, ** p<0,001 e *** p<0,0001

	Macho				Fêmea			
	CT	AM1F- 2	AM1F- 4	AM1F- 8	CT	AM1F- 2	AM1F- 4	AM1F- 8
Peso corporeo (g)	40,00 ± 3,90	41,40 ± 3,02	44,50 ± 3,68	40,70 ± 4,92	34,00 ± 1,24	35,00 ± 2,11	34,80 ± 1,92	35,20 ± 2,55
Peso Rim dir. (g)	0,33 ± 0,05	0,32 ± 0,06	0,30 ± 0,06	0,32 ± 0,09	0,26 ± 0,07	0,29 ± 0,07	0,31 ± 0,08	0,26 ± 0,09
Peso Rim esq. (g)	0,33± 0,05	0,32 ± 0,06	0,32 ± 0,01	0,37 ± 0,05	0,22 ± 0,03	0,23 ± 0,03	0,32 ± 0,09	0,26 ± 0,11
Peso fígado (g)	2,27 ± 0,24	2,17± 0,17	2,32 ± 0,12	2,23 ± 0,19	1,86 ± 0,16	1,74 ± 0,13	2,29 ± 0,43	2,11 ± 0,39
Peso baço (g)	0,28 ± 0,07	0,17 ± 0,02	0,25 ± 0,08	0,35 ± 0,24	0,17 ± 0,13	0,36 ± 0,25	0,42 ± 0,24	0,22 ± 0,06
Peso estômago (g)	0,51 ± 0,09	0,65 ± 0,16	0,80± 0,17	0,72 ± 0,28	0,62 ± 0,10	0,67 ± 0,08	0,58 ± 0,07	0,59 ± 0,07
Peso coração (g)	0,23 ± 0,01	0,23 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,18 ± 0,02	0,18 ± 0,005	0,18 ± 0,03	0,20 ± 0,04

Tabela 10 - Avaliação bioquímica dos camundongos da raça Swiss grupos controle e tratados com o derivado AM1F nas doses de 2, 4 e 8 mg/Kg no ensaio de toxicidade subcrônica administrado via gavagem. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$

	Macho				Fêmea			
	CT	AM1F-	AM1F-	AM1F-	CT	AM1F-	AM1F-	AM1F-
		2	4	8		2	4	8
Glicose	146,2 ±	162,5	171,82	164,41	163,20	178,53	212,07	221,91
(mg/dL)	46,96	6	± 55,40	± 17,12	±50,39	± 11,11	± 20,95	±26,61*
		±21,44						
Triglicerídeos	170,80	84,22±	141,52	119,57	164,20	116,35	75,12 ±	93,20
(mg/dL)	±104,15	23,06	± 27,41	± 23,22	±79,59	± 53,81	28,40	±16,42
Coletetol Total	124,60±	106,4	108,64	115,92	98,80±	97,56 ±	72,30 ±	86,27 ±
(mg/dL)	10,43	8 ±	± 13,41	± 16,4	17,09	10,68	6,71**	6,03
		9,40						
Proteínas Totais	5,80 ±	4,82 ±	5,47 ±	5,63 ±	5,54 ±	4,94 ±	5,66 ±	5,28 ±
(g/dL)	1,01	0,48	0,55	0,92	0,72	0,33	0,70	0,10
Albumina	1,85 ±	2,85 ±	3,31 ±	3,50 ±	2,24 ±	2,13 ±	2,02 ±	5,69 ±
(g/dL)	0,32	2,49	3,58	3,67	0,17	0,24	0,55	6,06
Aspartato	182,80	94,88±	176,08	144,37±	81,00±	107,09±	133,74±	137,50
trans. (AST)	±133,89	24,10	± 37,98	27,17	16,00	23,99	55,24	±44,73
(U/L)								
Alanina trans.	67,00 ±	56,71±	84,75 ±	56,64 ±	46,40	42,70±	65,53±	59,65
(ALT) (U/L)	13,76	13,27	35,17	4,65	± 3,64	10,33	21,31	±14,06
Creatinina	0,29 ±	0,27 ±	0,79 ±	0,24 ±	0,40 ±	0,29 ±	0,32 ±	0,29 ±
(mg/dL)	0,12	0,04	0,11****	0,25	0,23	0,15	0,07	0,02
Uréia (mg/dL)	44,24 ±	47,05	44,56 ±	50,35±	39,60±	51,17 ±	45,51 ±	57,81
	7,56	± 5,09	3,64	10,72	16,93	6,16	6,54	±10,41

Tabela 11 - Avaliação dos parâmetros hematológicos dos camundongos da raça Swiss grupos controle e tratados com o derivado AM1F nas doses de 2, 4 e 8 mg/Kg no ensaio de toxicidade subcrônica administrado via gavagem. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$

	Macho				Fêmea			
	CT	AM1F- 2	AM1F- 4	AM1F- 8	CT	AM1F- 2	AM1F- 4	AM1F- 8
Hematócrito (%)	52,16 ± 5,26	50,87 ± 7,69	55,88 ± 4,90	55,68 ± 2,66	53,14 ± 4,77	52,43 ± 5,22	52,13 ± 6,18	54,94 ± 3,89
Hemoglobina (g/dL)	15,52 ± 1,64	15,13 ± 2,88	16,89 ± 0,64	16,06 ± 1,92	16,44 ± 1,30	15,19 ± 1,39	15,49 ± 1,51	16,04 ± 1,31
RBC (x10⁶ mm⁻³)	9,29 ± 0,41	10,07 ± 0,48	10,58 ± 1,10	10,28 ± 1,67	9,68 ± 0,64	9,75 ± 1,16	8,40 ± 1,64	9,68 ± 0,81
VCM(fl)	57,26 ± 4,62	54,52 ± 3,06	56,14 ± 3,19	57,18 ± 2,34	53,80 ± 2,49	51,62 ± 1,08	61,11 ± 6,52*	55,54 ± 1,59
HCM(pg)	17,18 ± 1,64	14,97 ± 2,47	16,06 ± 1,45	15,71 ± 0,94	15,92 ± 1,35	15,62 ± 0,55	18,82 ± 2,62	16,64 ± 0,65
CHCM(g/dL)	30,12 ± 1,37	27,07 ± 2,86	28,39 ± 1,75	28,66 ± 1,62	30,92 ± 1,91	29,70 ± 0,73	29,62 ± 2,35	28,55 ± 0,65
RDW	14,50 ± 1,38	15,35 ± 0,28	14,26 ± 0,54	14,92 ± 1,04	15,18 ± 0,32	14,22 ± 0,41**	14,65 ± 0,47	14,44 ± 0,22*
WBC (x10³ mm⁻³)	3,73 ± 0,76	2,33 ± 0,75	3,15 ± 1,71	3,29 ± 0,93	2,78 ± 0,95	2,89 ± 0,77	3,92 ± 0,66	4,02 ± 0,71
Granulócitos (%)	12,13 ± 6,63	8,50 ± 2,60	14,35 ± 3,08	10,20 ± 3,13	6,46 ± 2,36	7,31 ± 1,26	16,39 ± 7,53*	9,76 ± 5,13
Linfócitos (%)	72,98 ± 3,11	77,02 ± 5,04	64,25 ± 14,52	75,15 ± 2,44	80,22 ± 3,25	79,21 ± 5,37	64,29 ± 12,58*	78,39 ± 6,01
Monócitos (%)	17,50 ± 3,80	13,89 ± 3,08	18,92 ± 6,82	13,28 ± 2,45	14,35 ± 4,39	10,91 ± 1,26	18,58 ± 3,92*	13,35 ± 2,99
Cont. de plaquetas (x 10³ mm⁻³)	609,32 ± 100,40	685,55 ± 28,96	650,91 ± 63,47	691,78 ± 90,81	469,60 ± 181,94	686,60 ± 102,36	516,16 ± 96,85	656,40 ± 133,54
Volume plaquetário médio	7,07 ± 0,45	6,60 ± 0,12	7,96 ± 1,32	6,95 ± 0,28	7,60 ± 1,46	6,84 ± 0,32	7,59 ± 0,57	7,90 ± 1,33

Tabela 12- Valores médios do consumo de ração e água dos animais durante dias após a administração com derivado o derivado AM1F nas doses de 2,4 e 8 mg/Kg administrado via gavagem. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$

	Macho				Fêmea			
	CT	AM1F- 2	AM1F- 4	AMF1- 8	CT	AM1F- 2	AM1F- 4	AM1 F- 8
Consumo de ração/Animal/ Dia (g)	6,34 ± 0,33	7,52 ± 0,72	9,96 ± 1,07****	5,61 ± 1,08	10,91 ± 2,74	6,26 ± 0,81****	7,16 ± 0,93***	5,87 ± 0,62* ***
Consumo de água/Animal/ Dia (mL)	12,12 ± 3,27	11,00 ± 2,96	12,25 ± 2,78	7,33 ± 1,29**	9,75 ± 2,78	9,25 ± 1,30	10,75 ± 2,10	7,16 ± 1,59*

Figuras

Figura 1. Avaliação da inibição da formação de clones celulares de Panc-1 tratados após 24 e 48 horas com o derivado AM1f.

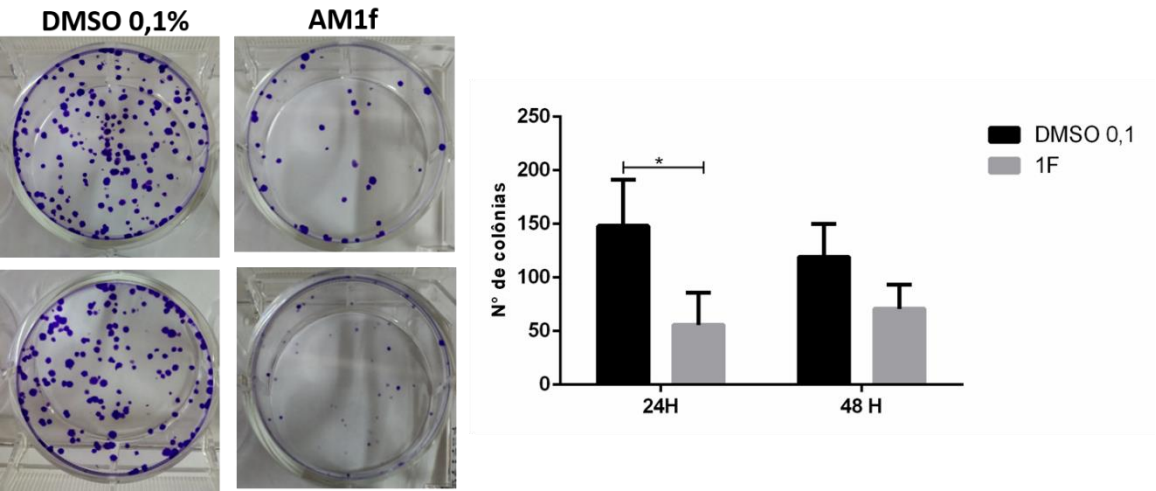


Figura 2. Avaliação da inibição da formação de clones celulares de Mia-Paca-2 tratados após 24 e 48 horas com o derivado AM1f.

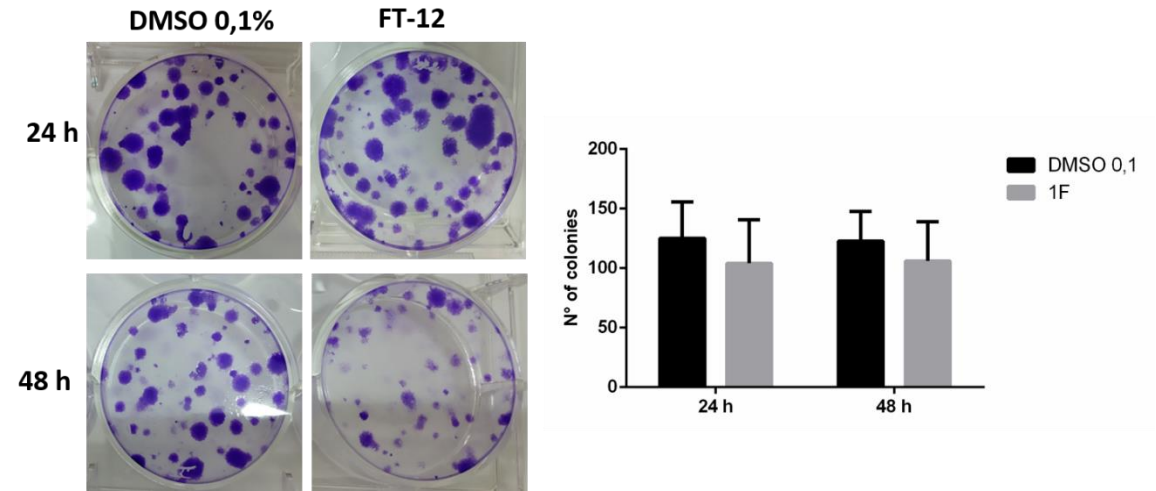


Figura 3. Avaliação da inibição da migração celular na linhagem de câncer de pâncreas Panc-1 tratados durante 6, 12 e 24 horas com o derivado AM1f e com o veículo (controle positivo) DMSO 0,1%.

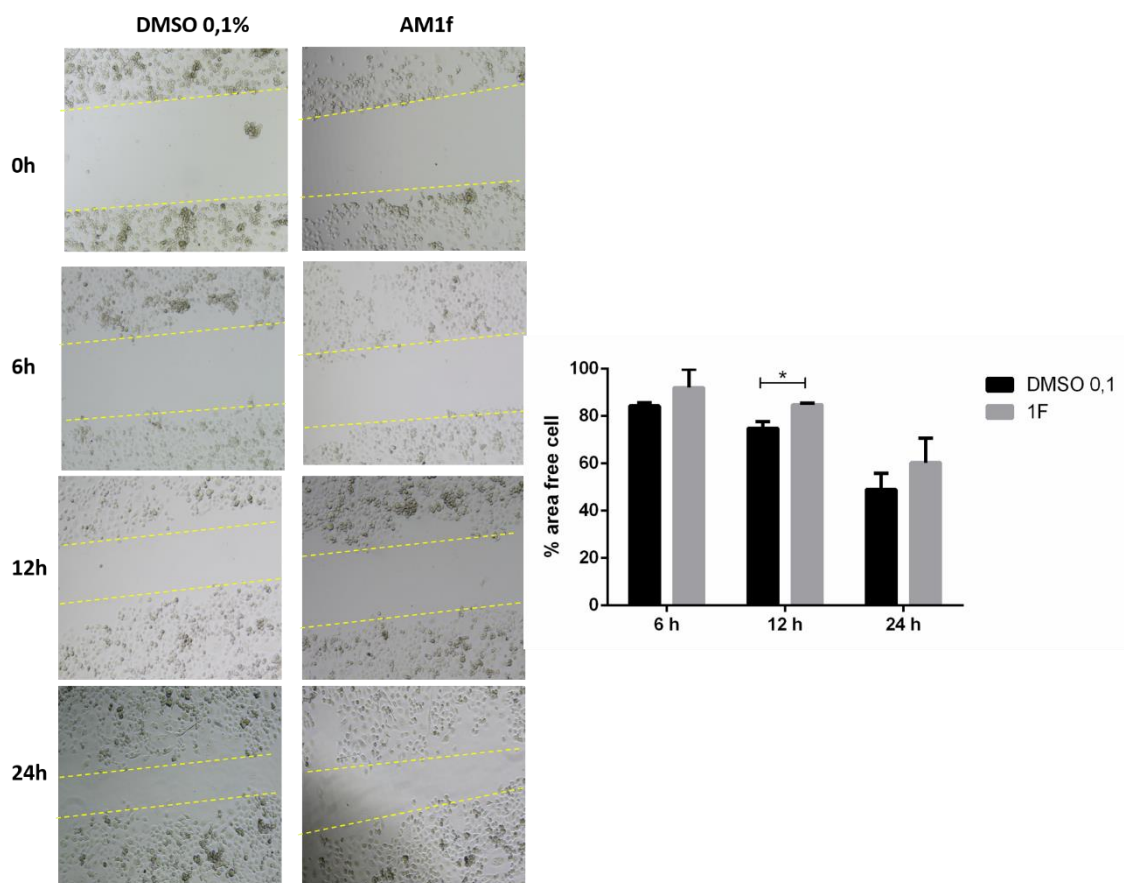


Figura 4. Avaliação da inibição da migração celular na linhagem de câncer de pâncreas Mia-paca-2 tratados durante 6, 12 e 24 horas com o derivado AM1f e com o veículo (controle positivo) DMSO 0,1%.

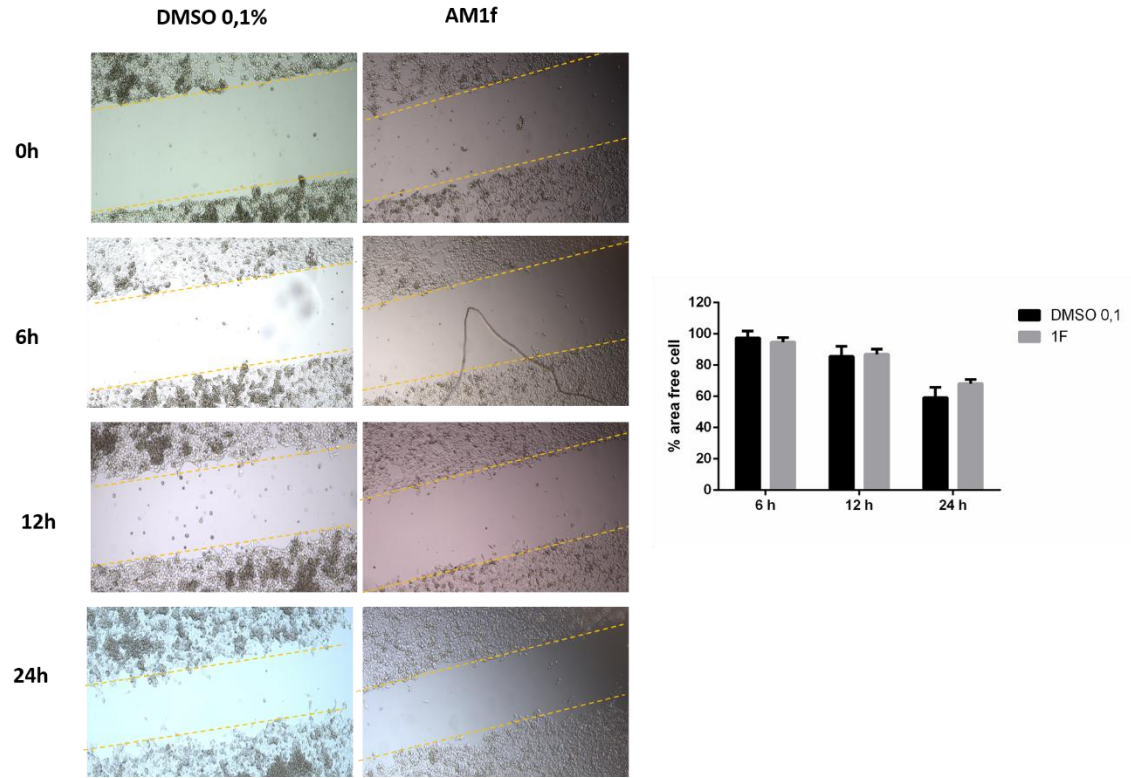


Figura 5. Avaliação da influência sobre o ciclo celular do tratamento com CI50 (1F) e o dobro do CI50(2x-1F) tratado com o derivado AM1f e a condição sem tratamento (controle positivo) na linhagem de câncer de pâncreas Panc-1 tratados 48 horas.

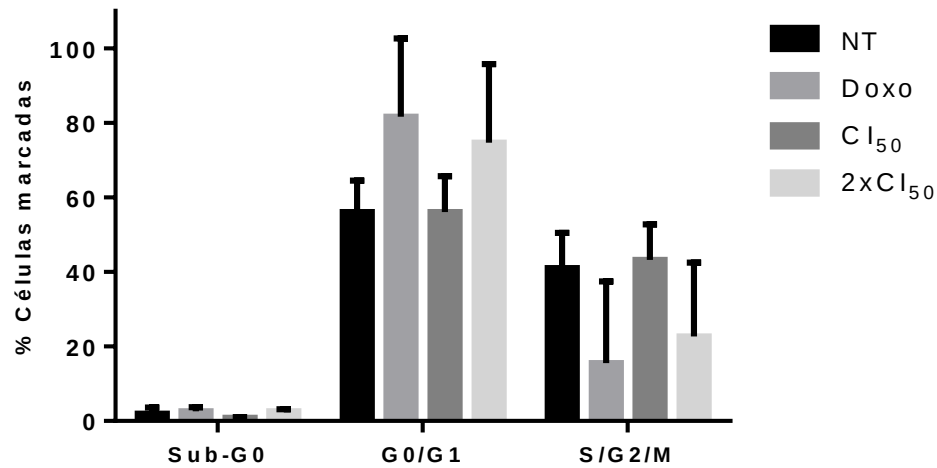


Figura 6. Avaliação da influência sobre o ciclo celular do tratamento com CI50 (1F) e o dobro do CI50(2x-1F) tratado com o derivado AM1f e a condição sem tratamento (controle positivo) na linhagem de câncer de pâncreas Mia-paca-2 tratados 48 horas.

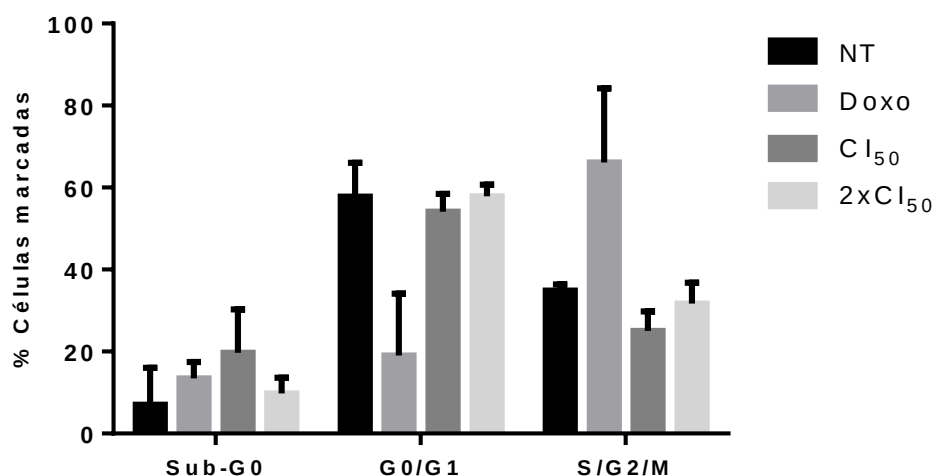


Figura 7. Avaliação da indução da morte celular durante 48 do tratamento com CI50, dobro do CI50 do derivado AM1f, da condição sem tratamento (controle negativo) e do Doxorubicina (controle positivo) na linhagem de câncer de pâncreas Panc-1. (DN= Duplamente negativo; Apop+ = Apoptose inicial; Necro+ = Necrose; DP= Duplamente positivo.)

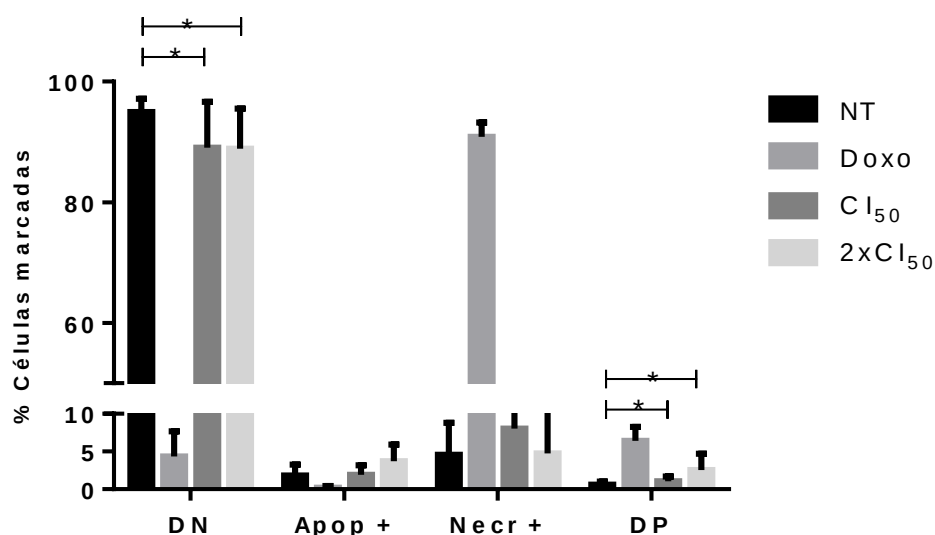


Figura 8. Avaliação da indução da morte celular durante 48 do tratamento com CI50 (1F), dobro do CI50 do derivado AM1f(2x-1F), da condição sem tratamento (controle negativo) e do Doxorubicina (controle positivo) na linhagem de câncer de pâncreas

Mia-Paca-2. (DN= Duplamente negativo; Apop+ = Apoptose inicial; Necr+ = Necrose; DP= Duplamente positivo.)

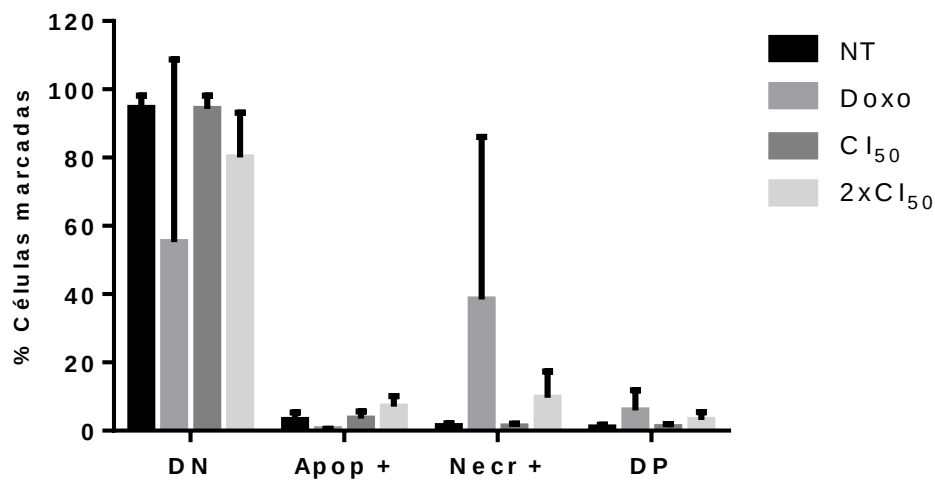


Figura 9. Avaliação da indução de senescência celular após 72 horas do tratamento com CI₅₀ e com metade do CI₅₀ do derivado AM1f e DMSO 0,1% (controle negativo) na linhagem de câncer de pâncreas Panc-1.

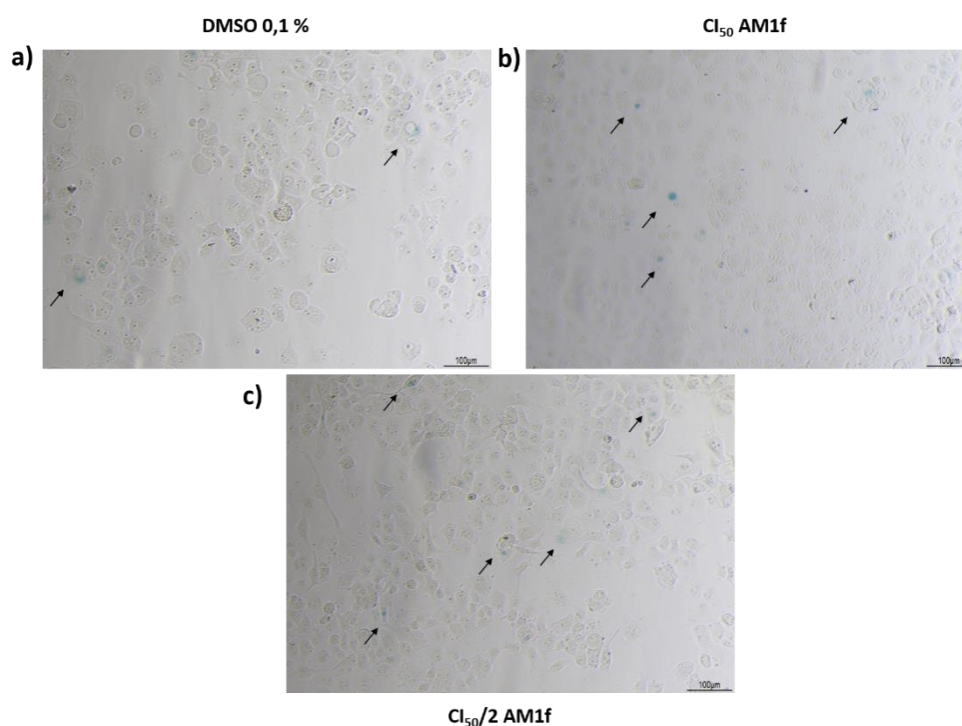
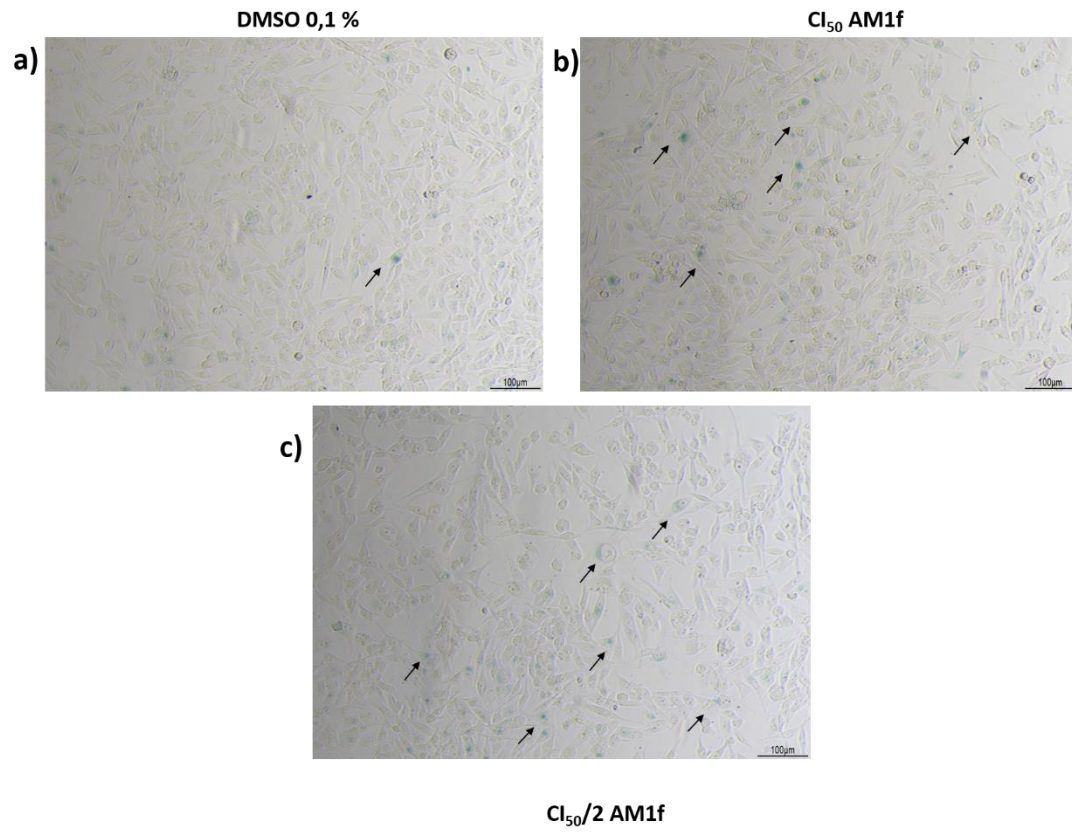


Figura 10. Avaliação da indução de senescência celular após 72 horas do tratamento com CI₅₀ e com metade do CI₅₀ do derivado AM1f e DMSO 0,1% (controle negativo) na linhagem de câncer de pâncreas Mia-paca-2.



6 Discussão

A busca de novos derivados continua sendo uma importante fonte de pesquisa. Os derivados tiazolftalimidicos (FTs) não apresentaram citotoxicidade em células normais de sangue periférico de doadores saudáveis. A avaliação da citotoxicidade em células sadias é importante, pois demonstra a seletividade de novos derivados. A seletividade entre células normais e tumorais é uma questão fundamentalmente crítica para a pesquisa e desenvolvimento de agentes quimioterapêuticos (CARDOSO et al., 2015b).

Os derivados FT-9 e o FT-12 foram os únicos que apresentaram atividade citotóxica. O derivado FT-12 possui estrutura quimicamente similar com o derivado FT-13 difere do FT-13, ambas possuem um grupo quinolinico como substituintes, eles diferem apenas pela presença do grupo metoxipresente no derivado FT-13, no entanto no derivado FT-12 possui o grupo metil na mesma posição. Assim o grupamento metil apresentou influência na reatividade do derivado. Aboutorabzadeh e colaboradores (2017) avaliou arilquinolinas e verificou que o grupo metil foi mais eficiente do que o grupo metoxi na inibição da glicoproteína P. O grupo metil aumenta as interações hidrofóbicas entre as moléculas, desta forma esse grupo funcional influenciou na atividade antineoplásica do derivado FT-12. ROMAGNOLI e colaboradores (2013) também evidenciou que o grupo metil aumenta as interações hidrofóbicas de benzo(b) tiofênicos na interação com a proteínas β -tubulina.

Guggilapu et al., (2017) testaram derivados tiazóis em um *screening* com diversas linhagens Du-145 (câncer de prótata), PC-3 (câncer de prótata), A549 (câncer de pulmão) e HCT- 15 (câncer cervical) e demonstrou atividade antineoplásica na linhagem de câncer Du-145 com Cl_{50} de 96 nM para o derivado 13d. Kok et al., (2008) demonstraram que frente as linhagens de células de hepatoma humano (SKHep1), linfoma de Burkitt (CA46) e na leucemia mielóide crônica (K562) o derivado benzo-ftalimidico reduziu em 50% concentração de ATP livre na concentração de 25 μ g/mL, como também induziu na concentração de 40 μ g/mL por 48 h a ativação significativamente decaspase 3. Aida et al., (2017) demonstraram que o TC-11, derivado fenolftalimidico, apresenta atividade frente as linhagens de mieloma (KMM1, KMS11, KMS21, 1, KMS26, KMS27, KMS28, KMS34 e MUM24) nas concentrações entre 1 e 5 μ M, induzindo apoptose celular nas considerável nessas concentrações.

O FT-12 induziu a diminuição na formação de clones tanto na linhagem Panc-1 como na linhagem PC-3. O ensaio clonogênico é utilizado para avaliar a capacidade de sobrevivência e proliferação das células. Esse ensaio pode ser utilizado para determinar os efeitos citotóxicos de vários tratamentos, incluindo quimioterapêuticos e radiação ionizante (FEDR et al., 2013). O FT-12 também inibiu a migração em câncer de próstata (PC-3). Inibir a migração celular é uma estratégia interessante para novos candidatos a fármacos antitumorais, pois grande parte das mortes causadas pelo câncer são em decorrência das metástases. Cerca de 90% das mortes atribuídas ao câncer se dá pela disseminação metastática da doença e não por causa do tumor primário propriamente dito. Desta forma inibir a migração celular das células neoplásica é de fundamental importância para evitar o desenvolvimento de metástases (ZHENG et al., 2013a).

O FT-12 não induziu alterações no ciclo celular no entanto induziu um aumento da morte celular tanto por necrose como por apoptose na linhagem de câncer de pâncreas. Esse aumento da apoptose foi confirmada com o aumento da clivagem de Parp na linhagem Panc-1. Rohitkumar e colaboradores (2015) demonstraram o aumento da apoptose e da clivagem de parp por derivados quinolinicos em células de Molt-4.

Apesar do FT-13 não apresentar atividade antitumoral ele apresentou atividade imunomoduladora induzindo um aumento de IL-2 e TNF- α . Essa são citocinas pro-inflamatórias que ativam um perfil mais antitumoral. O derivado FT-13, principalmente na concentração de 10 μ M estimulou a produção de IL-2. Essa citocina participa dos processos de ativação das células B, T e NK além de estimular o crescimento dessas células. O uso de IL-2 recombinante é aprovado pelo FDA para pacientes com melanoma metastático e carcinoma de células renais. Desta forma o uso de medicamento que pode induzir a produção de IL-2 é uma estratégia interessante (LEE; MARGOLIN, 2011). Cardoso, et al., (2015) avaliaram derivados ftalimidos em esplenócitos de camundongos Balb/C estimulados com LPS durante 48 horas, e demonstraram que os derivados não inibiram a produção de TNF- α para as duas concentrações testadas (1 e 10 mg / mL). Houve pouca inibição da produção de IL-2 e IL-6. Contudo, a liberação de IFN γ foi inibida em 95% (4b), 93% (7b), 87% (7d), 85% (7h), 83% (2a) e 82% (3b) na concentração de 1 mg/mL.

Na avaliação da atividade imunomoduladora frente as citocinas antiinflamatórias IL-4 e IL-10, os derivados FT-3 e 4 exibiram maior poder de inibição já o derivado FT-6 estimulou a produção dessas citocinas. Essas duas citocinas

representam marcadamente o perfil Th2, desta forma os resultados demonstram que o derivado FT-6 possui um potencial de ativação de um perfil antiinflamatório, mas outros ensaios devem ser realizados para a confirmação. O aumento de IL-10 atua como inibidor de macrófagos e células dendríticas (LEE; MARGOLIN, 2011).

O FT-3 também diminuiu a expressão das citocinas IL-17A, INF- γ , TNF- α e IL-2 que são citocinas pró inflamatórias. Desta forma esse derivado induziu uma imunossupressão pois foi capaz de diminuir tanto as citocinas pró-inflamatórias como antiinflamatórias. O Apremilast é um derivadoftalimidico, que é aprovado pelo FDA para o tratamento de pacientes adultos com artrite psoriática ativa, ele tem ação na inibição da produção de TNF α e IFN- α induzida via TLR4 e TLR9, respectivamente (SCHAFER et al., 2014). SANTOS et al., (2016) avaliaram tiazolftalimidico e encontraram diminuição dos níveis de IL-10 e TNF em células de macrófagos (J774A.1) estimuladas com LPS.

O derivado tiazolftalimidico AM1b apresentou atividade antineoplásica frente as linhagens de Du-145 (câncer de próstata) e Panc-1 (câncer de pâncreas), mas não frente as linhagens PC-3 e Mia paca-2. As linhagens Du-145 e PC-3 são células de câncer de próstata que possuem o fenótipo do tipo não luminal, no entanto, elas possuem diferentes status do gene *p53* e na expressão de PTEN. As células PC3 são nulas para expressão de *p53*, já as células DU145 expressam DN *p53* mutante (P223L / V274F). Já em relação ao gene antiapoptótico PTEN, ele é um gene frequentemente mutado no câncer de próstata, na linhagem PC-3 elas não expressam essa proteína já na linhagem DU145 elas possuem a proteína funcional (BELLUTI et al., 2019). Essas diferenças genotípicas podem ter influenciado na atividade do derivado frente a essas células tumorais.

O derivado AM1f apresentou atividade citotóxica nas quatro linhagens testadas, com IC₅₀ entre 14 a 26 μ M. Diferentemente dos derivados tiazolftalimidicos (FTs) os derivados AM1b e AM1f possuem em sua estrutura dois anéis tiazóis e um anel ftalimidico. Já os derivados FTs só tem um anel ftalimidico e um anel tiazol essa modificação estrutural na molécula pode ter contribuído consideravelmente para que os derivados AM1b e AM1f apresentassem atividade antineoplásica mais pronunciada do que os derivados FTs.

O derivado AM1f não influenciou no ciclo celular na linhagem Du-145, no entanto na linhagem PC-3 o dobro de IC₅₀ induziu um arrasto na fase S-G2/M. Na linhagem Panc-1, o dobro de IC₅₀ induziu um arrasto na fase G0/G1 assim como o tratamento com a doxorrubicina. A indução do arrasto do ciclo celular é uma

estratégia interessante para um novo agente antitumoral. O alcalóides da vinca e taxanos, inibidores do ciclo celular, desestabilizam os microtúbulos e induzem a morte celular. Esses medicamentos são usados para o tratamento de pacientes com diferentes tipos de câncer hematopoiéticos ou sólido há mais de 20 anos (HASCHKA et al., 2018).

Houve indução de morte celular por apoptose e necrose apenas na linhagem PC-3 tratadas com o derivado AM1f. As células tumorais geralmente tem a expressão proteínas anti-apoptóticas que inibem a apoptose celular desta forma induzir o aumento de proteínas apoptóticas é uma estratégia para induzir a morte celular fundamental para um candidato à nova agente quimioterápico (SANTOS et al., 2016).

O ensaio de toxicidade aguda é extremamente importante para avaliar o perfil de toxicidade de novos compostos em modelos animais, bem como avaliar concentrações atóxicas para estudos posteriores em animais. Os níveis de colesterol e triglicerídeos foram diminuídos, os de proteínas totais e albumina diminuíram por ambos os derivados e ambos os sexos. Mas em relação as enzimas hepáticas (AST e ALT) os níveis estavam elevados em todos os grupos tratados caracterizando um dano hepático do tratamento. Já os níveis de creatinina estavam diminuídos e os níveis de ureia estavam aumentados em todos os animais tratados caracterizando um dano renal (TABARRAEI et al., 2019). Abdel-Aziz et al., 2011 estudou derivado ftalimidicos N-substituídos na diminuição do colesterol e glicose em ratos Wistar tratados na dose de 10mg/Kg com alimentações hipercalóricas. O composto 5e reduziu drasticamente o nível de glicose no soro em 55%; enquanto 5c, 5e, 7d e 8e reduziram o colesterol sérico total em 58, 56, 54 e 53%.

No entanto ambos os derivados tiazolftalimidicos AM1B e AM1F diminuíram os níveis de colesterol e triglicerídeos em ambos os sexos tanto no ensaio de toxicidade aguda como no de toxicidade subcrônica. Vale ressaltar também que diminuir os níveis lipêmicos é uma resposta interessante pois altos níveis de triglicerídeos e colesterol levam a uma inflamação sistêmica. Estudos anteriores sugerem que o crescimento do tumor pode ser afetado pelo aumento de lipídios (ROHENA-RIVERA et al., 2017).

Em relação a toxicidade subcrônica foi observado para o tratamento do derivado AM1b levou a morte de 5 animais, 2 na dose de 4 mg/Kg e 3 na dose de 8 mg/Kg, alterações com dificuldade de respiração e inchaço nas patas também foram observados. Não foi observado essas alterações e nem óbitos de animais em

nenhum grupo dos animais tratados com o derivado AM1f. Assim como no ensaio de toxicidade aguda também foram observadas alterações nos parâmetros bioquímicos e hematimétricos em todos os grupos testados. Desta forma o derivado AM1b é considerado muito tóxico inviabilizando o estudo dessa molécula. De acordo com a OECD (do ingles, OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS) esse derivado é considerado muito toxico pois induziu a morte em doses menores que 5 mg/Kg.

O consumo de ração e de água foram diminuídos em todos os grupos tratados com o derivado AM1B, de forma significativa. O consumo de água e ração indicam o bem estar do animal e alteração indicam que o animal pode esta sentido algum desconforto (SON; CHANG; LEE, 2015).

A escolha para tornar um derivado um candidato a fármaco passa não só pela sua eficácia, mas como também por sua segurança. Desta forma, não há mortalidade e sinais de toxicidade, como redução no peso corporal, ingestão de alimentos, peso relativo dos órgãos, patologia bruta dos órgãos vitais durante o tratamento com doses diferentes em comparação com o controle no estudo de toxicidade aguda trás robustez para o estudo de novos candidatos a fármacos (KUMAR et al., 2018).

7 Considerações finais

- ✓ Os derivados tiazofthalimídicos não apresentaram citotoxicidade nas concentrações avaliadas em células mononucleares de sangue periférico.
- ✓ O derivado ftalimidico FT-12 apresentou citotoxicidade frente a linhagem Panc-1, PC-3, Sk-mel-28 já o derivado FT-9 apresentou citotoxicidade frente as linhagens Molt-4 e K-562.
- ✓ O derivado FT-12 diminuiu a formação de clones em PC-3 e Panc-1 e inibiu a migração em PC-3, além de induzir o aumento da morte celular na linhagem PC-3.
- ✓ O derivado tiazolftalimidico FT-6 estimulou a produção das citocinas IL-4, IL-10, e IL-6.
- ✓ O derivado tiazolftalimidico FT-3 reduziu a produção das citocinas IL-10, IL-4, IL-17A, IL-6 e IL-12 apresentando-se como um potencial derivado antiinflamatório.
- ✓ Os derivados AM1b e AM1f apresentaram citotoxicidade frente aos tumores sólidos Du-145, PC-3, Panc-1 e Mia-paca-2.
- ✓ O derivado AM1f induziu um arrasto no ciclo celular em Du-145 e em PC-3 além de induzir o aumento da morte celular em PC-3.
- ✓ Não houve variação significativa no percentual de células apoptóticas nas células Panc-1 e Mia-paca-2 após o tratamento com o derivado AM1f.
- ✓ O derivado AM1f induziu a senescência celular nas linhagens Du-145, Panc-1 e Mia-paca-2.
- ✓ Houve alteração no peso dos órgãos, parâmetros bioquímicos e hematológicos em camundongos Swisstratados principalmente pelo derivado AM1b.
- ✓ O derivado AM1f causou leves alterações no peso dos órgãos, parâmetros bioquímicos e hematológicos dos animais.
- ✓ O AM1b apresentou forte toxicidade levando a morte de 5 animais principalmente nas maiores doses.
- ✓ Não houve mortes nos animais tratados com o derivado AM1F e foram observadas leves variações no peso dos órgãos, parâmetros bioquímicos, hematológicos.

8 PERSPECTIVAS

- Investigar o mecanismo de ação dos novos derivados tiazolotiazofalimídicos por western blotting.
- Avaliar a atividade antineoplásica *in vivo* do derivado AM1f.

REFERÊNCIAS

1. ABDEL-AZIZ, Alaa A. M.; EL-AZAB, Adel S.; ATTIA, Sabry M.; AL-OBAID, Abdulrahman M.; AL-OMAR, Mohamed A.; EL-SUBBAGH, Hussein I. Synthesis and biological evaluation of some novel cyclic-imides as hypoglycaemic, anti-hyperlipidemic agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 46, n. 9, p. 4324–4329, 2011. DOI: 10.1016/j.ejmech.2011.07.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.07.002>.
2. ABEL, Erika L.; DIGIOVANNI, John. Multistage carcinogenesis. **Current Cancer Research**, [S. l.], v. 6, n. February, p. 27–51, 2011. DOI: 10.1007/978-1-61737-995-6_2.
3. ABOUTORABZADEH, Sayyed Mohammad; MOSAFFA, Fatemeh; HADIZADEH, Farzin; AND GHODSI, Razieh. Changes in expression of klotho affect physiological processes, diseases, and cancer. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 3–8, 2018. DOI: 10.22038/ijbms.2017.21892.5616.
4. AIDA, Shuji; HOZUMI, Masashi; ICHIKAWA, Daiju; IIDA, Kazuki; YONEMURA, Yuko. Biochemical and Biophysical Research Communications A novel phenylphthalimide derivative , pegylated TC11 , improves pharmacokinetic properties and induces apoptosis of high-risk myeloma cells via G2 / M cell-cycle arrest. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 493, n. 1, p. 514–520, 2017. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.08.159. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.08.159>.
5. AKGÜN, Hülya; KARAMELEKOGLU, Irem; BERK, Barkin; KURNAZ, Işıl; SARIBIYIK, Gizem; ÖKTEM, Sinem; KOCAGÖZ, Tanil. Synthesis and antimycobacterial activity of some phthalimide derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 20, n. 13, p. 4149–4154, 2012. DOI: 10.1016/j.bmc.2012.04.060.
6. ALANAZI, Amer M.; EL-AZAB, Adel S.; AL-SUWAIDAN, Ibrahim A.; ELTAHIR, Kamal Eldin H.; ASIRI, Yousif A.; ABDEL-AZIZ, Naglaa I.; ABDEL-AZIZ, Alaa A. M. Structure-based design of phthalimide derivatives as potential

- cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: Anti-inflammatory and analgesic activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 92, p. 115–123, 2015. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.12.039. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.12.039>.
7. ALEXANDROVA, A Y. Plasticity of tumor cell migration: acquisition of new properties or return to the past? **Biochemistry. Biokhimiia**, [S. l.], v. 79, n. 9, p. 947–63, 2014. DOI: 10.1134/S0006297914090107. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25385021>.
 8. ALIANÇA, Amanda Silva dos Santos; OLIVEIRA, Arsênio Rodrigues; FEITOSA, Ana Paula Sampaio; RIBEIRO, Karla Raíza Cardoso; DE CASTRO, Maria Carolina Accioly Brelaz; LEITE, Ana Cristina Lima; ALVES, Luiz Carlos; BRAYNER, Fábio André. In vitro evaluation of cytotoxicity and leishmanicidal activity of phthalimido-thiazole derivatives. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 105, p. 1–10, 2017. DOI: 10.1016/j.ejps.2017.05.005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2017.05.005>.
 9. ANDRADE, M.; SILVA, A. R. Administração de quimioterápicos: uma proposta de protocolo de enfermagem Chemotherapics. [S. l.], v. 60, n. 4, p. 331–335, 2007.
 10. ANNUNZIATO, Francesco; ROMAGNANI, Chiara; ROMAGNANI, Sergio. The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, [S. l.], v. 135, n. 3, p. 626–635, 2014. DOI: 10.1016/j.jaci.2014.11.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2014.11.001>.
 11. ARMOIRY, X.; AULAGNER, G.; FACON, T. Lenalidomide in the treatment of multiple myeloma. **Journal of clinical Pharmacy and Therapeutics**, [S. l.], v. 33, p. 219–226, 2008. DOI: 10.2146/ajhp070029.
 12. ARMSTRONG, Heather; BORDING-JORGENSEN, Michael; DIJK, Stephanie; WINE, Eytan. The complex interplay between chronic inflammation, the microbiome, and cancer: Understanding disease progression and what we can do to prevent it. **Cancers**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 1–29, 2018. DOI: 10.3390/cancers10030083.
 13. ARNETH, Borros. Tumor Microenvironment. **Medicina**, [S. l.], v. 56, n. 15, 2020.
 14. ARNOLD, Melina; SIERRA, Mónica S.; LAVERSANNE, Mathieu;

- SOERJOMATARAM, Isabelle; JEMAL, Ahmedin; BRAY, Freddie. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. **Gut**, [S. l.], v. 66, n. 4, p. 683–691, 2017. DOI: 10.1136/gutjnl-2015-310912.
15. ASADI, Parvin; KHODARAHMI, Ghadamali; JAHANIAN-NAJAFABADI, Ali; SAGHAIE, Lotfollah; HASSANZADEH, Farshid. Synthesis, characterization, molecular docking studies and biological evaluation of some novel hybrids based on quinazolinone, benzofuran and imidazolium moieties as potential cytotoxic and antimicrobial agents. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 9, p. 975–989, 2017. DOI: 10.22038/IJBMS.2017.9260.
 16. ASATI, Vivek; MAHAPATRA, Debarshi Kar; BHARTI, Sanjay K. Thiazolidine-2,4-diones as multi-targeted scaffold in medicinal chemistry: Potential anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 87, p. 814–833, 2014. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.10.025. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.10.025>.
 17. AYATI, Adile; EMAMI, Saeed; ASADIPOUR, Ali; SHAFIEE, Abbas; FOROUMADI, Alireza. Recent applications of 1,3-thiazole core structure in the identification of new lead compounds and drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 97, n. 1, p. 699–718, 2015. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.04.015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.015>.
 18. BAKER, Kristi. Organoids provide an important window on inflammation in cancer. **Cancers**, [S. l.], v. 10, n. 5, 2018. DOI: 10.3390/cancers10050151.
 19. BANSAL, Garima; SINGH, Shamsheer; MONGA, Vikramdeep; THANIKACHALAM, Punniyakoti Veeraveedu; CHAWLA, Pooja. Synthesis and biological evaluation of thiazolidine-2,4-dione-pyrazole conjugates as antidiabetic, anti-inflammatory and antioxidant agents. **Bioorganic Chemistry**, [S. l.], v. 92, n. June, p. 103271, 2019. DOI: 10.1016/j.bioorg.2019.103271. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103271>.
 20. BARROS, Francisco W. a. et al. Synthesis and cytotoxic activity of new acridine-thiazolidine derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 20, n. 11, p. 3533–3539, 2012. DOI: 10.1016/j.bmc.2012.04.007. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968089612002829>.
 21. BAUDINO, Troy A. Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae

- Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. **Current Drug Discovery Technologies**, [S. l.], v. 12, p. 3–20, 2015. DOI: 10.2174/1570163812666150602144310.
22. BELLUTI, Silvia; ORTECA, Giulia; SEMEGHINI, Valentina; RIGILLO, Giovanna; PARENTI, Francesca; FERRARI, Erika; IMBRIANO, Carol. Potent anti-cancer properties of phthalimide-based curcumin derivatives on prostate tumor cells. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 1, 2019. DOI: 10.3390/ijms20010028.
23. BRAY, Freddie; FERLAY, Jacques; SOERJOMATARAM, Isabelle; SIEGEL, Rebecca L.; TORRE, Lindsey A.; JEMAL, Ahmedin. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [S. l.], v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018. DOI: 10.3322/caac.21492.
24. CARDOSO, M. V. O. et al. Design , synthesis and structure-activity relationship of phthalimides endowed with dual antiproliferative and immunomodulatory activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 96, p. 491–503, 2015. a. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.04.041.
25. CARDOSO, Marcos Veríssimo De Oliveira et al. Design, synthesis and structure - Activity relationship of phthalimides endowed with dual antiproliferative and immunomodulatory activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 96, p. 491–503, 2015. b. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.04.041.
26. CASTRO BARRETO, Rosimar; PEREIRA, Giuseppe A. Scarano; COSTA, Lino João; CAVALCANTI, Hellen Rosi Barreto B. O Duplo Papel Da Inflamação No Surgimento Das Lesões Cancerígenas. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 107–114, 2010. DOI: 10.4034/RBCS/2010.14.04.15.
27. CASTRO SANT' ANNA, Carla; JUNIOR, Alberto Gomes Ferreira; SOARES, Paulo; TUJI, Fabricio; PASCHOAL, Eric; CHAVES, Luiz Cláudio; BURBANO, Rommel Rodriguez. Molecular biology as a tool for the treatment of cancer. **Clinical and Experimental Medicine**, [S. l.], v. 18, n. 4, p. 457–464, 2018. DOI: 10.1007/s10238-018-0518-1. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10238-018-0518-1>.
28. CAVALLO, Federica; DE GIOVANNI, Carla; NANNI, Patrizia; FORNI, Guido; LOLLINI, Pier Luigi. 2011: The immune hallmarks of cancer. **Cancer**

- Immunology, Immunotherapy**, [S. l.], v. 60, n. 3, p. 319–326, 2011. DOI: 10.1007/s00262-010-0968-0. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00262-010-0968-0>.
29. CHAGAS, Mbo; CORDEIRO, NCC; MARQUES, KMR; ROCHA PITTA, MG; RÊGO, MJBM; LIMA, MCA; PITTA, MGR; PITTA, IR. New thiazacridine agents: Synthesis, physical and chemical characterization, and in vitro anticancer evaluation. **Human & Experimental Toxicology**, [S. l.], v. 36, n. 10, p. 1059–1070, 2017. DOI: 10.1177/0960327116680274. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0960327116680274>.
30. CHAMMAS, Roger.; ONUCHIC, Ana Cláudia. Câncer e o microambiente tumoral Cancer and the tumor microenvironment. **Revista Médica**, [S. l.], v. 89, n. 1, p. 21–31, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.11606/issn.1679-9836.v89i1p21-31>.
31. COSMI, Lorenzo; MAGGI, Laura; SANTARLASCI, Veronica; LIOTTA, Francesco; ANNUNZIATO, Francesco. T helper cells plasticity in inflammation. **Cytometry Part A**, [S. l.], v. 85, n. 1, p. 36–42, 2014. DOI: 10.1002/cyto.a.22348.
32. DA ROCHA PITTA, Marina Galdino; SOUZA, Érika Silva; BARROS, Francisco Washington Araújo; MORAES FILHO, Manoel Odorico; PESSOA, Cláudia O.; HERNANDES, Marcelo Zaldini; DO CARMO ALVES DE LIMA, Maria; GALDINO, Suely Lins; DA ROCHA PITTA, Ivan. Synthesis and in vitro anticancer activity of novel thiazacridine derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, [S. l.], v. 22, n. 5, p. 2421–2429, 2013. DOI: 10.1007/s00044-012-0236-2. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00044-012-0236-2>.
33. DE OLIVEIRA, Sheilla Andrade et al. Phthalimido-thiazole as privileged scaffold: activity against immature and adult worms of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, [S. l.], v. 117, n. 7, p. 2105–2115, 2018. DOI: 10.1007/s00436-018-5897-4.
34. DIAZ-MORALLI, Santiago; TARRADO-CASTELLARNAU, Míriam; MIRANDA, Anibal; CASCANTE, Marta. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. **Pharmacology and Therapeutics**, [S. l.], v. 138, n. 2, p. 255–271, 2013. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2013.01.011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.01.011>.
35. EBLE, Johannes A.; NILAND, Stephan. The extracellular matrix in tumor progression and metastasis. **Clinical & Experimental Metastasis**, [S. l.], n.

- 123456789, 2019. DOI: 10.1007/s10585-019-09966-1. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10585-019-09966-1>.
36. FEDR, Radek; PERNICOVÁ, Zuzana; SLABÁKOVÁ, Eva; STRAKOVÁ, Nicol; BOUCHAL, Jan; GREPL, Michal; KOZUBÍK, Alois; SOUČEK, Karel. Automatic cell cloning assay for determining the clonogenic capacity of cancer and cancer stem-like cells. **Cytometry Part A**, [S. l.], v. 83 A, n. 5, p. 472–482, 2013. DOI: 10.1002/cyto.a.22273.
 37. FEIG, Christine; GOPINATHAN, Aarthi; NEESSE, Albrecht; CHAN, Derek S.; COOK, Natalie; TUVESON, David a. The pancreas cancer microenvironment. **Clin Cancer Res.**, [S. l.], v. 18, n. 16, p. 4266–4276, 2012. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3114.The.
 38. FERDINANDI, D. M.; FERREIRA, A. A. Agentes alquilantes: hematológicas reações adversas e complicações. **AC & T Científica**, [S. l.], n. 44, p. 1–12, 2009.
 39. FERLAY, J. et al. **GLOBOCAN 2012 v1.0, cancer incidence and mortality worldwide: IARC cancer base no. 11 [Internet]. International Agency for Research on Cancer, Lyon.** [s.l: s.n.].
 40. FERLAY, Jacques; SOERJOMATARAM, Isabelle; DIKSHIT, Rajesh; ESER, Sultan; MATHERS, Colin; REBELO, Marise; PARKIN, Donald Maxwell; FORMAN, David; BRAY, Freddie. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, [S. l.], v. 136, n. 5, 2015. DOI: 10.1002/ijc.29210.
 41. FOGEL, Evan L. et al. A Multidisciplinary Approach to Pancreas Cancer in 2016: A Review. **Am J Gastroenterol**, [S. l.], v. 112, n. 4, p. 537.554, 2017. DOI: 10.1016/j.physbeh.2017.03.040.
 42. FOO, Jasmine; MICHOR, Franziska. The evolution of accuired resistance to anti-cancer therapy. **J. Theor Biol.**, [S. l.], v. 0, p. 10–20, 2014. DOI: 10.1016/j.jtbi.2014.02.025.Evolution.
 43. FUJII, Shiro et al. Unique anti-myeloma activity by thiazolidine-2,4-dione compounds with Pim inhibiting activity. **British Journal of Haematology**, [S. l.], v. 180, n. 2, p. 246–258, 2018. DOI: 10.1111/bjh.15033.
 44. GALLUZZI, Lorenzo; VITALE, Ilio. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation**, [S. l.], v. 25, p. 486–541, 2018. DOI: 10.1038/s41418-017-0012-4.

45. GANGULY, Sourik S.; LI, Xiaohong; MIRANTI, Cindy K. The Host Microenvironment Influences Prostate Cancer Invasion, Systemic Spread, Bone Colonization, and Osteoblastic Metastasis. **Frontiers in Oncology**, [S. l.], v. 4, n. December, p. 1–16, 2014. DOI: 10.3389/fonc.2014.00364. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2014.00364/abstract>.
46. GASNIER, Anne; PARVIZI, Nassim. Updates on the diagnosis and treatment of prostate cancer. **British Journal of Radiology**, [S. l.], v. 90, n. 1075, p. 2–4, 2017. DOI: 10.1259/bjr.20170180.
47. GHORAB, Mostafa M.; AL-SAID, Mansour S. Antitumor activity of novel pyridine, thiophene and thiazole derivatives. **Archives of Pharmacal Research**, [S. l.], v. 35, n. 6, p. 965–973, 2012. DOI: 10.1007/s12272-012-0603-z.
48. GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, Ignacio; SOLANO, José D.; LOZA-MEJÍA, Marco a.; OLVERA-VÁZQUEZ, Susana; RODRÍGUEZ-SOTRES, Rogelio; MORÁN, Julio; LIRA-ROCHA, Alfonso; CERBÓN, Marco a. Antineoplastic activity of the thiazolo[5,4-b]quinoline derivative D3CLP in K-562 cells is mediated through effector caspases activation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 46, n. 6, p. 2102–2108, 2011. DOI: 10.1016/j.ejmech.2011.02.063. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0223523411001917>.
49. GUGGILAPU, Sravanthi Devi; GUNTUKU, Lalita; REDDY, T.Srinivasa; NAGARSENKAR, Atulya; SIGALAPALLI, Dilep Kumar; NAIDU, V. G. M.; BHARGAVA, Suresh K.; BATHINI, Nagendra Babu. Synthesis of thiazole linked indolyl-3-glyoxylamide derivatives as tubulin polymerization inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 138, p. 83–95, 2017. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.06.025. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.06.025>.
50. GUN, Sin Yee; WEI, Sharon; LEE, Ling; SIEOW, Je Lin. Redox Biology Targeting immune cells for cancer therapy. **Redox Biology**, [S. l.], v. 25, n. November 2018, p. 101174, 2019. DOI: 10.1016/j.redox.2019.101174. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101174>.
51. HAFIDH, Rand R.; ABDULAMIR, Ahmed S.; BAKAR, Fatimah Abu; JALILIAN, Farid Azizi; ABAS, Faridah; SEKAWI, Zamberi. Novel molecular, cytotoxic, and immunological study on promising and selective anticancer activity of mung bean sprouts. **BMC complementary and alternative medicine**, [S. l.],

- v. 12, p. 208, 2012. DOI: 10.1186/1472-6882-12-208. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3522559&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
52. HAGNER, Patrick R. et al. Activity of lenalidomide in mantle cell lymphoma can be explained by NK cell-mediated cytotoxicity. **BJH**, [S. l.], v. 179, n. August, p. 399–409, 2017. DOI: 10.1111/bjh.14866.
53. HAJJI, Nabil; GARCÍA-DOMÍNGUEZ, Daniel J.; HONTECILLAS-PRIETO, Lourdes; O'NEILL, Kevin; DE ÁLAVA, Enrique; SYED, Nelofer. The bitter side of epigenetics: variability and resistance to chemotherapy. **Epigenomics**, [S. l.], v. 1, 2018. DOI: 10.2217/epi-2017-0112. Disponível em: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/epi-2017-0112>.
54. HANAHAN, Douglas; COUSSENS, Lisa M. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. **Cancer Cell**, [S. l.], v. 21, n. 3, p. 309–322, 2012. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.02.022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.022>.
55. HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert. The Hallmarks of Cancer. **Cell Press**, [S. l.], v. 100, p. 57–70, 2000.
56. HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert a. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, [S. l.], v. 144, n. 5, p. 646–74, 2011. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S0092867411001279/fulltext>.
57. HARADA, Koichiro; KUBO, Hideki; ABE, Jun; HANETA, Mari; CONCEPTION, Arnel; INOUE, Shinichi; OKADA, Satoshi; NISHIOKA, Kazuhiko. Discovery of potent and orally bioavailable 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 3 inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 20, n. 10, p. 3242–3254, 2012. DOI: 10.1016/j.bmc.2012.03.052. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2012.03.052>.
58. HARRIS, Robert a. Spatial, Temporal, and Functional Aspects of Macrophages during “The Good, the Bad, and the Ugly” phases of Inflammation. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 5, n. December, p. 3–6, 2014. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00612. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00612/abstract>.
59. HASCHKA, Manuel; KARBON, Gerlinde; FAVA, Luca L.; VILLUNGER, Andreas. Perturbing mitosis for anti-cancer therapy: is cell death the only answer? **EMBO reports**, [S. l.], v. 19, n. 3, p. 1–20, 2018. DOI:

- 10.15252/embr.201745440.
60. HASSAN, Ghada S.; EL-MESSERY, Shahenda M.; AL-OMARY, Fatmah A. M.; EL-SUBBAGH, Hussein I. Substituted thiazoles VII. Synthesis and antitumor activity of certain 2-(substituted amino)-4-phenyl-1,3-thiazole analogs. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, [S. l.], v. 22, n. 20, p. 6318–6323, 2012. DOI: 10.1016/j.bmcl.2012.08.095. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.08.095>.
 61. HASSANEEN, H. M.; ATTA, S. M. S.; FAWZY, N. M.; AHMED, F. A.; HEGAZI, A. G.; ABDALLA, F. A.; ABD EL RAHMAN, A. H. A new synthesis of oxadiazole, thiazolidinone, N-phthalimidoamino carbonyl and arylidene derivatives with potential antimicrobial activity. **Archiv der Pharmazie**, [S. l.], v. 335, n. 6, p. 251–261, 2002. DOI: 10.1002/1521-4184(200208)335:6<251::AID-ARDP251>3.0.CO;2-5.
 62. HE, Qin; FU, Yu; TIAN, Dean; YAN, Wei. The contrasting roles of inflammasomes in cancer. **Am J Cancer Res**, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 566–583, 2018.
 63. ILIC, Milena; ILIC, Irena. Epidemiology of pancreatic cancer. **World Journal of Gastroenterology**, [S. l.], v. 22, n. 44, p. 9694–9705, 2016. DOI: 10.3748/wjg.v22.i44.9694.
 64. INCA. **ABC DO CÂNCER: Abordagens Básicas para o Controle do Câncer**. [s.l.: s.n.]. DOI: ISBN 978-85-7318-188-3. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/abc_do_cancer_2ed.pdf.
 65. INCA. Estimativa 2018-Incidência de câncer no Brasil. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**, [S. l.], p. 130, 2017. a. DOI: 978-85-7318-283-5.
 66. INCA. **Estimate/2018 – Cancer Incidence in Brazil**. [s.l.: s.n.].
 67. INCA. **Estimativa 2020**. [s.l.: s.n.].
 68. KAMIŃSKI, Krzysztof; OBNISKA, Jolanta; WIKLIK, Beata; ATAMANYUK, Dmytro. Synthesis and anticonvulsant properties of new acetamide derivatives of phthalimide, and its saturated cyclohexane and norbornene analogs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 46, n. 9, p. 4634–4641, 2011. DOI: 10.1016/j.ejmech.2011.07.043.
 69. KAUR MANJAL, Sundeep; KAUR, Ramandeep; BHATIA, Rohit; KUMAR, Kapil; SINGH, Virender; SHANKAR, Ravi; KAUR, Rupinder; RAWAL, Ravindra K. Synthetic and medicinal perspective of thiazolidinones: A review.

- Bioorganic Chemistry**, [S. l.], v. 75, p. 406–423, 2017. DOI: 10.1016/j.bioorg.2017.10.014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.10.014>.
70. KIM, Eun Jee; LEE, Jae Geun; KIM, Joon Ye; HWAN, Seung; JOO, Dong Jin; HA, Kyu; KIM, Myoung Soo; KIM, Seok; SEUN, Yu. Enhanced immune-modulatory effects of thalidomide and dexamethasone co-treatment on T cell subsets. **Immunology**, [S. l.], v. 152, p. 628–637, 2017. DOI: 10.1111/imm.12804.
71. KLEMM, Florian; JOYCE, Johanna a. Microenvironmental regulation of therapeutic response in cancer. **Trends in cell biology**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 198–213, 2014. DOI: 10.1016/j.tcb.2014.11.006. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0962892414001998>.
72. KOK, Stanton Hon Lung et al. Synthesis and anti-cancer activity of benzothiazole containing phthalimide on human carcinoma cell lines. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 16, n. 7, p. 3626–3631, 2008. DOI: 10.1016/j.bmc.2008.02.005.
73. KUMAR, Dinesh et al. Antitumour, acute toxicity and molecular modeling studies of 4-(pyridin-4-yl)-6-(thiophen-2-yl) pyrimidin-2(1H)-one against Ehrlich ascites carcinoma and sarcoma-180. **Heliyon**, [S. l.], v. 4, n. 6, p. e00661, 2018. DOI: 10.1016/j.heliyon.2018.e00661. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00661>.
74. L. ARIAS, J. Drug Targeting Strategies in Cancer Treatment: An Overview. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 1–17, 2011. DOI: 10.2174/138955711793564024. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-5575&volume=11&issue=1&spage=1>.
75. LAGRUE, Kathryn; CARISEY, Alex; MORGAN, David J.; CHOPRA, Rajesh; DAVIS, Daniel M. Lenalidomide augments actin remodelling and lowers NK cell activation thresholds. **Blood**, [S. l.], v. 126, n. 1, p. 50–60, 2015. DOI: 10.1182/blood-2015-01-625004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26002964>.
76. LAU, Colleen M.; SUN, Joseph C. The widening spectrum of immunological memory. **Current Opinion in Immunology**, [S. l.], v. 54, p. 42–49, 2018. DOI: 10.1016/j.coi.2018.05.013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.05.013%0Ahttp://linkinghub.elsevier.com/retr>

- ieve/pii/S0952791517301747.
77. LEE, Sylvia; MARGOLIN, Kim. Cytokines in cancer immunotherapy. **Cancers**, [S. l.], v. 3, n. 4, p. 3856–3893, 2011. DOI: 10.3390/cancers3043856.
 78. LI, Wenlu; GAO, Chunmei; ZHAO, Lei; YUAN, Zigao; CHEN, Yuzong; JIANG, Yuyang. Phthalimide conjugations for the degradation of oncogenic PI3K. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 151, p. 237–247, 2018. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.03.066. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.03.066>.
 79. LOCY, Hanne; DE MEY, Sven; DE MEY, Wout; DE RIDDER, Mark; THIELEMANS, Kris; MAENHOUT, Sarah K. Immunomodulation of the Tumor Microenvironment: Turn Foe Into Friend. **Frontiers in immunology**, [S. l.], v. 9, n. December, p. 2909, 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02909.
 80. MAAZI, Hadi; AKBARI, Iomid. Type two innate lymphoid cells; the Janus cells in health and disease. **Immunol Rev.**, [S. l.], v. 278, n. 1, p. 192-206, 2017. DOI: 10.1016/j.cogdev.2010.08.003. Personal.
 81. MASSAOKA, Mariana H.; MATSUO, Alisson L.; FIGUEIREDO, Carlos R.; GIROLA, Natalia; FARIA, Camyla F.; AZEVEDO, Ricardo a.; TRAVASSOS, Luiz R. A novel cell-penetrating peptide derived from WT1 enhances p53 activity, induces cell senescence and displays antimelanoma activity in xeno- and syngeneic systems. **FEBS Open Bio**, [S. l.], v. 4, p. 153–161, 2014. DOI: 10.1016/j.fob.2014.01.007. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211546314000084>.
 82. MCGUIGAN, Andrew; KELLY, Paul; TURKINGTON, Richard C.; JONES, Claire; COLEMAN, Helen G.; MCCAIN, R. Stephen. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. **World Journal of Gastroenterology**, [S. l.], v. 24, n. 43, p. 4846–4861, 2018. DOI: 10.3748/wjg.v24.i43.4846.
 83. MILLRINE, David; MIYATA, Haruhiko; TEI, Mami; DUBEY, Praveen; NYATI, Kishan; NAKAHAMA, Taisuke; GEMECHU, Yohannes; RIPLEY, Barry; KISHIMOTO, Tadamitsu. Immunomodulatory drugs inhibit TLR4-induced type-1 interferon production independently of Cereblon via suppression of the TRIF/IRF3 pathway. **International Immunology**, [S. l.], v. 28, n. 6, p. 307–315, 2016. DOI: 10.1093/intimm/dxw005.
 84. MILLS, Christopher C.; KOLB, EA.; SAMPSON, Valerie B. Development of chemotherapy with cell cycle inhibitors for adult and pediatric cancer therapy.

- Cancer Res**, [S. l.], v. 78, n. 2, p. 320–325, 2018. DOI: 10.1016/j.physbeh.2017.03.040.
85. MOHAMED, Shima Ibrahim Abdelmonym; JANTAN, Ibrahim; HAQUE, Md Areeful. Naturally occurring immunomodulators with antitumor activity: An insight on their mechanisms of action. **International Immunopharmacology**, [S. l.], v. 50, n. July, p. 291–304, 2017. DOI: 10.1016/j.intimp.2017.07.010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2017.07.010>.
86. MOHME, Malte; RIETHDORF, Sabine; PANTEL, Klaus. Circulating and disseminated tumour cells-mechanisms of immune surveillance and escape. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 155–167, 2017. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.144. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.144>.
87. MORO, Adriana; INVERNIZZI, Noela. A tragédia da talidomida. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos, Rio de Janeiro**, [S. l.], v. 24, n. 3, p. 603–622, 2017. DOI: 10.1590/S0104-59702017000300004.
88. MOULD, Diane R.; HUTSON, Paul R. Critical Considerations in Anticancer Drug Development and Dosing Strategies: The Past, Present, and Future. **The Journal of Clinical Pharmacology**, [S. l.], v. 57, p. 116–128, 2017. DOI: 10.1002/jcph.983.
89. MPHAHLELE, Malose; MALULEKA, Marole; MAKHAFOLA, Tshepiso; MABETA, Peace. Novel Polycarbo-Substituted Alkyl (Thieno[3,2-c]quinoline)-2-Carboxylates: Synthesis and Cytotoxicity Studies. **Molecules**, [S. l.], v. 19, n. 11, p. 18527–18542, 2014. DOI: 10.3390/molecules191118527. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1420-3049/19/11/18527/>.
90. MUENST, S.; LÄUBLI, H.; SOYSAL, S. D.; ZIPPELIUS, A.; TZANKOV, A.; HOELLER, S. The immune system and cancer evasion strategies: Therapeutic concepts. **Journal of Internal Medicine**, [S. l.], v. 279, n. 6, p. 541–562, 2016. DOI: 10.1111/joim.12470.
91. NAGARSHETH, Nisha; WICHA, Max S.; ZOU, Weiping. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. **Nat Rev Immunol.**, [S. l.], v. 17, n. 9, p. 559–572, 2017. DOI: 10.1038/nri.2017.49.Chemokines.
92. NARESH, Annavareddi; VENKATESWARA RAO, Maddimsetti; KOTAPALLI, Sudha Sravanti; UMMANNI, Ramesh; VENKATESWARA RAO, Batchu. Oxazolidinone derivatives: Cytoazone–Linezolid hybrids induces apoptosis

- and senescence in DU145 prostate cancer cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 80, p. 295–307, 2014. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.04.062. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0223523414003833>.
93. OCAÑA, M^a Carmen; MARTÍNEZ-POVEDA, Beatriz; QUESADA, Ana R.; MEDINA, Miguel Ángel. Metabolism within the tumor microenvironment and its implication on cancer progression: An ongoing therapeutic target. **Medicinal Research Reviews**, [S. l.], n. May, p. 1–44, 2018. DOI: 10.1002/med.21511.
94. OLIVEIRA, JAMERSON FERREIRA DE SILVA, Anekécia Lauro Da et al. Synthesis of thiophene-thiosemicarbazone derivatives and evaluation of their in vitro and in vivo antitumor activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 104, p. 148–156, 2015. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.09.036. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.09.036>.
95. OLVER, Ian; CAREY, Mariko; BOYES, Allison; HALL, Alix; NOBLE, Natasha; BRYANT, Jamie; WALSH, Justin; SANSON-FISHER, Rob. The timeliness of patients reporting the side effects of chemotherapy. **Support Care Cancer The**, [S. l.], 2018.
96. OU, Yao; ZHANG, Quan; TANG, Yiting; LU, Zhonghua; LU, Xujing; ZHOU, Xifa; LIU, Changmin. DNA methylation enzyme inhibitor RG108 suppresses the radioresistance of esophageal cancer. **Oncology Reports**, [S. l.], v. 39, n. 3, p. 993–1002, 2018. DOI: 10.3892/or.2018.6210.
97. PATHANIA, Shelly; BHATIA, Rohit; BALDI, Ashish; SINGH, Randhir; RAWAL, Ravindra K. Drug metabolizing enzymes and their inhibitors' role in cancer resistance. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 105, n. May, p. 53–65, 2018. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.05.117. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.117>.
98. PEÑA-OYARZUN, Daniel et al. Autophagy and oxidative stress in non-communicable diseases: A matter of the inflammatory state? **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 124, p. 61–78, 2018. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.084. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.084>.
99. PÉREZ-HERRERO, Edgar; FERNÁNDEZ-MEDARDE, Alberto. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [S. l.], v. 93,

- n. March, p. 52–79, 2015. DOI: 10.1016/j.ejpb.2015.03.018.
100. PIACENTINI, Amanda Bernardini; MENEZES, Hercules. Recentes aspectos sobre a biologia do câncer e das metástases. **Revista Saúde e Pesquisa**, [S. l.], v. 5, n. 3, p. 593–604, 2012.
 101. PUN, Ivan Ho Yuen et al. Anti-cancer effects of a novel quinoline derivative 83b1 on human esophageal squamous cell carcinoma through down-regulation of COX-2 mRNA and PGE2. **Cancer Research and Treatment**, [S. l.], v. 49, n. 1, p. 219–229, 2017. DOI: 10.4143/crt.2016.190.
 102. QU, Xinglong; TANG, Ying; HUA, Shucheng. Immunological approaches towards cancer and inflammation: A cross talk. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 9, n. MAR, 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00563.
 103. QUAIL, Df; JOYCE, Ja. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nature medicine**, [S. l.], v. 19, n. 11, p. 1423–1437, 2013. DOI: 10.1038/nm.3394.Microenvironmental. Disponível em: <http://www.nature.com/nm/journal/v19/n11/abs/nm.3394.html>.
 104. RÊGO, Moacyr Jesus Barreto De Melo et al. Synthesis, in vitro anticancer activity and in silico study of new disubstituted thiazolidinedione derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, [S. l.], v. 23, n. 6, p. 3220–3226, 2014. DOI: 10.1007/s00044-013-0902-z. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00044-013-0902-z>.
 105. RICCIO, Gennaro; LAURITANO, Chiara. Microalgae with immunomodulatory activities. **Marine Drugs**, [S. l.], v. 18, n. 1, 2020. DOI: 10.3390/md18010002.
 106. ROHENA-RIVERA, Krizia; SANCHEZ-VAZQUEZ, Maria M.; APONTE-COLON, Diana A.; FORESTIER-ROMAN, Ingrid S.; QUINTERO-AGUILO, Mario E.; MARTANEZ-FERRER, Magaly. IL-15 regulates migration, invasion, angiogenesis and genes associated with lipid metabolism and inflammation in prostate cancer. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 12, n. 4, p. 1–27, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0172786.
 107. ROHITKUMAR, Heggodu G.; ASHA, Kittur R.; RAGHAVAN, Sathees C.; ADVI RAO, Gopal M. DNA intercalative 4-butylaminopyrimido[4,5-f]thieno(2,3-b)quinoline induces cell cycle arrest and apoptosis in leukemia cells. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, [S. l.], v. 75, n. 6, p. 1121–1133, 2015. DOI: 10.1007/s00280-015-2735-6.

108. ROMAGNOLI, Romeo et al. Concise Synthesis and Biological Evaluation of 2 - Aroyl-5-Amino Benzo[b]thiophene Derivatives As a Novel Class of Potent Antimitotic Agents. **J. Med. Chem.**, [S. l.], v. 56, p. 9296, 2013.
109. RUFFELL, Brian; AFFARA, Nesrine I.; COUSSENS, Lisa M. Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. **Trends in Immunology**, [S. l.], v. 33, n. 3, p. 119–126, 2012. DOI: 10.1016/j.it.2011.12.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2011.12.001>.
110. RÜHLE, Alexander; HUBER, Peter E.; SAFFRICH, Rainer; LOPEZ PEREZ, Ramon; NICOLAY, Nils H. The current understanding of mesenchymal stem cells as potential attenuators of chemotherapy-induced toxicity. **International Journal of Cancer**, [S. l.], p. 1–42, 2018. DOI: 10.1002/ijc.31619. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.31619>.
111. SALEM, Othman M. et al. New spiro tria(thia)zolidine-acridines as topoisomerase inhibitors, DNA binders and cytostatic compounds. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 86, p. 690–700, 2016. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.02.018. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813016301507>.
112. SANTOS, Thiago André R.; DA SILVA, Aline Caroline; SILVA, Elany Barbosa; DE MORAES GOMES, Paulo André Teixeira; ESPÍNDOLA, José Wanderlan Pontes; DE OLIVEIRA CARDOSO, Marcos Veríssimo; MOREIRA, Diogo Rodrigo Magalhaes; LEITE, Ana Cristina Lima; PEREIRA, Valéria R. A. Antitumor and immunomodulatory activities of thiosemicarbazones and 1,3-Thiazoles in Jurkat and HT-29 cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 82, p. 555–560, 2016. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.05.038. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.05.038>.
113. SCHAFER, P. H. et al. Apremilast is a selective PDE4 inhibitor with regulatory effects on innate immunity. **Cellular Signalling**, [S. l.], v. 26, n. 9, p. 2016–2029, 2014. DOI: 10.1016/j.cellsig.2014.05.014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.05.014>.
114. SCHNEIDER, Petra; SCHNEIDER, Gisbert. Privileged Structures Revisited. **Angewandte Chemie - International Edition**, [S. l.], v. 56, n. 27, p. 7971–7974, 2017. DOI: 10.1002/anie.201702816.
115. SHANG, Xiao-Fei; MORRIS-NATSCHKE, Susan L.; LIU, Ying-Qian;

- GUO, Xiao; XU, Xiao-Shan; GOTO, Masuo; LI, Jun-Cai; YANG, Guan-Zhou; LEE, Kuo-Hsiung. Biologically active quinoline and quinazoline alkaloids part I. **Med Res Rev.**, [S. l.], v. 38, n. 3, p. 775–828, 2018. DOI: 10.1016/j.physbeh.2017.03.040. Disponível em: file:///C:/Users/Carla Carolina/Desktop/Artigos para acrescentar na qualificação/The impact of birth weight on cardiovascular disease risk in the.pdf.
116. SHARMA, U.; KUMAR, P.; KUMAR, N.; SINGH, B. Recent Advances in the Chemistry of Phthalimide Analogues and their Therapeutic Potential. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 10, n. 8, p. 678–704, 2010. DOI: 10.2174/138955710791572442. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-5575&volume=10&issue=8&spage=678>.
117. SHAVETA; MISHRA, Sahil; SINGH, Palwinder. Hybrid molecules: The privileged scaffolds for various pharmaceuticals. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 124, p. 500–536, 2016. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.08.039. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.08.039>.
118. SHNAIDER, Polina V.; IVANOVA, Olga M.; MALYANTS, Irina K.; ANUFRIEVA, Ksenia S.; SEMENOV, Ilya A.; PAVLYUKOV, Marat S.; LAGARKOVA, Maria A.; GOVORUN, Vadim M.; SHENDER, Victoria O. New insights into therapy-induced progression of cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 21, p. 1–29, 2020. DOI: 10.3390/ijms21217872.
119. SHRESTHA, Gajendra; CLAIR, Larry L.St; NEILL, Kim L. O. The Immunostimulating Role of Lichen Polysaccharides: A Review. **PHYTOTHERAPY RESEARCH**, [S. l.], n. September, 2014.
120. SIEBEN, Cynthia J.; STURMLECHNER, Ines; SLUIS, Bart van de and; DEURSEN, Jan M. Van. Two-step senescence-focused cancer therapies. **Trends Cell Biol.**, [S. l.], v. 28, n. 9, p. 723–737, 2018. DOI: 10.1016/j.physbeh.2017.03.040.
121. SMYTH, Mark J.; NGIOW, Shin Foong; RIBAS, Antoni; TENG, Michele W. L. Combination cancer immunotherapies tailored to the tumour microenvironment. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [S. l.], v. 13, n. 3, p. 143–158, 2016. DOI: 10.1038/nrclinonc.2015.209. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.209>.

122. SOLOMON, Lauren A.; BATISTA, Carolina R.; DEKOTER, Rodney P. Lenalidomide modulates gene expression in human ABC-DLBCL cells by regulating IKAROS interaction with an intronic control region of SPIB. **Experimental Hematology**, [S. l.], v. 56, p. 46–57.e1, 2017. DOI: 10.1016/j.exphem.2017.09.002. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2017.09.002>.
123. SON, Hee Kyoung; CHANG, Hae Choon; LEE, Jae Joon. Acute and subacute oral toxicity evaluation of crude antifungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* HD1 in rats. **Preventive Nutrition and Food Science**, [S. l.], v. 20, n. 3, p. 190–197, 2015. DOI: 10.3746/pnf.2015.20.3.190.
124. SONG, Yu'ning; CHEN, Wenmin; KANG, Dongwei; ZHANG, Qingzhu; ZHAN, Peng; LIU, Xinyong. “Old friends in new Guise”: exploiting privileged structures for scaffold re-evolution/refining. **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, [S. l.], v. 17, n. 6, p. 536–53, 2014. DOI: 10.2174/1386207317666140122101631. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24446784>.
125. STEVEN, André; SELIGER, Barbara. The Role of Immune Escape and Immune Cell Infiltration in Breast Cancer. **Breast Care**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 16–21, 2018. DOI: 10.1159/000486585. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/FullText/486585>.
126. TABARRAEI, Hadi; HASSAN, Jalal; PARVIZI, Mohammad Reza; GOLSHAHI, Hannaneh; KESHAVARZ-TARIKHI, Hossain. Evaluation of the acute and sub-acute toxicity of the black caraway seed essential oil in Wistar rats. **Toxicology Reports**, [S. l.], v. 6, n. April 2017, p. 869–874, 2019. DOI: 10.1016/j.toxrep.2019.08.010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.08.010>.
127. TASHIREVA, L. A.; PERELMUTER, V. M.; MANSKIKH, V. N.; DENISOV, E. V.; SAVELIEVA, O. E.; KAYGORODOVA, E. V.; ZAVYALOVA, M. V. Types of immune-inflammatory responses as a reflection of cell–cell interactions under conditions of tissue regeneration and tumor growth. **Biochemistry (Moscow)**, [S. l.], v. 82, n. 5, p. 542–555, 2017. DOI: 10.1134/S0006297917050029. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1134/S0006297917050029>.
128. THAPA MAGAR, Til Bahadur; KADAYAT, Tara Man; LEE, Hwa Jong;

- PARK, Seojeong; BIST, Ganesh; SHRESTHA, Aarajana; KWON, Youngjoo; LEE, Eung Seok. 2-Chlorophenyl-substituted benzofuro[3,2-b]pyridines with enhanced topoisomerase inhibitory activity: The role of the chlorine substituent. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, [S. l.], v. 27, n. 15, p. 3279–3283, 2017. DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.06.025. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.06.025>.
129. THOMAS, Divya; RADHAKRISHNAN, Prakash. Tumor-stromal crosstalk in pancreatic cancer and tissue fibrosis. **Molecular Cancer**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 1–15, 2019. DOI: 10.1186/s12943-018-0927-5.
130. TROTSKO, Nazar; KOSIKOWSKA, Urszula; PANETH, Agata; PLECH, Tomasz; MALM, Anna; WUJEC, Monika. Synthesis and antibacterial activity of new thiazolidine-2,4-dione-based chlorophenylthiosemicarbazone hybrids. **Molecules**, [S. l.], v. 23, n. 5, 2018. DOI: 10.3390/molecules23051023.
131. TSAI, Ming-Ju; CHANG, Wei-An; HUANG, Ming-Shyan; KUO, Po-Lin. Tumor Microenvironment: A New Treatment Target for Cancer. **ISRN Biochemistry**, [S. l.], v. 2014, p. 1–8, 2014. DOI: 10.1155/2014/351959. Disponível em: <https://www.hindawi.com/archive/2014/351959/>.
132. WAN, Yichao; LI, Yuanhua; YAN, Chunxing; YAN, Mi; TANG, Zilong. Indole: A privileged scaffold for the design of anti-cancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 183, p. 111691, 2019. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.111691. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111691>.
133. WANG, Guocan; ZHAO, Di; SPRING, Denise J.; DEPINHO, Ronald A. Genetics and biology of prostate cancer. **Genes and Development**, [S. l.], v. 32, n. 17–18, p. 1105–1140, 2018. DOI: 10.1101/gad.315739.118.
134. WANG, J. J.; LEI, K. F.; HAN, F. Tumor microenvironment: Recent advances in various cancer treatments. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, [S. l.], v. 22, n. 12, p. 3855–3864, 2018. DOI: 10.26355/eurrev-201806-15270.
135. WEISS, DOUGLAS J.; WARDROP, K.Jane. **Schalm's veterinary hematology 6th ed.** [s.l: s.n.]. v. XXXIII DOI: 10.1007/s13398-014-0173-7.2. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15003161%5Cnhttp://cid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/cid/cir991%5Cnhttp://www.scielo.cl/pdf/udecada/v15n26/art06.pdf%5Cnhttp://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0->

- 84861150233&partnerID=tZOtx3y1.
136. WINTER, Georg E.; BUCKLEY1, Dennis L.; PAULK, Joshiawa; ROBERTS, Justin M.; SOUZA, Amanda; DHE-PAGANON, Sirano; BRADNER, James E. Selective Target Protein Degradation via Phthalimide Conjugation. **Science**, [S. l.], v. 348, n. 6241, p. 1376–1381, 2015. DOI: 10.1097/OGX.0000000000000256.Prenatal.
 137. WITZ, Isaac P. The Tumor Microenvironment: The Making of a Paradigm. **Cancer Microenvironment**, [S. l.], v. 2, n. S1, p. 9–17, 2009. DOI: 10.1007/s12307-009-0025-8. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12307-009-0025-8>.
 138. YEH, Teng Kuang et al. Design, Synthesis, and Evaluation of Thiazolidine-2,4-dione Derivatives as a Novel Class of Glutaminase Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 60, n. 13, p. 5599–5612, 2017. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00282.
 139. ZAHRAN, Magdy A. H.; ABDIN, Yasmin G.; OSMAN, Amany M. A.; GAMAL-ELDEEN, Amira M.; TALAAT, Roba M.; PEDERSEN, Erik B. Synthesis and evaluation of thalidomide and phthalimide esters as antitumor agents. **Archiv der Pharmazie**, [S. l.], v. 347, n. 9, p. 642–649, 2014. DOI: 10.1002/ardp.201400073.
 140. ZAHRAN, Magdy A. H.; EL-AARAG, Bishoy; MEHANY, Ahmed B. M.; BELAL, Amany; YOUNES, Ali S. Design, synthesis, biological evaluations, molecular docking, and in vivo studies of novel phthalimide analogs. **Archiv der Pharmazie**, [S. l.], n. March, p. 1–12, 2018. DOI: 10.1002/ardp.201700363.
 141. ZEIDNER, Joshua F. et al. Immunomodulation with pomalidomide at early lymphocyte recovery after induction chemotherapy in newly diagnosed AML and high-risk MDS. **Leukemia**, [S. l.], 2020. DOI: 10.1038/s41375-019-0693-4. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41375-019-0693-4>.
 142. ZHENG, Shilong; ZHONG, Qiu; JIANG, Quan; MOTTAMAL, Madhusoodanan; ZHANG, Qiang; ZHU, Naijue; BUROW, Matthew E.; WORTHYLAKE, Rebecca A.; WANG, Guangdi. Discovery of a series of thiazole derivatives as novel inhibitors of metastatic cancer cell migration and invasion. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, [S. l.], v. 4, n. 2, p. 191–196, 2013. a. DOI: 10.1021/ml300322n.
 143. ZHENG, Shilong; ZHONG, Qiu; JIANG, Quan; MOTTAMAL,

- Madhusoodanan; ZHANG, Qiang; ZHU, Naijue; BUROW, Matthew E.; WORTHYLAKE, Rebecca A.; WANG, Guangdi. Discovery of a series of thiazole derivatives as novel inhibitors of metastatic cancer cell migration and invasion. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, [S. l.], v. 4, n. 2, p. 191–196, 2013. b. DOI: 10.1021/ml300322n.
144. ZHUANG, Chunlin; ZHANG, Wen; SHENG, Chunquan; ZHANG, Wannian; XING, Chengguo; MIAO, Zhenyuan. Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. **Chemical Reviews**, [S. l.], v. 117, n. 12, p. 7762–7810, 2017. DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00020.
145. ZIMMERMANN, Markus O.; LANGE, Andreas; WILCKEN, Rainer; CIESLIK, Markus B.; EXNER, Thomas E.; JOERGER, Andreas C.; KOCH, Pierre; BOECKLER, Frank M. Halogen-enriched fragment libraries as chemical probes for harnessing halogen bonding in fragment-based lead discovery. **Future Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 6, n. 6, p. 617–639, 2014. DOI: 10.4155/fmc.14.20.

ANEXO 1-PARECER CEP ANIMAL



Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Biociências
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-430 / Recife - PE - Brasil
 Fone: 3346 5142
 ccea@ufpe.br

Recife, 28 de dezembro de 2019

Ofício nº 119/19

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

Para: Prof. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Departamento de Bioquímica/ Laboratório de Imunomodulação e Novas
 Abordagens Terapêuticas/CB

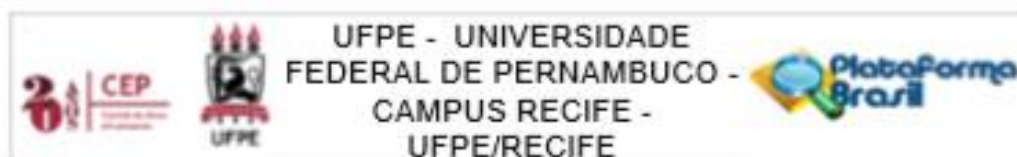
Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 0048/2019

Certificamos que a proposta intitulada “Avaliação da atividade imunomoduladora dos novos derivados galactosídeos e tiazofalimidícos.”, registrado com o nº 0048/2019 sob a responsabilidade de Prof. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo o que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 17/12/2019

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	17/12/2019 a 30/12/2020
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico
Nº de animais	30
Peso/Idade	20-25g(38- 40 dias)
Sexo	Fêmea (30)
Origem: Biotério de Criação	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) UFPE
Destino: Biotério de Experimentação	Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

ANEXO 2- PARECER COMITE DE ETICA HUMANO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E IMUNOMODULADORA DE NOVOS DERIVADOS TIAZOLFTALIMIDICOS E GALACTOSÍDEOS

Pesquisador: Fláviana Alves dos Santos

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 19491619.5.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.651.966

Apresentação do Projeto:

O projeto "Avaliação da Atividade Antitumoral e Imunomoduladora de Novos Derivados Tiazolftalimídicos e Galactosídeos" trata-se de um projeto de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco, da doutoranda Fláviana Alves dos Santos, tendo como orientador o Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta e como co-orientadores o Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rago e a Profa. Dra. Marina Galdino da Rocha Pitta. A busca de novas moléculas com atividade antiinflamatória e antitumoral, devido aos esquemas terapêuticos não serem tão eficientes, se faz necessária. Dessa forma, o estudo proposto consiste na busca de novas moléculas que podem se tornar futuros fármacos com atividade tanto antitumoral como antiinflamatória, sendo um estudo experimental, através de ensaios in vitro, utilizando células mononucleares do sangue periférico normais de doadores saudáveis.

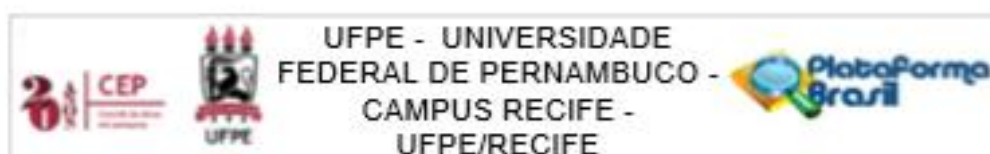
Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral:

Avaliar a atividade antineoplásica e antiinflamatória de novos derivados tiazolftalimídicos e galactosídeos.

Objetivos secundários:

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **Cep:** 50.740-800
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 3.051.960

- Investigar a citotoxicidade dos derivados tiazotftalimidicos e galactosídeos frente a células mononucleares de sangue periférico de doadores saudáveis;
- Investigar a citotoxicidade dos derivados tiazotftalimidicos e galactosídeos frente a linhagens neoplásicas.
- Avaliar o mecanismo de ação dos derivados tiazotftalimidicos e galactosídeos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os pesquisadores consideram como risco o fato da coleta de sangue poder ser desconfortável, deixar o braço um pouco dolorido e apresentar um pequeno hematoma, que é uma área amolecida no local da coleta. Antes de iniciar a coleta, a área será limpa com álcool, e todo material usado na coleta será descartável. A coleta será feita por profissionais treinados e competentes e orientados para reduzir os riscos. Caso ocorra a formação do hematoma, será aplicada compressa gelada para reduzir a vermelhidão.

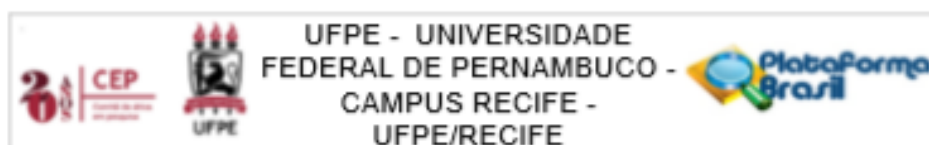
Benefícios:

Não estão previstos benefícios diretos para os voluntários.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa tem o objetivo de testar uma nova substância com potencial para tratamento do câncer, utilizando as células tumorais de culturas obtidas em banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ) e acondicionadas no Banco de células Tumorais do LINAT/UFPE e células normais do sangue periférico dos voluntários. Para tanto será realizada uma coleta de 10 mL de sangue, de uma veia na região do braço, utilizando seringas estéreis e descartáveis. Após a coleta do material serão isoladas as células do sangue (células saudáveis) para serem cultivadas in vitro (modelo de cultura de células) e submetidas a testes de toxicidade com os fármacos em variadas concentrações. Serão recrutados para esse estudo 15 voluntários adultos (maior de 18 anos). Serão incluídos na pesquisa indivíduos saudáveis maiores de idade e de ambos os sexos. Serão excluídos indivíduos que fazem utilização de medicamentos de uso crônico, que ingeriram bebidas alcoólicas nas últimas 72 horas e que apresentam doenças de cunho inflamatório, podendo estes interferir no resultado da pesquisa. Todas as despesas serão custeadas pela pesquisadora responsável pelo projeto de pesquisa.

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



Continuação do Parecer: 3.651.986

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos foram anexados em conformidade com as exigências do CEP.

Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de inadequações:

Não foram encontrados óbices éticos.

Considerações Finais a critério do CEP:

As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (Item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

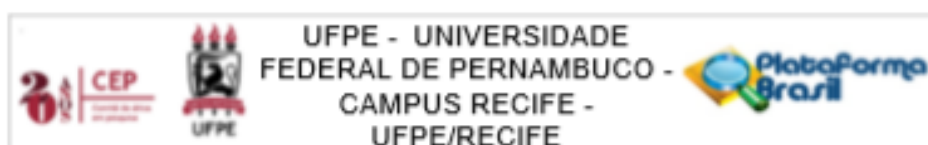
Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (Item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
----------------	---------	----------	-------	----------

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



Continuação do Parecer: 3.651.966

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1407054.pdf	16/10/2019 11:08:38		Aceito
Outros	cartacorrecão.docx	16/10/2019 11:07:53	Flaviana Alves dos Santos	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoFlavianaSubmetido.doc	16/10/2019 11:07:23	Flaviana Alves dos Santos	Aceito
Outros	declaraçãovinculo.pdf	22/08/2019 12:03:53	Flaviana Alves dos Santos	Aceito
Outros	cartanova.pdf	22/08/2019 11:11:24	Flaviana Alves dos Santos	Aceito
Outros	lattesMarina.pdf	19/08/2019 18:22:42	Flaviana Alves dos Santos	Aceito
Outros	TermoConfidencialidade.docx	19/08/2019 18:22:05	Flaviana Alves dos Santos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEMaiores18.doc	19/08/2019 18:20:12	Flaviana Alves dos Santos	Aceito
Folha de Rosto	folhaassinada.pdf	02/08/2019 11:23:24	Flaviana Alves dos Santos	Aceito
Outros	lattesivan.pdf	01/08/2019 23:57:34	Flaviana Alves dos Santos	Aceito
Outros	lattesmoacyr.pdf	01/08/2019 23:56:58	Flaviana Alves dos Santos	Aceito
Outros	Lattescompleto.pdf	01/08/2019 23:56:29	Flaviana Alves dos Santos	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 21 de Outubro de 2019

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador(a))

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **Cep:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81) 2126-8568 **E-mail:** cepcos@ufpe.br

ANEXO 3 - PARECER COMITE ETICA ANIMAL



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA
 Av. Salgado Filho, S/N – CEP: 59072-970 – Natal / RN
 Fone: (84) 9229-6491 / e-mail: ceua@reitoria.ufrn.br

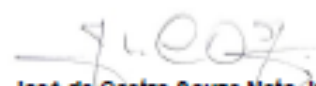
**CERTIFICADO**

Natal (RN), 27 de março de 2018.

Certificamos que a proposta intitulada "Estudos toxicológicos para avaliação de novos compostos", protocolo 008/2018, CERTIFICADO nº 087.008/2018, sob a responsabilidade de **Teima Maria Araújo Moura Lemos** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n.º 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.º 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – CEUA/UFRN.

Vigência do Projeto	Abril 2022
RELATÓRIOS	MAIO 2020 MAIO 2022
Espécie/Linhagem	<i>Mus musculus</i> Swiss
Número de Animais	1548
Sexo/Idade/Peso	437 Machos / 6 - 8 semanas / 30 g 336 Machos / 8 - 10 semanas / 35 g 439 Fêmeas / 6 - 8 semanas / 30 g 336 Fêmeas / 8 - 10 semanas / 35 g
Origem	Biotério do Centro de Ciências da Saúde - UFRN
Manutenção	Biotério do Centro de Ciências da Saúde - UFRN

Informamos ainda que, segundo o Cap. 2, Art. 13, do Regimento Interno desta CEUA, é função do professor/pesquisador responsável pelo projeto a elaboração de relatório de acompanhamento que deverá ser entregue tão logo a pesquisa seja concluída. O descumprimento desta norma poderá inviabilizar a submissão de projetos futuros.


 José de Castro Souza Neto Júnior
 Coordenador da CEUA-UFRN