

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

MARDONNY BRUNO DE OLIVEIRA CHAGAS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICÂNCER E MECANISMO DE AÇÃO DE
NOVOS AGENTES ACRIDÍNICOS**

Recife
2016

MARDONNY BRUNO DE OLIVEIRA CHAGAS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICÂNCER E MECANISMO DE AÇÃO DE
NOVOS AGENTES ACRIDÍNICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Área de Concentração Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maira Galdino da Rocha Pitta

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

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

Chagas, Mardonny Bruno de Oliveira

Avaliação da atividade anticâncer e mecanismo de ação de novos agentes acridínicos / Mardonny Bruno de Oliveira Chagas. – Recife: O Autor, 2016.

128 f.: il.

Orientadores: Maira Galdino da Rocha Pitta, Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, 2016.

Inclui referências e anexos

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

616.994

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-211

MARDONNY BRUNO DE OLIVEIRA CHAGAS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICÂNCER E MECANISMO DE AÇÃO DE
NOVOS AGENTES ACRIDÍNICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Área de Concentração Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Aprovado em: 28/01/2016

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta / UFPE

Dra. Marina Galdino da Rocha Pitta / NUPIT-UFPE

Dr. Thiago Ubiratan Lins e Lins / NUPIT-UFPE

Profa. Dra. Valéria Pereira Hernandez /
Fundação Oswaldo Cruz

Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva / UFPE

DEDICATÓRIA

*Às mulheres da minha vida,
Marli, Mirella e Izabela.
e ao meu pequeno príncipe João Lucas.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus** e a **Nossa Senhora** pela dádiva da vida, pelas pessoas que colocou em meu caminho, pela possibilidade de realizar este trabalho, e por me auxiliar nos momentos de dificuldade e aflição.

À **minha família**, em especial a minha mãe **Marli** e minha irmã **Mirella**, por todo amor, compreensão e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida. Amo vocês.

À minha esposa **Izabela** pelo companherismo, apoio constante e incentivo nessa jornada. Muito obrigado pelo apoio com paciência e compreensão nos meses que precederam a etapa final deste trabalho.

Ao meu filhinho **João Lucas** por me fazer sorrir sempre e renovar minha esperança nos momentos de desânimo.

À Profa. Dra. **Maira Galdino da Rocha Pitta** pela orientação neste trabalho, pela confiança, amizade e oportunidades. Muito obrigado por seu acolhimento, incentivo, disponibilidade a qualquer hora e, principalmente, ensinamentos acadêmicos. Profa. Maira a senhora expandiu os meus limites.

Ao Prof. Dr. **Moacyr de Jesus Barreto de Melo Rêgo** pela orientação neste trabalho, pela confiança, amizade e oportunidades. Muito obrigado por toda sua dedicação e contribuição nesta jornada. Obrigado pelos ensinamentos acadêmicos, pelo amor à pesquisa e à docência. Espero um dia ser capaz de retribuir tudo o que fez por mim.

Às Profa. **Dra. Michelly Cristiny Pereira** e **Dra. Marina Galdino da Rocha Pitta** por fazer parte desta parceria, pelo aprendizado e pela paciência. Muito obrigado Mi e Mari.

Ao **Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta** e a **Profa. Suely Lins Galdino** (*in memoriam*) o meu obrigado pelos conselhos e valores transmitidos. Nós sabemos que tudo isso é apoiado em um alicerce edificado por vocês.

À Profa. **Dra. Maria do Carmo Alves de Lima** e aos seus alunos pela contribuição neste trabalho sempre nos auxiliando em seu laboratório.

Ao meu companheiro de laboratório **Thiago Lins** pela convivência, ensinamentos e acolhimento na minha chegada ao laboratório.

Aos meus companheiros da tumoral, desde os primórdios, **Flaviana Alves, Karla Marques Michael Leal e Edso Henrique**. Muito obrigado pela ajuda de vocês.

À minhas companheiras **Valécia Costa, Wanessa Sena e Thuanny Maryna** sem o apoio de vocês não haveria este trabalho. Muito obrigado.

A todos os meus colegas de laboratório do **LINAT** pela convivência, momentos de descontração, conselhos e cordialidade.

A **Paulo Germano**, secretário do Programa de Pós-graduação em Inovação terapêutica por ser sempre prestativo e atencioso. Obrigado Paulo.

À **Universidade Federal de Pernambuco** pela oportunidade oferecida.

À **Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco**, pela concessão da bolsa de pós-graduação.

A todos aqueles não mencionados que, de alguma maneira, contribuíram na realização deste trabalho.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas, Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Martin Luther King

RESUMO

O câncer está entre as principais causas de morte no mundo e apesar dos avanços na área, os tratamentos disponíveis ainda estão associados à baixa seletividade, efeitos colaterais e resistência do tumor a quimioterapia. Por isso, faz-se necessária a busca por fármacos antineoplásicos mais eficazes e menos tóxicos. As acridinas e seus análogos estruturais são moléculas que possuem propriedade intercalante com os pares de bases do DNA constituindo, assim, eficazes e promissores agentes anticâncer. Neste sentido, foram avaliados sete agentes tiazacridínicos, LPSF/AA29, -35, -36, -39, -40, -41, -48 e um imidazacridínico, LPSF/AC05 frente à linhagens tumorais de origem diversa. Os resultados revelaram que os agentes apresentaram valores de IC_{50} entre 0,25 a 97,11 μ M. Todos os agentes foram submetidos ao ensaio de citotoxicidade com PBMCs e apresentaram valores de $IC_{50} > 100 \mu$ M. O composto LPSF/AC05 demonstrou-se menos tóxico que o fármaco de referência, doxorrubicina, em células não tumorais de mama. O mecanismo da indução de morte e os efeitos sobre o ciclo celular após tratamento com os compostos também foram avaliados. A análise através da citometria de fluxo revelou que os compostos LPSF/AA29, LPSF/AA36 e LPSF/AC05 aumentaram significativamente a porcentagem de células apoptóticas. Ademais, LPSF/AA29 e LPSF/AA36 induziram um arrasto para a fase G2/M do ciclo celular, enquanto, LPSF/AC05 induziu arrasto nas fases G0/G1 e G2/M em linhagens de leucemias/linfomas e mama, respectivamente. LPSF/AC05 ainda mostrou-se inibidor da atividade da enzima topoisomerase II e da migração celular em MCF-7. Estes dados reforçam o potencial citotóxico das acridinas e seus análogos e indicam que estes compostos possuem potencial para contribuir no desenvolvimento ou servir de base para novos agentes contra o câncer.

Palavras-chave: Acridina. Apoptose. Câncer. Ciclo celular.

ABSTRACT

Cancer is among the leading causes of death worldwide and despite advances in the area, the available treatments are still associated with low selectivity, side effects and resistance to chemotherapy. Therefore, it is necessary search for more effective and less toxic anticancer drugs. The acridines and analogues are molecules that have intercalation property with DNA base pairs thus constituting effective and promising anticancer agents. In this direction, we evaluated seven thiazacridine compounds, LPSF/AA29, -35, -36, -39, -40, -41, -48 and one imidazacridine, LPSF/AC05 against tumor cell lines of different origin. Results showed that the compounds showed IC_{50} values 0.25 to 97.10 μ M. All agents were subjected to the toxicity assay with PBMC showed values $IC_{50} >100$ μ M. The compound LPSF/AC05 demonstrated less toxicity than the reference drug doxorubicin in breast non-tumor cells. The death induction mechanism and effects on the cell cycle after treatment with compounds were also evaluated. The analysis by flow cytometry revealed that the compounds LPSF/AA29, LPSF/AA36 and LPSF/AC05 significantly increased the percentage of apoptotic cells. Moreover LPSF/AA29 and LPSF/AA36 induced arrest for the G2/M phase of the cell cycle, while LPSF/AC05 induced arrest in the G0/G1 and G2/M phase in a cell lines leukemia/lymphomas and breast, respectively. LPSF/AC05 also proved inhibitor of topoisomerase II enzyme activity and cell migration in MCF-7. These data reinforce the cytotoxic potential of acridines and analogues indicating that these compounds have potential to contribute in the development or provide the basis for new agents against cancer.

Keywords: Acridine. Apoptosis. Cancer. Cell cycle.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01. Contribuição relativa de fatores de risco e sua incidência em câncer (ACS, 2014).....	27
Figura 02. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2016 e 2017 por sexo, exceto pele não melanoma (INCA, 2014).....	29
Figura 03. Principais etapas da carcinogênese: Estágios de iniciação, promoção e progressão (INCA, 2012)	31
Figura 04. Na metástase, as células cancerosas invadem outras camadas celulares do órgão, ganham a corrente sanguínea ou linfática e têm a capacidade de se disseminar para outras partes do corpo (INCA, 2012)	32
Figura 05. <i>Hallmarks</i> do câncer - Principais características apresentadas por células transformadas (Hanahan e Weinberg, 2011)	33
Figura 06. Os estágios do ciclo celular e a regulação CDK/ciclina (Vermeulen et al., 2003).....	35
Figura 07. Esquema simplificado das vias extrínseca e intrínseca da apoptose (Wong, 2011).....	38
Figura 08. Núcleos da tiazolidina e imidazolidina (Autor, 2015)	43
Figura 09. Estrutura das moléculas da (a) acridina e seus derivados (b) mepacrina e (c) proflavina (Galdino-Pitta et al., 2013).....	44
Figura 10 . Estrutura química da amsacrina (<i>m</i> -Amsa) (Belmont et al., 2007).....	45
Figura 11. Estrutura química do derivado acridínico DACA (Belmont et al., 2007).....	46
Figura 12. Estrutura química do derivado acridínico inibidor de telomerase BRACO-19 (Belmont et al., 2007)	47
Figura 13. Estrutura acridínica dimérica (Galdino-Pitta et al., 2013)	47
Figura 14. Estrutura química da Arnoamina A (R=H) e Arnoamina B (R=Me) (Imperatore et al., 2014)	48

ILUSTRAÇÕES DO ARTIGO 01

Figure 01 - Synthesis diagram of the thiazacridine 7 b-g compounds	64
Figure 02 - Synthesis diagram of thiazacridine derivative LPSF/AA29 - 7a.....	65
Figure 03 - Hydrogen identification for NMR ^1H interpretation: thiazacridine nucleus (a-e), radicals attached to the 5 position of the thiazolidine nucleus (f-k)	65
Figure 04 - Analysis of the potential induction of apoptosis, LPSF/AA29.....	67
Figure 05 - (A) Analysis of the potential induction of apoptosis, LPSF/AA36	68
Figure 05 - (B) The effect of LPSF/AA36 and amsacrine on the cell cycle	68
Figure 06 . The effect of LPSF/AA29 and amsacrine on the cell cycle	69

ILUSTRAÇÕES DO ARTIGO 02

Figure 01 - Chemical structure of 5-acridin-9-ylmethylidene-2-thioxoimidazolidin-4-one (LPSF/AC05)	84
Figure 02 - Effects of LPSF/AC05 in the potential induction of apoptosis.....	85
Figure 03 - Effects of LPSF/AC05 on cell cycle progression	86
Figure 04 - Semi quantitative analysis of LPSF/AC05 effects on pOHT-1 DNA plasmid relaxation by human topoisomerase II.....	87

ILUSTRAÇÕES DO ARTIGO 03

Figure 01 . Chemical structure of 5-acridin-9-ylmethylidene-2-thioxoimidazolidin-4-one (LPSF/AC05).....	101
Figure 02 . Effects of LPSF/AC05 on apoptotic cells rate after 48 hours of treatment in MCF-7 (A), MDA-MB-231 (B) and MCF-10A (C) cell lines	102

Figure 03. Effects of LPSF/AC05 on cell cycle progression of MCF-7 (A), MDA-MB-231 (B) and MCF-10A (C)	103
---	-----

Figure 04. Effects of LPSF/AC05 on cell migration after 48 hours of treatment in MCF-7 cells.....	104
--	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Modalidades distintas de morte celular de acordo com as novas recomendações do Comitê de Nomenclatura de Morte Celular (NCCD)	40
---	----

Tabela 02. Novos agentes tiazacridínicos e imidazacridínicos potencialmente anticâncer.....	52
--	----

Tabela 03. Linhagens de células neoplásicas e normal de mama.....	55
--	----

TABELA DO ARTIGO 01

Table 01. Cytotoxicity of new derivatives on various human tumor cell lines and non-tumor cells (PBMCs).- IC ₅₀ (μM)	66
--	----

TABELA DO ARTIGO 02

Table 01. IC ₅₀ values (μM) and selectivity index (SI) of LPSF/AC05 compound in PBMC, leukemia and lymphoma cells	83
---	----

TABELA DO ARTIGO 03

Table 01. IC ₅₀ values (μM) of LPSF/AC05 in PBMC, non-tumor breast cell MCF-10A and breast tumor cells	100
--	-----

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

¹HNMR - Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance).

AIF - Fator de indução de apoptose.

AMSA - Amsacrina.

Apo2L -Ligante do receptor de morte 2.

Apo3L - Ligante do receptor de morte 3.

APAF-1 - Fator de ativação de protease apoptótica (Apoptotic Protease Activating Factor 1).

Bad - Agonista de morte celular associado a Bcl-2.

Bak - Antagonista homólogo à Bcl-2.

Bax - Proteína associada ao domínio X de Bcl-2.

Bcl-2 - Célula B CLL/Linfoma 2 (B-cell lymphoma protein-2 family).

Bcl-w - Membro da família de proteínas Bcl-2.

Bcl-xl - Célula B CLL/Linfoma extra grande (B-cell lymphoma extra-large).

Bid - Agonista de morte associado ao domínio BH3.

BrdU -bromodesoxiuridina

CDK - Quinase dependente de ciclina

CKI - Inibidor de quinase dependente de ciclina.

CO₂ - Gás carbônico.

DMSO - Dimetilsulfóxico.

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DR3 - receptor de morte 3.

DR4 - receptor de morte 4.

DR5 - receptor de morte 5.

EGF – Fator de crescimento tumoral.

FADD - Domínio de morte associado à via Fas (Fas-Associated via Death Domain).

Fas – Membro “6” da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral.

FasL - Ligante de Faz.

FL1 - Intensidade de fluorescência.

FL2 - Intensidade de fluorescência..

FSC - Dispersão frontal da luz (Forward scatter)

G0 - Intervalo celular 0

G1 - Intervalo celular 1

G2 - Intervalo celular 2

IC₅₀ - Concentração inibitória de 50%.

INCA – Instituto Nacional do Câncer.

IARC - Agência Internacional de Pesquisa em Câncer.

IAPs - Proteínas inibidoras da apoptose.

KBr - Brometo de potássio.

IR -Infra vermelho.

LPSF - Laboratório de Síntese e Planejamento de Fármacos.

M - Mitose.

Mcl-1 - Proteína de indução à diferenciação mieloide.

MPF - Fator promotor de mitose

MS - Espectrometria de massa

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.

Noxa - Proteína 1 induzida por forbol-12-miristato-13-acetato.

Omi/HtrA2 - Protease de serina localizado na mitocôndria.

OMS - Organização Mundial de Saúde.

p - Significância estatística.

p15 - Proteína de 15 kDa.

p16 - Proteína de 16 kDa.

p18 - Proteína de 18 kDa.

p19 - Proteína de 19 kDa.

p21 - Proteína de 21 kDa.

p27 - Proteína de 27 kDa.

p53 - Proteína de 53 kDa.

p57 - Proteína de 57 kDa.

PBMC - Células mononucleares do sangue periférico.

PBS - Tampão Salino Fosfato.

PI - Iodeto de Propídeo.

PPAR - Receptor Ativado por proliferadores de peroxissomos.

Rf. Fator de retenção.

RNA - Ácido ribonucleico.

ROS - Espécies reativas de oxigênio.

rTNF - Receptor do fator de necrose tumoral.

S - Fase S do ciclo celular (síntese de DNA).

SSC - Dispersão lateral da luz (Side scatter).

SMAC/DIABLO - Segundo ativador de caspases derivado da mitocôndria.

Topo - Topoisomerase.

TNF - Fator de Necrose tumoral.

TNFR1 - Receptor 1 do fator de necrose tumoral.

TZD – Tiazolidinas.

UV - Ultravioleta.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS	24
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	26
3.1 Câncer: aspectos gerais	27
3.2 Epidemiologia do câncer no Brasil e no Mundo	28
3.3 Princípios básicos da oncogênese	30
3.4 O ciclo celular	33
3.5 Apoptose e seus mecanismos.....	36
3.5.1 Vias bioquímicas de indução de apoptose	37
3.5.2 Características da apoptose e outros tipos de morte celular	39
3.6 Estratégias de tratamento do câncer	41
3.7 Tiazolidinas e imidazolidinas.....	42
3.8. As acridinas e seus derivados	43
3.8.1 Principais classes dos compostos acridínicos	44
3.8.2 Novos derivados acridínicos com atividade anticâncer.....	48
4. METODOLOGIA.....	51
4.1 Obtenção dos derivados tiazacridínicos e acridínicos	52
4.2 Linhagens de células neoplásicas	55
4.3 Cultura e manutenção das linhagens celulares	55
4.4 Obtenção, isolamento e manutenção das células mononucleadas do sangue periférico (PBMCs) em cultura	56

4.5 Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> em células neoplásicas e normais	56
4.6 Avaliação do potencial de indução de morte por apoptose.....	57
4.7 Efeito dos novos agentes acridínicos sobre o ciclo celular	58
4.8 Ensaio de inibição da atividade da enzima topoisomerase II	58
4.9 Avaliação da inibição de migração celular utilizando a linhagem de câncer de mama MCF-7	58
4.10 Análise estatística dos resultados	59
5. RESULTADOS	60
5.1 Artigo 01.	61
5.2 Artigo02	73
5.3 Artigo 03	88
6. DISCUSSÃO	105
7. CONCLUSÕES.....	110
8. PERSPECTIVAS.....	113
REFERÊNCIAS	115
ANEXOS	127

Os termos câncer, neoplasia ou tumor maligno são análogos e podem ser utilizados para denominar um conjunto de doenças que possuem em comum o crescimento descontrolado e desordenado de células que apresentam a capacidade de invadir tecidos e espalhar-se para outras regiões do corpo formando colônias secundárias (Almeida et al., 2005). O surgimento destas células instáveis está relacionado a fatores genéticos e/ou agentes externos.

Em 2012, o câncer foi responsável por 8,2 milhões de mortes ocorridas no mundo, o que representou 15% do total de todas as mortes. Estima-se que em 2030 o número de novos casos anuais seja da ordem de 23 milhões. No Brasil, as estimativas para o ano de 2014 e válidas também para o ano de 2015, apontam a ocorrência de aproximadamente 570 mil novos casos de câncer (INCA, 2014).

Atualmente, são exploradas muitas formas de tratamento do câncer, dentre elas, cirurgias, radioterapia, imunoterapia e, principalmente, a quimioterapia. Este último método é utilizado por cerca de 60-70 % dos pacientes, porém, os fármacos disponíveis atuam tanto em células neoplásicas como em células normais levando a um grande número de efeitos colaterais. Ademais, mecanismos de resistência às drogas atuais estão se desenvolvendo com rapidez (Chen et. al., 2012; Regulska et al., 2012).

Dessa forma, o estudo voltado para o desenvolvimento e aplicação de novos agentes anticâncer tem sido cada vez mais necessário. Uma das estratégias utilizadas por muitos grupos de pesquisa na busca por novos fármacos é a modificação molecular de um composto matriz que possui atividades biológicas conhecidas obtendo-se novos compostos homólogos. Em relação à atividade anticâncer, muitos estudos sugerem que as acridinas têm suas propriedades alteradas pelo substituinte e a posição que ocupa (Galdino-Pitta et al., 2013).

As acridinas constituem uma classe de compostos orgânicos que apresentam em sua estrutura química três anéis aromáticos condensados, com um átomo de nitrogênio no anel central. Estes compostos heterocíclicos são amplamente utilizados na produção de corantes e na síntese de diversas substâncias com atividades biológicas, como antimicrobiana, antiparasitária e antitumoral (Eiter et al., 2009; Jones et al., 2009; Chen et al., 2015). As acridinas possuem propriedade intercalante com os pares de bases do DNA, por isso, estas moléculas e seus análogos estruturais constituem eficazes e promissores agentes anticâncer (Almeida et al., 2005; Ghosh et al., 2010).

Neste contexto, com o objetivo de descobrir e desenvolver novos agentes anticâncer mais efetivos e menos tóxicos, do que os agentes atuais, nos propomos a estudar novos

derivados acridínicos com potencial atividade anticâncer, bem como, contribuir para um melhor entendimento de seu mecanismo de ação. Para isso, uma série de novos derivados tiazacridínicos e imidazacridínico foram submetidos a ensaios de citotoxicidade *in vitro* frente à linhagens de células não tumorais e neoplásicas de diferentes tipos de tecido, a fim de avaliar suas propriedades citotóxica e seletiva. Adicionalmente, foi investigado o papel destes novos compostos no ciclo celular, na indução da morte celular por apoptose, na inibição da atividade da enzima topoisomerase II e seu papel na migração celular.

2.1. Geral

Avaliar a atividade anticâncer de novos derivados acridínicos, bem como, contribuir para um melhor entendimento de seus mecanismos de ação.

2.2. Específicos

- ✓ Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* dos derivados acridínicos frente a diferentes linhagens de células neoplásicas;
- ✓ Avaliar a toxicidade *in vitro* dos derivados acridínicos frente a linhagens não tumorais;
- ✓ Avaliar o papel dos derivados acridínicos na indução de morte celular;
- ✓ Investigar o efeito dos derivados acridínicos no ciclo celular;
- ✓ Avaliar a potencial atividade inibitória dos derivados acridínicos sobre as topoisomerasas II;
- ✓ Avaliar a capacidade de inibição da migração celular após tratamento com derivados acridínicos.

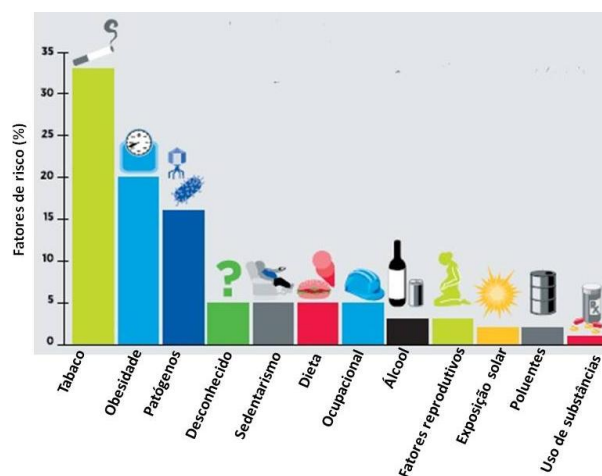
3.1 Câncer: aspectos gerais

Câncer, neoplasia ou tumor maligno são termos análogos utilizados para denominar um conjunto de mais de 200 doenças diferentes com multiplicidade de causas e história natural diversa. Esta classe de doenças tem em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (Almeida et al., 2005; OMS, 2014).

A proliferação desordenada das células é resultante de uma acumulação progressiva de alterações genéticas, mutações, promovida na maioria das vezes a partir da ativação de vias bioquímicas que permitem ao mesmo tempo a expressão de oncogenes e o silenciamento de genes supressores de tumor (Hanahan & Weinberg, 2000).

Os fatores que conduzem as mutações são variados e, em geral, podem ser classificados em três grupos: fatores de risco ambientais ou externos, pré-disposição genética e a combinação de ambos (ACS, 2014). A maioria dos casos de câncer está relacionada ao meio ambiente, no qual encontramos um grande número de fatores de risco. Entende-se por ambiente o meio em geral (água, terra e ar), o ambiente ocupacional (serviços, comércio, indústrias e afins), o ambiente de consumo (dieta, medicamentos), o ambiente social e cultural (tabagismo, álcool, hábitos sexuais) (Figura 01). A poluição ambiental provocada pelo próprio homem, os hábitos e estilos de vida adotados pelas pessoas podem determinar diferentes tipos de câncer (INCA, 2014).

Figura 01. Contribuição relativa de fatores de risco e sua incidência em câncer.



Fonte: Adaptado de ACS, 2014.

Os casos de cânceres que se devem a fatores exclusivamente hereditários, familiares e étnicos são raros, apesar do fator genético influenciar no papel da oncogênese. As causas ambientais e hereditárias também podem atuar em associação, como mutações genéticas relacionadas à capacidade de determinado organismo em tolerar ou não as várias agressões externas atuais (INCA, 2014).

As células tumorais podem adquirir a capacidade de migrar para outras regiões do organismo e ocasionar metástases, onde massas tumorais podem gerar células pioneiras que se locomovem para fora do nicho primário, invadem tecidos adjacentes, e percorrem para locais distantes onde podem obter sucesso na criação de novas colônias. Estes assentamentos celulares distantes do tumor primário, as metástases, representam mais de 90 % das mortes causadas por câncer em humanos (Weigelt et al., 2005).

3.2 Epidemiologia do câncer no Brasil e no Mundo

O número de casos de câncer tem aumentado de maneira considerável em todo o mundo, principalmente a partir do século passado, configurando-se, na atualidade, como um dos mais importantes problemas de saúde pública mundial (Guerra et al., 2005).


Segundo o Relatório Mundial de Câncer elaborado pela Agência Internacional para pesquisa sobre o Câncer (IARC) à pedido da Organização Mundial de Saúde (OMS) houveram 14,1 milhões de casos novos de câncer e mais de 8 milhões de pessoas morreram no mundo vítimas desta doença em 2012. Este número representa cerca de 20% de todos os óbitos registrados naquele ano pelas agências de saúde mundiais (OMS, 2014). Destes, os tipos mais incidentes foram o câncer de pulmão, fígado, estômago, cólon e mama. Ainda de acordo com o relatório, o uso do tabaco é o fator de risco mais importante para o câncer causando cerca de 20% das mortes por câncer no mundo e cerca de 70% das mortes globais de câncer de pulmão. Para o ano de 2030, estima-se que o número de novos casos globais ultrapasse a faixa de 23 milhões, seguido de 13 milhões de mortes por câncer (OMS, 2014).

No Brasil, as mudanças do perfil demográfico decorrentes do processo de urbanização populacional, da industrialização e dos avanços tecnológicos, unem-se aos novos estilos de vida e a exposição, ainda mais intensa, a fatores de risco próprios do mundo contemporâneo contribuem para o surgimento de novos casos de câncer em nosso país (INCA, 2014). De modo semelhante aos dados globais, o câncer ocupa a segunda posição das causas de morte também no Brasil, ficando atrás somente das doenças cardiovasculares. O número de casos que foram estimados para 2016 e que também são válidos para 2017 aponta para a ocorrência de mais de 590 mil novos casos no território nacional (Figura 02) (INCA, 2015). Nos


períodos de 2013 e 2014, somente no serviço público de saúde, foram registrados mais de 110 mil óbitos por câncer, cerca de 1,5 milhões de internações oncológicas e gastos mais de 2 bilhões de reais em serviços hospitalares (Brasil, 2015).

Figura 02. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2016 e 2017 por sexo, exceto pele não melanoma.

Localização Primária	Casos Novos	%
Próstata	61.200	28,6%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%
Cólon e Reto	16.660	7,8%
Estômago	12.920	6,0%
Cavidade Oral	11.140	5,2%
Esôfago	7.950	3,7%
Bexiga	7.200	3,4%
Laringe	6.360	3,0%
Leucemias	5.540	2,6%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%
Linfoma não Hodgkin	5.210	2,4%
Pele Melanoma	3.000	1,4%
Linfoma de Hodgkin	1.460	0,7%
Glândula Tireoide	1.090	0,5%
Todas as Neoplasias sem pele*	214.350	
Todas as Neoplasias	295.200	



Localização Primária	Casos Novos	%
Mama feminina	57.960	28,1%
Cólon e Reto	17.620	8,6%
Colo do útero	16.340	7,9%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Estômago	7.600	3,7%
Corpo do útero	6.950	3,4%
Ovário	6.150	3,0%
Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%
Leucemias	4.530	2,2%
Cavidade Oral	4.350	2,1%
Esôfago	2.860	1,4%
Pele Melanoma	2.670	1,3%
Bexiga	2.470	1,2%
Linfoma de Hodgkin	1.010	0,5%
Laringe	990	0,5%
Todas as Neoplasias sem pele*	205.960	
Todas as Neoplasias	300.870	



Fonte: INCA, 2015.

Neste sentido, a transição demográfica e a exposição cada vez maior a fatores de risco, somadas a terapias antineoplásicas de alto custo, que nem sempre são eficazes, revelam a intensidade do problema. Por isso, compreender a sua origem como estratégia de prevenção e busca por novas terapias, é de fundamental importância para a manutenção da saúde e qualidade de vida das pessoas de forma geral.

3.3 Princípios básicos da oncogênese

Como descrito anteriormente, câncer é um termo genérico utilizado para definir um amplo grupo de doenças diferentes, que apresentam algumas características semelhantes. Entre estas características podemos destacar o crescimento descontrolado de células transformadas a partir de alterações essenciais na fisiologia celular, provocadas por uma instabilidade genética, que pode contribuir para o desenvolvimento de neoplasias (Almeida et al., 2005; Dick, 2008).

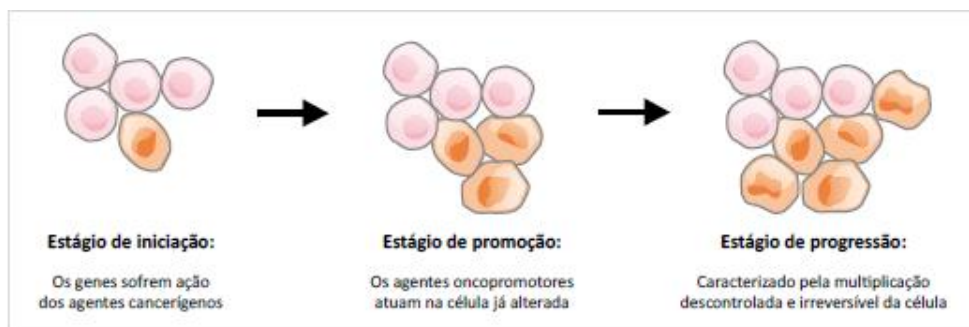
O termo neoplasia é aplicado à proliferação anormal de tecidos, que desvia parcial ou totalmente do controle do organismo e tende à autonomia e à perpetuação (INCA, 2012). Os tumores são neoplasias sólidas que podem ser classificados como benignos, isto é, possuem crescimento de forma organizada, lenta e de limites bem nítidos, permanecendo localizados; ou malignos, que apresentam um maior grau de autonomia e são capazes de invadir tecidos vizinhos e provocar metástases (Almeida et al., 2005; INCA, 2012). A transformação de uma célula saudável em uma célula tumoral é geralmente um processo lento e que ocorre através de três etapas principais – iniciação, promoção e progressão – que, em conjunto, são definidas como oncogênese, tumorigênese ou carcinogênese (Figura 03) (Chen e Kong, 2005; INCA, 2012).

Na etapa de iniciação, as células, na maioria das vezes, sofrem o efeito de um agente carcinogênico (agente oncoiniciador) que podem ser de origem física, química ou biológica (OMS, 2014). As fontes radiantes, como a ultravioleta (UV) e os raios X, são as principais representantes dos agentes físicos iniciadores. Estas fontes estão associadas a um grande número de alterações no DNA que permanecem após a divisão celular e podem afetar oncogenes ou genes supressores de tumor (McColl et al., 2015). Muitas substâncias químicas possuem a capacidade de condicionar as células normais a um estado neoplásico (Loeb e Harris, 2008). Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, por exemplo, representam as substâncias com maior caráter cancerígeno (Nisbet e LaGoy, 1992). Existem substâncias que possuem ação iniciadora direta através de lesão celular e outras atuam de forma indireta a partir da promoção da proliferação celular desregulada (Kuraishy et al., 2011). De forma

semelhante, agentes carcinogênicos biológicos como bactérias, parasitas e muitos tipos de vírus também estão relacionados ao aparecimento de células tumorais (Meurman, 2010). Os vírus papiloma vírus humano (HPV) e o Epstein barr, por exemplo, possuem um ciclo de replicação específica que pode levar as células hospedeiras a entrarem em proliferação de forma forçada e descontrolada, o que poderia desta forma induzir ao câncer (Pattle e Farrell, 2006; Stark et al., 2008). Todavia, uma única alteração no DNA, seja ela física, química ou biológica não é suficiente para que uma determinada célula torne-se maligna e agressiva ao organismo (Garraway e Lander, 2013).

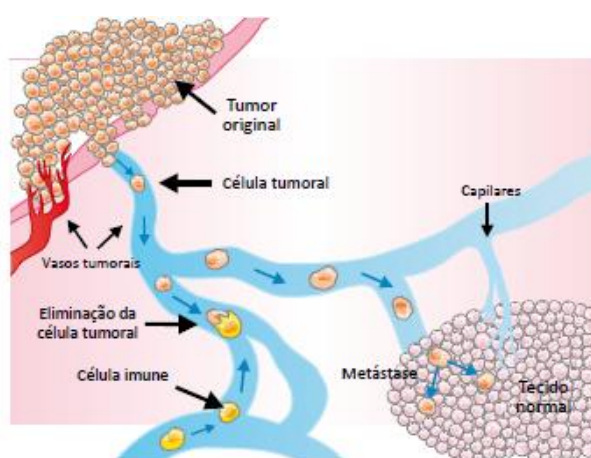
O estágio de promoção representa a etapa de crescimento tissular com a formação do tumor, as células transformadas sofrem os efeitos de agentes promotores ou oncopromotores. A célula iniciada torna-se maligna de forma lenta e gradativa, nesse período, é necessário um contato contínuo com o agente oncopromotor. A forma como estes agentes atuam é variada, pois depende do tipo de agente, no entanto, podemos destacar como ações características gerais, estímulo à síntese de DNA, aumento do número de cópias de genes em particular e alterações na comunicação intercelular; (Groenwald, 1998; Martín de Civetta e Civetta, 2011). Hormônios como o estrógeno e a prolactina, a insulina, peptídeos conhecidos como fatores de crescimento, como por exemplo, o fator de crescimento epidermal (EGF), o fator de crescimento neuronal (NGF), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), substâncias como a nicotina e o álcool podem atuar como agentes oncopromotores (Groenwald, 1998; Martín de Civetta e Civetta, 2011). A inibição do contato entre os promotores tumorais e as células iniciadas, na maioria das vezes, suspende o processo neste estágio, por isso a ação dos promotores frente as células iniciadas constituem um processo dose-dependente e reversível (Groenwald, 1998; Almeida et al., 2005).

Figura 03. Principais etapas da carcinogênese: Estágios de iniciação, promoção e progressão.



A capacidade adquirida pelas células neoplásicas de invadir os tecidos adjacentes e migrar para outros órgãos é uma característica do processo de progressão tumoral. Este período é acompanhado da desdiferenciação celular, aquisição de resistência a agentes quimioterápicos e expressão de antígenos tumorais (Figura 04). (Groenwald, 1998; Martín de Civetta e Civetta, 2011).

Figura 04. Na metástase, as células cancerosas invadem outras camadas celulares do órgão, ganham a corrente sanguínea ou linfática e têm a capacidade de se disseminar para outras partes do corpo.



Fonte: INCA, 2012.

Em 2000 Hanahan e Weinberg propuseram um conjunto de seis características biológicas necessárias para transformação das células normais em células tumorais e importantes no desenvolvimento e progressão do câncer, são elas: sinalização proliferativa, fuga dos supressores tumorais, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, estímulo a angiogênese e capacidade de invadir tecidos e promover metástases. Estas características são compartilhadas pela maioria das neoplasias humanas e dependem da manutenção de quatro habilidades: evasão do sistema imune, instabilidade genômica, manutenção da inflamação e desregulação do metabolismo energético, propostas no início desta década novamente por Hanahan e Weinberg (2011) (Figura 05). Apesar de estabelecer características e habilidades próprias de células transformadas, estas crescem em um ambiente formado por células normais, não transformadas, por isso, é preciso conhecer o microambiente tumoral como um todo para realmente tentar compreender os complexos processos da oncogênese.

O processo de transformação, como já mencionado, inicia-se com a ação de agentes carcinogênicos que podem interagir com receptores celulares e desencadear um conjunto de

reações que resultem em mutações e/ou deleções de informações gênicas, responsáveis por gerir processos celulares vitais, inclusive aquelas relacionadas à proliferação e apoptose (Chen et al., 2006; Narisawa-Saito e Kiyono, 2007; Peters et al., 2012). Dessa forma, alterações nos genes indutores da proliferação celular, os proto-oncogenes, como nos limitadores do ciclo celular, genes supressores tumorais, podem levar à desregulação do ciclo e permitir a multiplicação descontrolada. Quando estas mutações ocorrem em proto-oncogenes, estes se tornam oncogenes e tendem a superexpressar proteínas que estimulam o ciclo celular (Ward, 2002).

Figura 05. *Hallmarks* do câncer - Principais características apresentadas por células transformadas.



Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011.

3.4 O ciclo celular

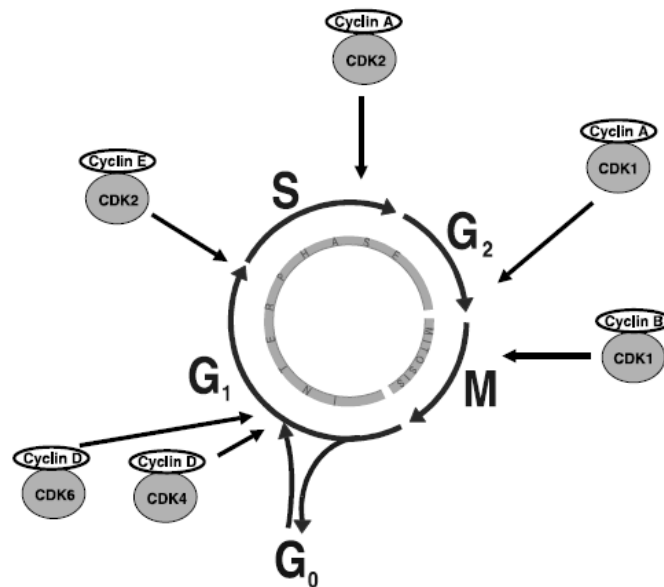
O ciclo celular compreende os processos básicos que ocorrem desde a formação de uma célula até sua própria divisão em duas células filhas. Nas células eucariotas estes processos são agrupados em três grandes etapas: a interfase que compreende o espaço entre duas divisões sucessivas, a mitose e a citocinese, que representam as divisões nuclear e citoplasmática, respectivamente (Junqueira e Carneiro, 2012). A interfase é

convencionalmente dividida em três fases: G_1 , S e G_2 . A fase G_1 (do termo em inglês *gap*, que significa intervalo) é marcada pelo aumento no volume celular, intensa síntese de RNA e proteínas necessárias para a próxima fase, a fase S (do termo em inglês *synthesis*, que significa síntese) é o período que ocorre a replicação do DNA, em seguida, na fase G_2 ocorre nova síntese de proteínas, dessa vez a maioria das proteínas sintetizadas será necessária à divisão celular. Em alguns tipos celulares a fase G_1 nem sempre é sucedida pela fase S e a célula é então encaminhada à fase G_0 podendo estacionar nesta fase por longos períodos e, dessa forma, raramente sofrem divisão. No final da interfase a célula contém o dobro de DNA que apresentava no início e a mitose, a fase M, está prestes a ser iniciada e, por sua vez, é subdividida em prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase, onde cada subdivisão está relacionada a um evento celular específico (Junqueira e Carneiro, 2012).

O avanço do ciclo celular é basicamente coordenado por estímulos externos que desencadeiam mecanismos regulatórios internos que induzem o início do ciclo, porém, antes de progredir de uma etapa à outra da divisão celular a célula passa por uma inspeção em pontos específicos conhecidos como pontos de restrição ou *checkpoints*. Entre as funções dos pontos de restrição podemos destacar a proteção da integridade genômica e, consequentemente a prevenção do acúmulo de erros genéticos durante as divisões celulares (Johnson e Walker, 1999; Kastan e Bartek, 2004).

De forma simplificada, estímulos extrínsecos como, fatores de crescimento, podem se acoplar a receptores específicos e disparar cascatas de sinalização que resultam na formação de complexos constituídos pelas proteínas ciclinas e quinases dependentes de ciclina (CDKs) (Figura 06). Estes complexos podem atuar na fosforilação de outro complexo proteico chamado pRb-E2F promovendo a liberação do fator E2F, este atua na evolução do ciclo (ciclina E/CDK2) e permite a passagem de G_1 para S. Na fase S, a atuação conjunta da ciclina A com a CDK2 promove a formação de SPF (do termo em inglês, *S phase promoting factor*), em seguida, SPF atua através do complexo de pré replicação (pré-RC) que inicia a ativação de moléculas envolvidas na replicação do DNA. Em seguida, de forma parecida, o fator promotor de fase M ou mitose já no final da fase G_2 (ciclina A/CDK1), promove a sequência do ciclo em sentido à fase M (ciclina B/CDK1) (Johnson e Walker, 1999; Vermeulen et al. 2003; Schwartz e Shah, 2005; Houtgraaf et al., 2006).

Figura 06. Os estágios do ciclo celular e a regulação CDK/ciclina.



Fonte: Vermeulen et al., 2003.

Enquanto a progressão do ciclo está relacionada, principalmente, aos complexos ciclinas-CDKs, a inibição da continuidade do ciclo celular é exercida por uma classe de proteínas conhecidas como inibidoras de quinases dependentes de ciclinas (CKIs). Este grupo de proteínas pode atuar na ocorrência de algum defeito no processo de divisão celular como, por exemplo, danos ao DNA, mediando a interrupção do ciclo, reparo do material genético e até a morte celular. Normalmente, as CKIs são classificados em dois grupos distintos, o específico, como p15, p16, p18 e p19 que atuam em CDKs pré-definidas, e o inespecífico que possuem a capacidade de agir em vários complexos de ciclino-quinases, são eles, p21, p27, p53 e p57 (Siebert et al., 1996; Johnson e Walker, 1999; Vermeulen et al. 2003; Korgun et al., 2006; Mallumbres e Barbacid, 2009).

Entre as proteínas inibidoras do complexo ciclino-quinase, destaca-se a proteína p53, sua função consiste na busca de danos ao DNA durante o progresso do ciclo celular. Dessa forma, pode atuar no bloqueio do ciclo, com o objetivo de promover a reparação do DNA ou iniciar um processo de morte celular. A p53 interage com várias moléculas como p21, p73, Bax e Bcl-2, em diversas vias bioquímicas do ciclo, relacionadas a paralisação do ciclo celular (Vogelstein et al., 2000; Martín de Civetta e Civetta, 2011; Muller e Vousden, 2013). Mutações no gene que codifica a proteína p53 foram detectadas em mais de 50% de todas as neoplasias malignas, assim, a presença da variante mutada de p53 em células ou plasma

sanguíneo pode indicar um sinal de mau prognóstico, pois coloca em cheque todo o controle normal do ciclo celular (Martín de Civetta e Civetta, 2011).

Em condições normais, se houver alguma alteração anômala durante o ciclo celular, o mesmo é interrompido até que o defeito seja reparado e o ciclo celular possa continuar, caso contrário, a célula pode ser conduzida à apoptose (Vermeulen et al., 2003).

O ciclo celular é um importante alvo para o desenvolvimento de novos fármacos anticâncer, muitos agentes já utilizados na clínica apresentam atividade sobre o ciclo celular como, por exemplo, o metotrexato, fluorouracil, citarabina, paclitaxel, entre outros (Almeida et al., 2005).

3.5 Apoptose e seus mecanismos

A morte celular, em especial, a apoptose é o caminho que direciona as mais importantes informações relativas ao estudo da proliferação celular desordenada. Compreender a apoptose e seus mecanismos, em condições normais e de doença, é muito valioso, pois além de poder entender com mais elementos a patogênese de uma doença também deixa pistas sobre como a mesma pode ser tratada (Wong, 2011).

O termo apoptose foi usado pela primeira vez por Kerr, Wyllie e Currie na década de 70 para descrever uma forma morfológicamente distinta de morte celular, no entanto, alguns fatores essenciais para compreensão deste tipo de morte foram explicados anteriormente (Kerr et al., 1972; Kerr, 2002; Elmore, 2007). A apoptose desde então tem sido reconhecida como um processo importante de eliminação celular, geneticamente regulado, com características morfológicas específicas e mecanismos bioquímicos dependentes de energia (Grivicich et al., 2007; Elmore, 2007). É considerada um componente vital de vários processos, incluindo a renovação celular, com o objetivo de manter a homeostase tecidual, o funcionamento adequado do sistema imunológico e o desenvolvimento embrionário. A desregulação do processo apoptótico, para mais ou menos, muitas vezes conduzem a doenças neurodegenerativas, doenças autoimunes e muitos tipos de câncer (Grivicich et al., 2007; Elmore, 2007).

Mesmo sendo geneticamente predispostos, os mecanismos apoptóticos podem ser ativados e disparar vias sinalizadoras através de estímulos como toxinas, radiações, alguns hormônios, hipóxia, quimioterapia, entre outros (Van Cruchten e Van Broeck, 2002; Fulda e Debatin, 2006).

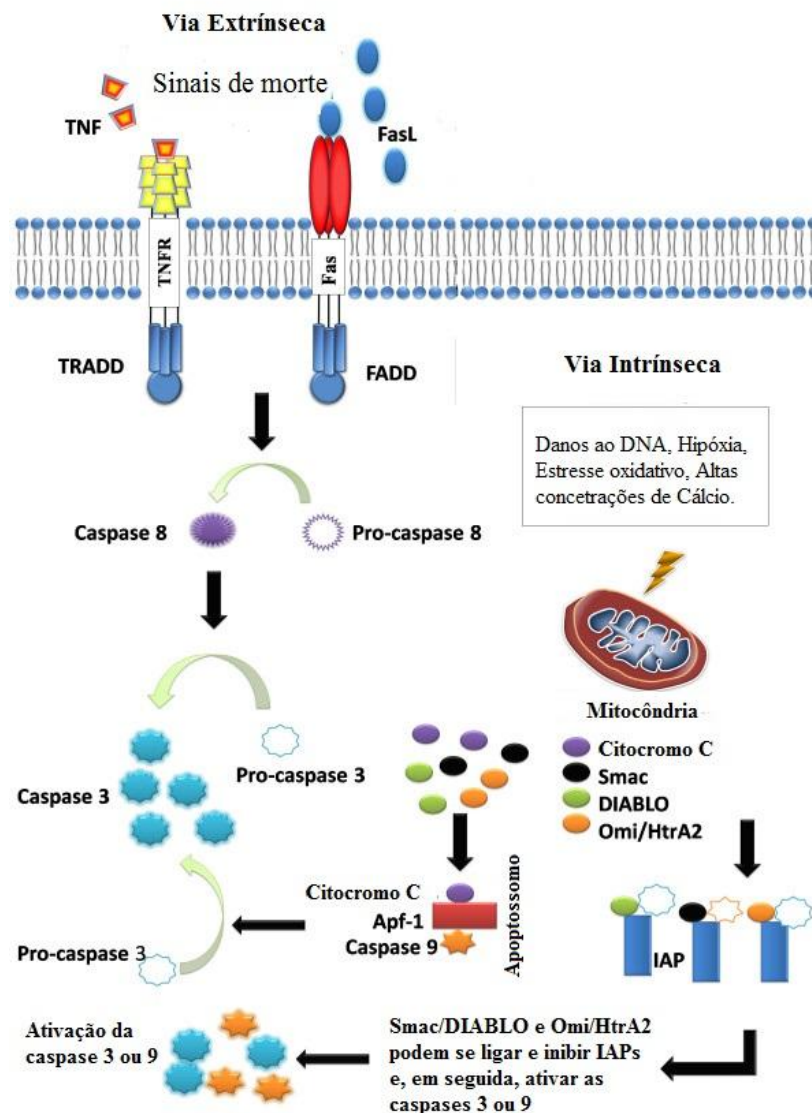
3.5.1 Vias bioquímicas de indução de apoptose

A cascata apoptótica constitui-se em um processo complexo e sofisticado que pode ser regulado por muitos sinais diferentes formando diferentes vias de indução de apoptose. Entre as vias que conduzem os mecanismos indutores de apoptose podemos destacar duas principais, a via extrínseca ou via do receptor de morte e a via intrínseca ou via mitocondrial. Embora, as vias iniciem de forma e locais distintos elas estão interligadas e convergem em um mesmo evento celular, além disso, moléculas de uma via podem influenciar a outra (Fulda e Debatin, 2006; Elmore, 2007).

As principais moléculas envolvidas no controle de morte celular são as caspases, enzimas proteolíticas que apresentam em seu sítio catalítico a cisteína, estas moléculas possuem a capacidade de clivar proteínas após um resíduo de ácido aspártico. Normalmente, as caspases são sintetizadas sob a forma de pro-caspases, isto é, monoméricas e inativas, tornando-se ativas após sofrerem dimerização e posterior clivagem. As caspases relacionadas ao controle de morte celular podem ser divididas em dois grupos principais, caspases iniciadoras (caspases - 2, 8, 9 e 10) e caspases efetoras (caspases - 3, 6, 7). As iniciadoras atuam em pró-formas inativas de efetoras, quando ativadas, as efetoras atuam de acordo com sua especificidade em diferentes substratos resultando no processo apoptótico (Elmore, 2007; McIlwain et al., 2015).

A via extrínseca ou via do receptor de morte é desencadeada pela atuação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF), entre eles, destacam-se o receptor de antígeno de apoptose -1 (Fas), o TNFR1 e os receptores de morte 3,4 e 5 (DR-3, -4 e -5). Os receptores possuem um subdomínio extracelular, o qual permite que eles reconheçam seus ligantes, como exemplo desses ligantes, tem-se o TNF, Fas-L, Apo3L e Apo2L (Lavrik et al., 2005; Grivicich et al., 2007). Quando os receptores reconhecem um ligante específico, sua porção citoplasmática denominada “domínio de morte” pode interagir com moléculas adaptadoras, como a FADD (Fas-Associated Death Domain Protein). Estas moléculas têm a capacidade de recrutarem as pró-caspases 8, que logo se auto dimerizam, tornam-se ativas e atuam na clivagem das pró-caspases 3, 6 e 7. Em seguida, as caspases 3, 6 e 7 ativas atuam em substratos celulares e promovem a apoptose (Lavrik et al., 2005; Fulda e Debatin, 2006; Samraj et al., 2006; Grivicich et al., 2007; Li-Weber, 2013) (Figura 07).

Figura 07. Esquema simplificado das vias extrínseca e intrínseca da apoptose.



Fonte: Adaptado de Wong, 2011.

A via intrínseca, ou mitocondrial, de indução de apoptose inicia-se geralmente através do desequilíbrio homeostático que provocam o estresse celular como, por exemplo, privação de fatores de crescimento, hipóxia, formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), hipertermia, danos ao DNA, entre outros fatores. Os sinais produzidos em resposta a estas perturbações são direcionados para a mitocôndria e provocam alterações no interior desta organela, dentre elas, a perda do potencial da membrana mitocondrial. Esta alteração estrutural da membrana resulta no aumento da permeabilização mitocondrial e consequentemente possibilita a liberação, para o citossol, um grupo de moléculas pró-apoptóticas (Fulda e Debatin, 2006; Elmore, 2007; Zhao et al., 2013). Ao atingir o citossol,

este grupo de moléculas proteicas formado pelo citocromo *c*, Smac/DIABLO e a Omi/HtrA2 seguem caminhos distintos. O citocromo *c* forma um complexo proteico com uma proteína adaptadora conhecida como Apaf-1, este complexo é capaz de atuar na dimerização da procaspase 9 formando uma tríade molecular conhecida como apoptossomo, essencial para liberação de caspase 9. Em seguida, a caspase 9 iniciadora promove a ativação da caspase 3 efetora e, a partir deste momento, as etapas seguintes ocorrem de modo semelhante as da via extrínseca. As proteínas Smac/DIABLO e Omi/HtrA2 ainda estão relacionadas com a indução de apoptose através da inibição de IAPs, que são proteínas inibidoras de apoptose (Figura 07). Ainda na mitocôndria, uma flavoproteína denominada de Fator de Indução de Apoptose (AIF) é liberada para o citossol em direção ao núcleo celular com o objetivo de induzir a condensação da cromatina e fragmentação do DNA, independente da atuação de caspases (Saelens et al., 2004; Grivicich et al., 2007; Li-Weber, 2013).

Muitas proteínas têm sido reportadas exercendo atividade pró ou anti apoptótica na célula, a relação entre estas proteínas é muito importante na regulação de morte celular. Além disso, foi verificado que a sobre ou sub - expressão de certos genes tem contribuído para a carcinogênese através da redução da apoptose (Singh, 2007; Wong, 2011). A família de proteínas Bcl-2 é composta por proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas que desempenham um papel fundamental na regulação da apoptose, especialmente através da via intrínseca ou mitocondrial. As proteínas deste grupo possuem um papel crucial na manutenção da permeabilidade da mitocôndria. Com base na sua função e na homologia de seus domínios os membros da família Bcl-2 são divididas em proteínas anti-apoptóticas, que protegem as células dos estímulos apoptóticos como, a Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1, Bcl-w, A1/Bfl-1 e Bcl-B/Bcl2L10, enquanto, as proteínas, Bid, Bad, Noxa, Bax e Bak, por exemplo, que podem conduzir à apoptose, são as chamadas proteínas pró-apoptóticas (Samraj et al., 2007; Singh, 2007; Wong, 2011).

3.5.2 Características da apoptose e outros tipos de morte celular

A morte celular é uma importante ferramenta fisiológica que ocorre nos organismos multicelulares com o objetivo de auxiliar os processos homeostáticos. No entanto, a indução desordenada ou a supressão desta ferramenta, como já citado, pode conduzir a várias patologias como doenças autoimunes, mecanismos pro-inflamatórios severos, isquemias, câncer, entre outras (Kroemer, et al., 2007). Recentemente, ficaram estabelecidos, através do Comitê de Nomenclatura em Morte Celular, os principais tipos de morte celular e suas características morfológicas e moleculares (Kroemer et al., 2009).

A necrose é um tipo de morte celular não específico que, em geral, pode atingir conjuntos celulares, áreas de um tecido e até órgãos inteiros. Este tipo de morte é desencadeado, principalmente, por déficit energético (obstrução vascular ou inibição de processos respiratórios), geração de radicais livres e agressão direta a membrana celular (Ricci e Zong, 2006; Kroemer et al., 2009). As características morfológicas mais representativas deste tipo de morte são o aumento do volume celular, a vacuolização citoplasmática, lise da membrana de organelas como, a mitocôndria e lisossomos, condensação da cromatina e ruptura da membrana citoplasmática (Van Cruchten e Van Broeck, 2002; Ricci e Zong, 2006). O processo necrótico é citotóxico sendo comumente associado às respostas inflamatórias, devido à liberação de conteúdo celular para o meio intercelular, que podem provocar a morte de células saudáveis e agredir severamente tecidos inteiros (Ricci e Zong, 2006; Kroemer et al., 2009).

As evidências mais características que servem para identificar o processo apoptótico é a redução do volume celular, condensação da cromatina, seguida de fragmentação nuclear, manutenção da integridade através da formação de prolongamentos da membrana plasmática e, o mais importante, formação de corpos apoptóticos (fragmentação celular) (Van Cruchten e Van Broeck, 2002; Ricci e Zong, 2006; Kroemer et al., 2009). Normalmente, os corpos apoptóticos apresentam na porção externa de sua membrana a molécula fosfatidilserina, que juntamente com outros fatores estão relacionados ao reconhecimento feito pelos macrófagos, os responsáveis pela fagocitose dos corpos apoptóticos (Van Cruchten e Van Broeck, 2002; Kroemer et al., 2009). Por isso, o processo apoptótico consiste em um mecanismo de morte específico que reduz a chances de agressão as células vizinhas e minimiza a ativação dos fenômenos imunológicos que levam à inflamação (Ricci e Zong, 2006; Kroemer et al., 2009).

Além dos processos de morte celular descritos, apoptose e necrose, são reconhecidos também os processos de autofagia e a cornificação (Tabela 01).

Tabela 01. Modalidades distintas de morte celular de acordo com as novas recomendações do Comitê de Nomenclatura de Morte Celular (NCCD).

Modalidades de morte celular				
Morfologia/Resposta	Apoptose	Necrose	Autofagia	Cornificação
Membrana celular	Preservação da membrana celular	Degradação da membrana	Formação de prolongamentos	Modificação da membrana

				plasmática
Citoplasma	Fragmentação (corpos apoptóticos)	Extravasamento citoplasmático, turgidez celular	Formação de vesículas autofágicas	Eliminação de organelas citosólicas
Núcleo	Piquinose, Cariorrexe	Degradação do DNA, cariólise	Condensação parcial da cromatina	Picnótico ou anucleados
Liberação de conteúdo celular	Lisofosfatidilcolina	Ácido úrico, metabólitos purínicos	Hidrolases ácidas	Lipídeos, proteínas
Energia	Requerida	Não requerida	Requerida	Requerida
Resposta imunológica	Ausência de inflamação	Relacionada com mecanismos inflamatórios	Ausência de inflamação	Ausência de inflamação

Fonte: Adaptado de: Kroemer et al., 2009.

A perda do equilíbrio entre morte e sobrevivência celular dentro destes complexos mecanismos merece destaque e, por isso, a compreensão do funcionamento das etapas e dos participantes no processo normal de eliminação celular é essencial para a busca de novas alternativas terapêuticas como, por exemplo, a caracterização de novas moléculas promissoras que possam atuar nos diversos alvos destes processos, com o objetivo de reestabelecer o processo natural de morte nas células (Kaufmann e Earnshaw, 2000; Grivicich et al., 2007).

3.6 Estratégias de tratamento do câncer

O avanço do conhecimento das neoplasias, desde os seus mecanismos iniciais até sua progressão é indiscutível. Neste mesmo sentido, as terapias antineoplásicas também evoluíram e estão contribuindo com maior efetividade no tratamento oncológico. No entanto, o aumento do número de casos de câncer ano após ano, seguida da crescente taxa de mortalidade e resistência aos fármacos anticâncer sugerem a importância da busca pelo aperfeiçoamento das terapias atuais e, principalmente, por novas abordagens terapêuticas (INCA, 2014).

As principais modalidades de tratamento do câncer disponíveis atualmente são as cirurgias, radioterapia, terapia hormonal, quimioterapia e o transplante de medula óssea (INCA, 2009). Além destas, tem-se usado a terapia da fotorradiação com derivados hematoporfirínicos (HTP) e a imunoterapia (Almeida et al., 2005). Normalmente são associados mais de um tipo de tratamento, por meio da terapia combinada, dependendo do

tipo histológico, o grau de diferenciação do tumor, a extensão da doença e à sensibilidade terapêutica do paciente (INCA, 2009).

Em geral, o método de tratamento utilizado pela maioria dos pacientes com câncer (60-70%) é a quimioterapia sistêmica difusa que utiliza agentes citostáticos e citotóxicos, normalmente, o mecanismo de ação destes agentes é baseado na interferência de algum estágio da divisão celular, isto é, desde a síntese das bases nitrogenadas até a síntese de proteínas (Symonds et al., 2006). Entretanto, muitos quimioterápicos não agem seletivamente, e possuem um baixo índice terapêutico que levam a efeitos colaterais perigosos, incluindo a náuseas, mielotoxicidade e cardiotoxicidade (Regulska et al., 2012). Além disso, a resistência às drogas contra o câncer é um dos problemas que mais interferem na eficácia da quimioterapia frente às neoplasias, levando as células a desenvolverem adaptações aos agentes quimioterápicos (González-Sánchez et al., 2011).

Os agentes antitumorais mais empregados no tratamento do câncer são os chamados agentes clássicos, entre eles, destacamos os agentes intercalantes de DNA, antimetabólitos, agentes túbulos-afins, inibidores das enzimas topoisomerases I e II, análogos das purinas e pirimidinas, agentes alquilantes, inibidores da RNA-polimerase, inibidores da síntese de proteínas e agentes indutores de danos ao DNA (Almeida et al. 2005; Bicknel, 2005). Desde o início da última década, além dos agentes clássicos também estão sendo utilizados no tratamento do câncer os moduladores da autofagia e angiogênese representados pelos anticorpos monoclonais e os inibidores da tirosina quinase (TK) (Bicknel, 2005; Ertmer et al., 2007; Gonzalez-Malerva et al., 2012).

As terapias atuais apresentam eficácia limitada em algum momento do tratamento, estão associadas a muitos efeitos adversos e, principalmente, resistência desenvolvida pelas células tumorais, por isso, emerge a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos antitumorais mais eficazes, seletivos e seguros. Neste sentido, uma das estratégias adotadas por nosso grupo de pesquisa foi a utilização de moléculas bioativas resultantes da hibridização molecular dos núcleos tiazolidina/acridina e imidazolidina/acridina (Figura 8) (Pitta et al., 2012; Lafayette et al., 2013).

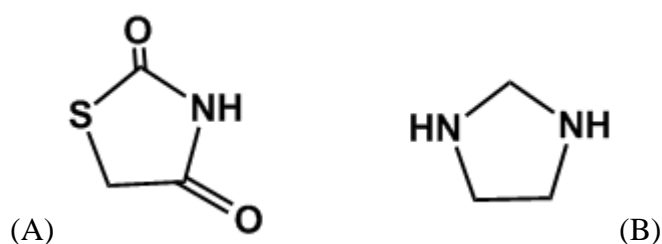
3.7 Tiazolidinas e imidazolidinas

As tiazolidinas, também conhecidas como glitazonas, pertencem a uma classe de moléculas que aumentam a sensibilidade à insulina e foram utilizadas no tratamento da diabetes tipo 2 durante um longo período de tempo (Davis, 2006). Estas moléculas têm uma

afinidade elevada para os receptores ativados por proliferador de peroxissoma gama (PPAR γ), um receptor nuclear envolvidos na regulação da função do tecido adiposo, em diversos aspectos, tal como homeostase da glicose, metabolismo dos ácidos graxos, e armazenamento em adipócitos (DeFronzo, 2005). Além do tecido adiposo, muitas linhagens celulares de câncer em humanos exibiam níveis elevados de PPAR γ , que por sua vez podem modular a proliferação celular e a apoptose (Han e Romano, 2007). Recentemente, a exposição destas células tumorais, especialmente, a troglitazona e ciglitazona, conduziu à inibição do crescimento celular (Nesto et al., 2003).

As imidazolidinas e seus análogos são constituídas por um núcleo heterocíclico contendo átomos de nitrogênio biologicamente ativos, apresentam várias propriedades biológicas, tais como anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana, antiparasitária, hipoglicemiante e anticonvulsivo (Sharma e Khan, 2001; Caterina et al., 2008; Saczewski et al., 2009; Neves et al., 2010; Gleave et al., 2010). Elas também têm sido consideradas como importantes intermediários para a concepção e síntese de compostos medicinais inibidores da ciclo-oxigenase-2 (COX-2) (Patel et al., 2004). Além disso, agentes imidazolidínicos demonstraram potencial antiviral e citostático (Opacić et al., 2005).

Figura 8. Núcleos da tiazolidina (A) e imidazolidina (B).



Fonte: Autor, 2015.

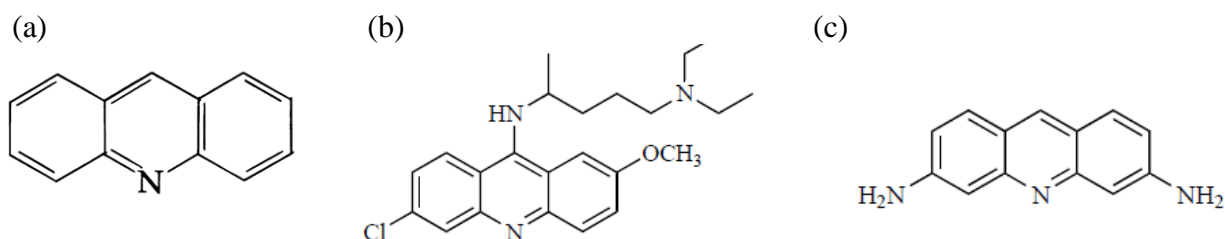
3.8. As acridinas e seus derivados

As acridinas pertencem a uma classe de moléculas orgânicas derivadas do antraceno, isoladas inicialmente do carvão de alcatrão, podendo também ser obtidas sinteticamente. Apresentam em sua estrutura química três anéis aromáticos fusionados, com um átomo de nitrogênio no anel central (Ferguson e Denny, 1991; Pons, 2001)

O interesse na utilização destas moléculas para fins terapêuticos vem desde o século XIX, mas, foi somente em 1913 que derivados acridínicos como a proflavina e a acriflavina foram

utilizados na prática clínica como antibacterianos (Demeunynck et al., 2001; Belmont et al., 2007). No início da década de 1920 foram iniciadas as pesquisas sobre a atividade anticâncer dos agentes acridínicos e, em 1930, o agente acridínico mepacrina foi descoberto e utilizado como a primeira droga sintética antimalárica com atividade comparável a quinina (Figura 09) (Denny, 2002; Belmont et al., 2007).

Figura 09 . Estrutura das moléculas da (a) acridina e seus derivados (b) mepacrina e (c) proflavina.



Fonte: Galdino-Pitta et al., 2013.

Ao longo dos anos várias propriedades biológicas foram atribuídas aos agentes acridínicos como atividades antiviral (Lyakhov et al., 2000; Sasvari et al., 2009) antibacteriana e antiprotozoária (Eiter et al., 2009; anti-inflamatória (Sondhi et al., 2010); antiparasitária, no tratamento da malária (Gemma et al., 2006; Jones et al., 2009) leishmaniose e doença de Chagas (Bonse et al., 1999; Girault et al., 2000; Pons, 2001). Ademais também podem atuar em doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer (Cabeza-Alvarez et al., 1999; May et al., 2003; Csuk et al., 2009) e crônicas como epilepsia (Korth et al., 2001) e, sobretudo, atividade anticâncer (Chen et al.; 2015; Janočková et al., 2015). As propriedades anticâncer das acridinas têm sido relacionadas à sua estrutura aromática planar que possibilita a interação com o DNA celular, intercalando-se entre os pares de bases da dupla hélice desta macromolécula (Ghosh et al., 2010). Esta importante habilidade confere às acridinas a capacidade de interferir na atividade das enzimas topoisomerases, telomerasas e as proteínas quinases. Todas estas biomoléculas atuam de forma direta ou indireta nos processos de divisão celular, seja através da replicação do material genético ou manutenção e regulação do ciclo celular (Demeunynck, 2004).

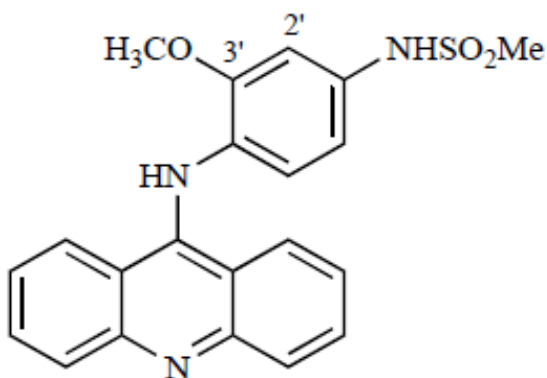
3.8.1 Principais classes dos compostos acridínicos

Os compostos acridínicos podem ser classificados de acordo com a sua estrutura química ou origem. Os grupos acridínicos mais citados na literatura são aqueles que possuem

vários derivados e que são estudados por mais grupos de pesquisa, ou então, aqueles que apresentam agentes de comprovada eficiência e que estão sendo atualmente utilizados na clínica (Galdino-Pitta et al., 2013).

A subclasse 9-aminoacridinas é representada por uma série que apresenta o grupo nitro na posição 9 da molécula acridínica. Derivados deste grupo foram utilizados no início do século XX no tratamento de infecções causadas por bactérias e protozoários. A mepacrina, por exemplo, utilizada como droga antimalárica é uma das representantes mais reconhecidas deste grupo (Denny et al., 2002); No entanto, a molécula derivada da 9-aminoacridinas de maior destaque é, sem dúvida, o agente anticâncer amsacrina [N-4-(9-acridinilamino-methoxyphenyl)-metanosulfonamida; (*m*-AMSA) (Figura 10). Esta molécula foi desenvolvida no início da década de 1970 na Nova Zelândia e comercializada pela primeira vez em 1976 para atuar no tratamento da leucemia mieloide aguda (LMA) e linfomas malignos, sendo pouco eficaz no tratamento de tumores sólidos (Denny et al., 2002; Ketron et al., 2012). Desde então vários análogos à amsacrina foram sintetizados, como a asulacrina (ASL) que demonstrou atividade citostática em alguns tumores sólidos e a e a (9-acridinilamino)-5-hidroximetil-anilina (AHMA) que exibiu efeito citotóxico em células de leucemia humana (HL-60) (Denny, 2002; Chang et al., 2003).

Figura 10. Estrutura química da amsacrina (*m*-Amsa).



Fonte: Belmont et al., 2007.

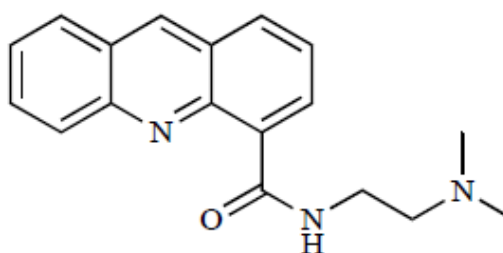
Os detalhes do mecanismo de ação da amsacrina e de seus derivados nas células neoplásicas são muito parecidos e ainda não foram completamente elucidados, porém, sabe-se que seu anel aromático anilino se intercala via interações π - π com os pares de bases do DNA na altura do sulco menor, o que pode provocar danos ao complexo clivável formado entre o

DNA e a enzima topoisomerase II, resultando na quebra irreversível de filamentos do DNA e condução à apoptose (Denny, 2002).

Entretanto, mesmo sendo um dos agentes acridínicos mais utilizados na clínica, a amsacrina também demonstrou-se potencialmente mutagênica e genotóxica para células normais. Entre os efeitos mais comuns estão as alterações estruturais do genoma como deleções e translocações (Denny, 2002), adicionalmente, estudos com animais relataram o desenvolvimento de resistência à droga e o aumento da incidência de tumores sólidos após o tratamento com amsacrina (Denny, 2002).

Compostos derivados da acridina-4-carboxamidas constituem outro importante grupo de compostos utilizados na clínica, como o N-[2-(dimetilamino)etil]acridina-4-carboxamida (DACA), composto intercalante de DNA utilizado no tratamento dos tumores sólidos e leucemias (Figura 11). Esta classe de acridinas tem a capacidade de atuar na inibição das enzimas topoisomerasas I e II. (Bridewell et al., 2001; Denny, 2002; Belmont et al., 2007).

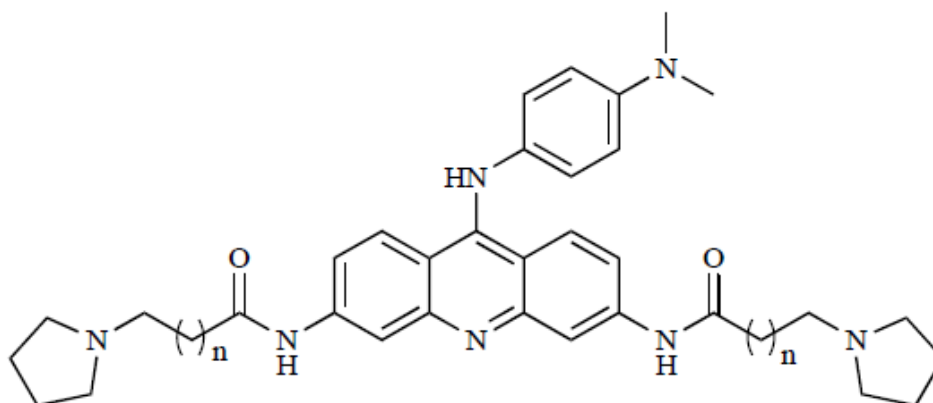
Figura 11. Estrutura química do derivado acridínico DACA.



Fonte: Belmont et al., 2007.

As subclasses das piridoacridinas, dibenzofenantrolinas e as acridinas-trissubstituídas representam as moléculas que atuam na estabilização da estrutura telomérica quadruplex - G4 e assim inibem a atividade da enzima telomerase. Esta enzima é superexpressa em quase todos os tipos de câncer humano (Belmont et al, 2007). A acridina 3,6,9 trissubstituída conhecida como BRACO-19 é uma potente e seletiva inibidora da telomerase (Figura 12) (Burger et al., 2005).

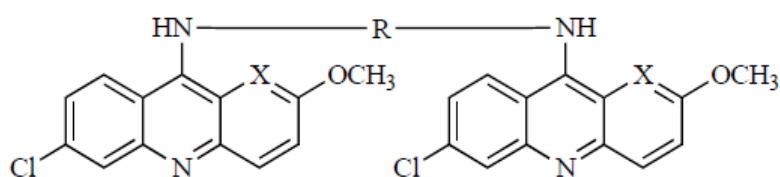
Figura 12. Estrutura química do derivado acridínico inibidor de telomerase BRACO-19.



Fonte: Belmont et al., 2007.

As poliacridinas são moléculas planejadas a partir da união de monômeros acridínicos. Estruturas dímeras (Figura 13) podem aumentar o potencial anticâncer, desde que seja respeitada a distância ideal entre as moléculas (Qin et al., 2006). Contudo, este aumento da capacidade intercalante não foi observado em moléculas trímeras ou tri-intercalantes (Wang et al., 2005). Dímeros de acridina foram sintetizados utilizando cadeias aminoalquiladas de espermidina na ligação entre os núcleos aromáticos e apresentaram propriedade citotóxica *in vitro* e *in vivo* (Wang et al., 2007).

Figura 13. Estrutura acridínica dimérica.



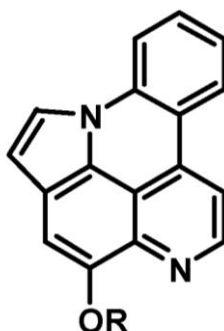
Fonte: Galdino-Pitta et al., 2013.

Os compostos naturais derivados da acridina também representam uma potencial fonte em pesquisas terapêuticas. A acronicina é um alcaloide citotóxico extraído da *Achrynychia baueri* que revelou-se altamente tóxico para linhagens tumorais em estudos *in vitro* (Guilbaud et al., 2002). Muitos derivados da acronicina foram sintetizados, entre eles, o S23906-1 que

demonstrou promissora atividade em xenoenxertos de adenocarcinoma de cólon (David-Cordonnier et al., 2002).

Alcalóides derivados da acridona isolados de *Swinglea glutinosa* apresentaram atividade antiparasitária contra *Plasmodium falciparum* resistentes à cloroquina (Braga et al., 2007). Muitos compostos como, por exemplo, briostatina, dolastina, criptoficina, apladina e ecteinascidina foram isolados de organismos marinhos e apresentam na sua estrutura a piridoacridina (Rinehart et al., 1990). Outros compostos que também compartilham da estrutura piridoacridina, a ascididemina (ASC) e a meridina, isolado de algumas espécies de tunicados exibiram atividade antitumoral e inibição da enzima telomerase *in vitro* (Guittat et al., 2005). Arnoaminas A e B (Figura 14) isoladas de *Cystodytes sp* são os primeiros membros de um grupo alcaloide que contém um anel pirrol fundido ao grupo pentacíclico piridoacrina, estes compostos apresentaram atividade potencial frente às linhagens de câncer de mama, pulmão e próstata (Imperatore et al., 2014).

Figura 14. Estrutura química da Arnoamina A (R=H) e Arnoamina B (R=Me).



Fonte: Imperatore et al., 2014.

3.8.2 Derivados acridínicos com atividade anticâncer (2010-2015)

Sondhi e colaboradores (2010) sintetizaram 22 novos derivados a partir da condensação da acridina-9-cloro-(2,4-R) e acridina-9-isotiocinato (2,4-R-) com diferentes aminas, em seguida, avaliaram a sua atividade anti-inflamatória e anticâncer. Destes, três compostos apresentaram boa atividade anticâncer contra sete linhagens neoplásicas como, MCF-7 (tecido mamário), HEP-G2 (fígado), Colo-205, 502713, HCT-15 (cólon), A-549 (pulmão) e IMR-32 (neuroblastoma).

A molécula híbrida acridina-platina demonstrou atividade inibitória significativa, quando comparada a cisplatina, da síntese de DNA em células não pequenas quimiorresistentes de câncer de pulmão (NSCLC) conduzindo a um arrasto na fase S do ciclo celular (Smyre, et al., 2011).

Em 2012, Barros e colaboradores sintetizaram e avaliaram a atividade citotóxica de cinco novos agentes tiazacridínicos em linhagens neoplásicas e células normais. As tiazacridinas apresentaram atividade citotóxica contra linhagens celulares de carcinoma de cólon e glioblastoma.

Pitta e colaboradores (2012) também sintetizaram e avaliaram a atividade anti-proliferativa *in vitro* de oito novos agentes tiazacridínicos. Os compostos foram testados em células neoplásicas de diferentes tecidos e apresentaram efeitos citostático e citotóxico.

Wang e colaboradores (2013) divulgaram seus resultados com uma série de derivados da 9-anilinoacridinas, por eles sintetizados, com capacidade de inibir a atividade da enzima topoisomerase II e P-glicoproteína (P-gp) em uma linhagem de leucemia multi-droga resistente. A P-gp é uma das principais proteínas bombeadoras, dependentes de energia, responsável pela redução da concentração intracelular das drogas citotóxicas (Sivapackiam et al., 2010).

Uma nova classe de compostos tiazacridínicos e imidazacridínicos foi avaliada quanto ao seu potencial inibidor da enzima topoisomerase I humana. A inibição da atividade desta enzima pode comprometer a síntese e replicação do DNA e, consequentemente, a divisão celular. Os compostos apresentaram moderada inibição da atividade da topoisomerase I humana sobre o plasmídeo super-helicoidizado PUC-19 (Lafayette et al., 2013).

Em 2014, Olszewska e colaboradores reportaram a síntese, a atividade citotóxica, indução de morte celular por apoptose e arrasto do ciclo celular na fase G1 de 16 novos compostos ciclopentaquinolínicos, uma classe derivada de moléculas acridínicas, em células neoplásicas não pequenas de pulmão (A549). O câncer de pulmão de não pequenas células corresponde a 80-85 % de todos os casos deste tipo de câncer, também é o tipo que mais mata em todo o mundo.

Almeida e colaboradores (2015) avaliaram a atividade antiproliferativa de derivados acridino-tiossemicarbazona em linhagens neoplásicas de células do tecido nervoso, medula óssea, mama, rins, pulmão, ovário, próstata e cólon. Neste estudo foi revelado que a natureza do substituinte no anel fenil influenciou significativamente a atividade antiproliferativa, onde o derivado (Z)-2-(acridina-9-ilmetileno)-N-fenilhidrazinacarbotoamida inibiu o crescimento de todas as linhagens de maneira dose-dependente.

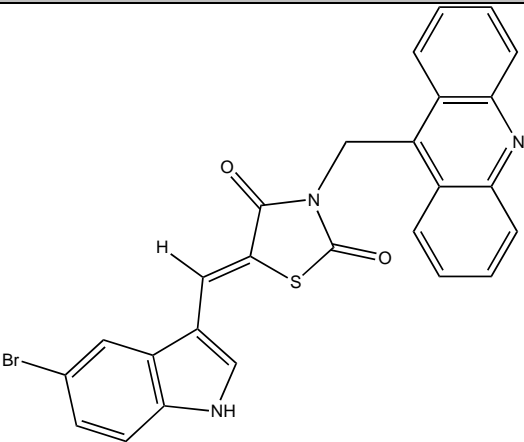
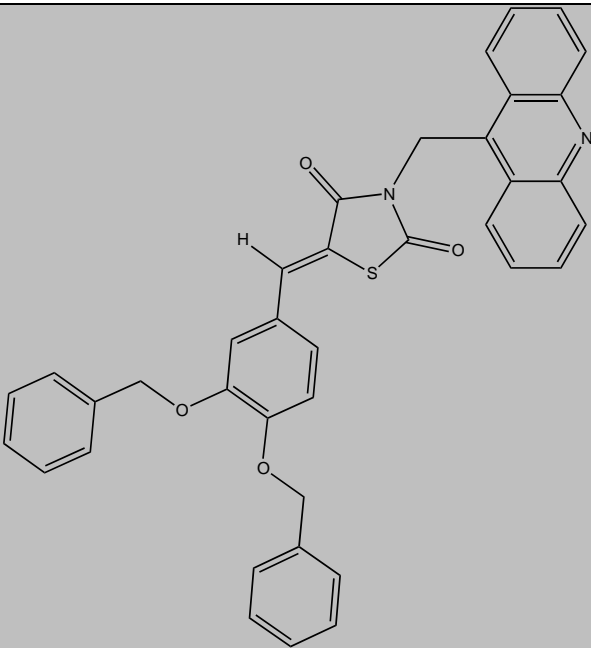
O novo derivado acridino-benzimidazol apresentou atividade citotóxica nas linhagens de câncer de cólon SW480 e HCT-116. Além disso, foi revelado que na linhagem HCT-116 o novo agente induziu a morte celular por apoptose através da via ROS-JNK de sinalização que amplificou os sinais apoptóticos das vias intrínseca e, em seguida, a extrínseca (Chen, et al. 2015).

Ainda em 2015, Janočková e colaboradores reportaram que novos derivados acridínicos apresentaram boa atividade citostática e inibitória das enzimas topoisomerase I e II quando testados em uma linhagem de leucemia humana (HL-60).

4.1 Obtenção dos derivados tiazacridínicos e imidazacridínicos

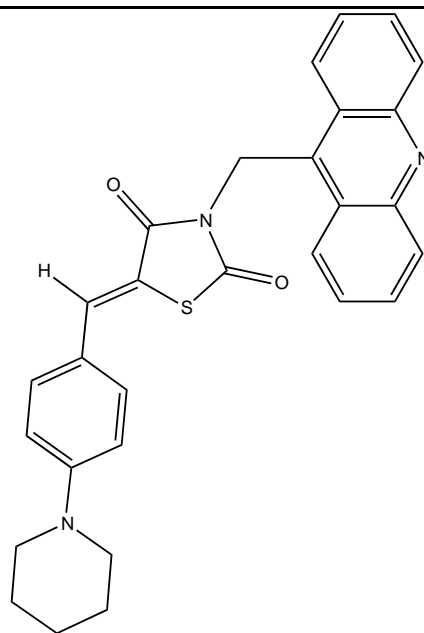
Os derivados tiazacridínicos e imidazacridínicos foram sintetizados no Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (Tabela 02).

Tabela 02. Novos agentes tiazacridínicos e imidazacridínicos potencialmente anticâncer.

Código	Nome químico	Fórmula molecular	Estrutura molecular
LPSF/AA29	3-Acridin-9-ilmetil-5-(5-bromo-1 <i>H</i> -indol-3-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona	$C_{26}H_{16}BrN_3O_2S$	
LPSF/AA35	3-(acridin-9-ilmetil)-5-(3,4-bis-(benzilóxi)-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona	$C_{38}H_{28}N_2O_4S$	

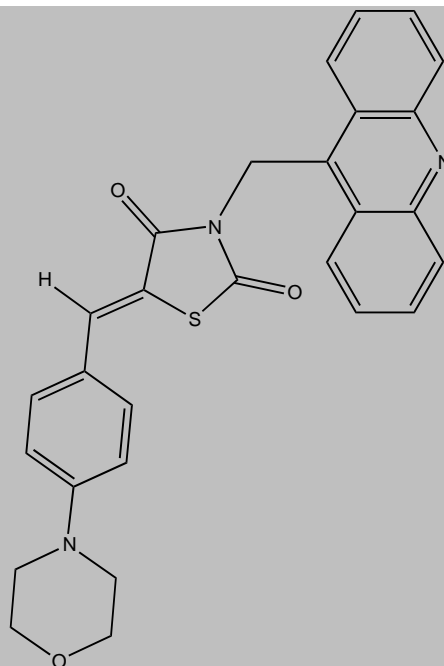
LPSF/AA36

**3-(acridin-9-ilmetil)-
5-(4-(piperidin-1-il)-
benzilideno)-
tiazolidina-2,4-diona**

 $C_{29}H_{25}N_3O_2S$ 

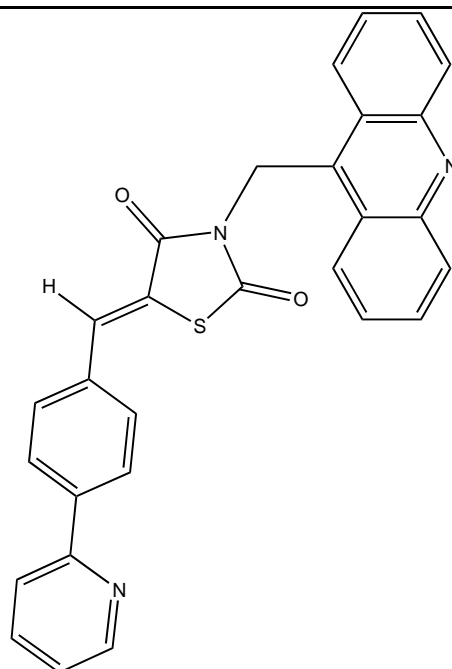
LPSF/AA-39

**3-(acridin-9-ilmetil)-
5-(4-morfolino-
benzilideno)-
tiazolidina-2,4-diona**

 $C_{28}H_{23}N_3O_3S$ 

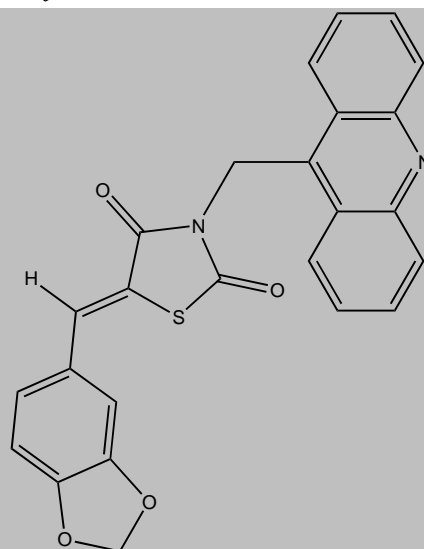
LPSF/AA-40

3-(acridin-9-ilmetil)-
5-(4-(piridin-2-il)-
benzilideno)-
tiazolidina-2,4-diona

 $C_{29}H_{19}N_3O_2S$ 

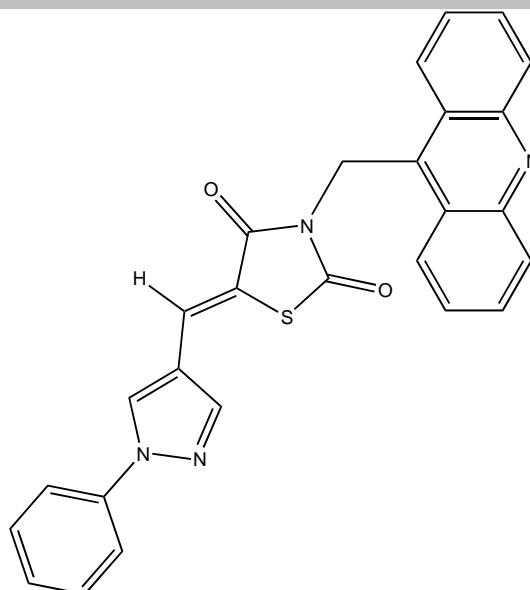
LPSF/AA-41

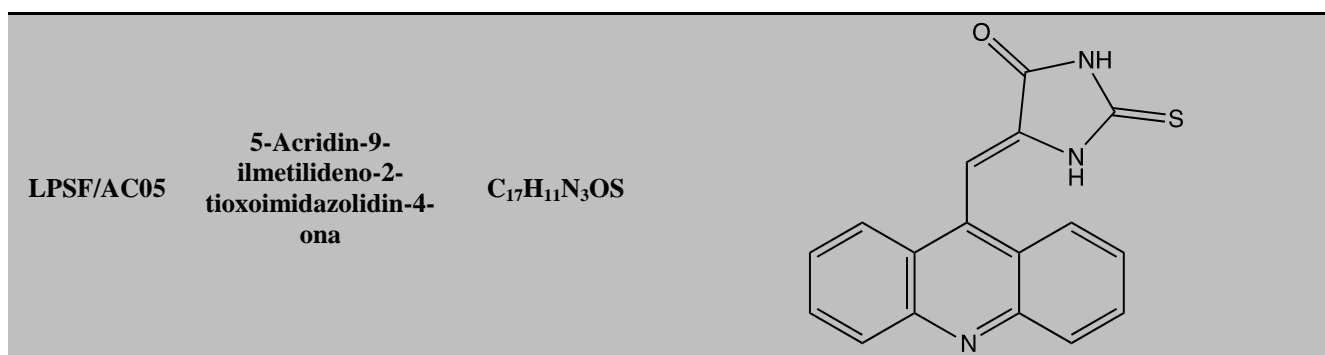
3-(acridin-9-ilmetil)-
5-(benzo[d][1,3]dioxol-
5-ilmetileno)-
tiazolidina-2,4-diona

 $C_{25}H_{16}N_2O_4S$ 

LPSF/AA-48

3-(acridin-9-ilmetil)-
5-((2-fenil-2H-1,2,3-
triazol-4-il)-
metileno)-
tiazolidina-2,4-diona

 $C_{26}H_{17}N_5O_2S$ 



4.2 Linhagens de células neoplásicas

O estudo da atividade antitumoral foi realizado com linhagens neoplásicas humanas adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), com exceção da linhagem NG97, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Roger Chammas (Universidade de São Paulo) (Tabela 03).

Tabela 03. Linhagens de células neoplásicas e não tumoral de mama.

Linhagem	Características
CCRF-CEM	Leucemia linfoblástica aguda
JURKAT	Leucemia aguda de células T
HEP-G2	Carcinoma hepatocelular
HL-60	Leucemia Promielocítica humana
K-562	Leucemia mielogênica crônica
MCF-7	Adenocarcinoma mamário
MCF-10A	Normal mama
MDA-MB-231	Adenocarcinoma mamário resistente
NG-97	Astrocitoma humano tumorigênico
RAJI	Linfoma de Burkitt
TOLEDO	Linfoma de células B não Hodgkin
T47-D	Adenocarcinoma mamário

4.3 Cultura e manutenção das linhagens celulares

As linhagens celulares foram mantidas em garrafas de poliestireno em estufa úmida à temperatura de 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂, sendo acompanhadas diariamente com o auxílio de um microscópio invertido. A troca do meio foi realizada sempre que havia necessidade de renovação de nutrientes. As linhagens em suspensão CCRF-CEM, Jurkat, HL-

60, K-562, Raji, Toledo e as aderidas Hep-G2, MCF-7, NG-97 e T47-D foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 10 mM de HEPES e 1% de penicilina/estreptomicina. A linhagem MCF-10A foi cultivada em meio DMEN/F12 suplementado com 5 % de soro equino, 20 ng/ml de fator de crescimento epidermal (EGF), 0,5 µg/ml de hidrocortisona, 10 µg/ml de insulina, 100 ng/ml de toxina colérica e 1% de penicilina/estreptomicina. A linhagem MDA-MB-231 foi cultivada em meio Leybovitz (L-15) suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 10 mM de HEPES e 1% de penicilina/estreptomicina na ausência de CO₂. Durante a manutenção das células aderidas foi utilizado tripsina (0,25 %) e EDTA (1 mM) para expansão das linhagens.

4.4 Obtenção, isolamento e manutenção das células mononucleadas do sangue periférico (PBMCs) em cultura

Para este estudo foi necessário coletar amostras do sangue periférico de (n=20) voluntários sadios. Foi coletado 10-15 ml de sangue em tubo contendo o anticoagulante heparina, as coletas foram feitas por profissionais competentes e devidamente treinados para reduzir os riscos para o paciente. Nenhuma coleta foi realizada sem a autorização prévia dos voluntários. Para isso, apresentamos aos pacientes o objetivo do estudo e o interesse da sua participação. Em razão da necessidade de coleta de sangue periférico, o Projeto foi submetido ao COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS - Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal de Pernambuco e aprovado sob o parecer nº 11006 em 26.04.2012.

As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram isoladas a partir do método de densidade por centrifugação com Ficoll Paque™ Plus (GE Healthcare BioSciences). Antes de serem utilizadas, as células foram mantidas em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 10 mM de HEPES e 1% de penicilina/estreptomicina em estufa úmida à temperatura de 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂ (Okumura et al., 2010; Roland et al., 2013).

4.5 Ensaio de citotoxicidade *in vitro* em células neoplásicas e não tumorais.

O teste de citotoxicidade *in vitro* foi realizado nas células neoplásicas e normais com diferentes concentrações dos derivados tiazacridínicos e imidazacridínicos. A citotoxicidade celular foi quantificada pelo método colorimétrico 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT). Este consiste em um método sensível que possui a capacidade

de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas desidrogenases mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas (Sylvester, 2011).

As células foram distribuídas em placas de 96 poços onde cada poço recebeu a quantidade de 1×10^4 de células. Após 24h diferentes concentrações dos novos derivados (1, 10, 25, 50 e 100 μM) foram adicionadas e as placas incubadas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO_2 por 48 h e 72h para as células normais e neoplásicas, respectivamente. Passado o período de incubação foram adicionados 20 μL da solução de MTT (3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) na concentração de 5 mg/mL diluída em PBS, as placas foram então protegidas da luz e incubadas mais uma vez em estufa úmida a 37°C e 5% de CO_2 por um período de 3h. A reação foi então interrompida pela adição de 130 μL de SDS 20% e a densidade óptica medida após 24 horas no comprimento de onda de 560 nm. A leitura foi realizada em um leitor de microplacas (EL808 - Biotek®) (Rêgo et al., 2014). A determinação do potencial citotóxico dos compostos testados foi calculada em relação ao controle tratado com o veículo DMSO a 0,01%. Para determinação da concentração de composto necessária para 50% de inibição *in vitro* (IC_{50}) foram realizados três ensaios independentes de redução do MTT. O IC_{50} de cada ensaio foi calculado com o auxílio do programa OriginPro 8 (Originlab Corporation®, Northampton, MA, EUA).

4.6 Avaliação do potencial de indução de morte por apoptose

As linhagens teste foram distribuídas em placas de 6 poços numa densidade de $0,5 \times 10^6$ células por poço e incubadas à 37 °C sob atmosfera de 5% de CO_2 por 24 horas. Em seguida as células foram tratadas com LPSF/AA-29 (Raji, Jurkat, NG-97 e T47-D), LPSF/AA-36 (Hep-G2) e amsacrina (todas as linhagens) nas concentrações previamente determinadas pelo IC_{50} e incubadas por 48 horas nas mesmas condições acima. Células não tratadas foram utilizadas como controle. Após o tratamento com os novos compostos, a análise do potencial de indução de morte celular por apoptose foi realizada utilizando o kit Apo-BrdU (eBiosciences, USA) seguindo as recomendações do fabricante. Em resumo, nesta etapa as células foram marcadas com bromodesoxiuridina trifosfato (Br-dUTP) e incubadas por 1 hora a 37 °C, seguida pela adição do anticorpo monoclonal de detecção FITC-anti Br-dU, iodeto de propídeo e RNAase A. A porcentagem de células conjugadas com o anticorpo foi analisada através de citometria de fluxo utilizando o citômetro de fluxo Accuri C6

(Becton, Dickinson and Company, USA), sendo os dados obtidos analisados pelo programa C6 software (Becton, Dickinson and Company, USA).

4.7 Efeito dos novos agentes acridínicos sobre o ciclo celular

As células foram distribuídas em placas de 6 poços numa concentração de $0,5 \times 10^6$ células por poço e tratadas de forma semelhante ao item 4.6 e após 48 horas as células foram suspensas e lavadas em PBS e fixadas em álcool 70 % à 4-6 °C , em seguida, as células foram incubadas por 24 horas à - 20 °C. Em uma segunda etapa, as células foram marcadas com iodeto de propídeo (5 mg/mL) / RNase A (0,25 mg/mL) em PBS por 30 minutos sobre o gelo (Solhaug et al., 2013). O conteúdo de DNA celular foi quantificado através de citometria de fluxo utilizando o citômetro de fluxo Accuri C6, onde a porcentagem de DNA em cada fase do ciclo foi obtida pelo programa C6 software (Becton, Dickinson and Company, USA).

4.8 Ensaio de inibição da atividade da enzima topoisomerase II

A avaliação da atividade de inibição da enzima topoisomerase II em LPSF/ AC05 foi realizada utilizando o kit Topoisomerase II Drug Screening (plasmid based) (TopoGEN, EUA). O DNA (pHOT1 plasmídeo) super-enovelado foi incubado com a topoisomerase II humana (5 unidades) na presença ou ausência de LPSF/AC05 (50 e 100 μ M). O solvente DMSO (0,2%) foi utilizado como controle do veículo e etoposídeo (50 μ M) como controle positivo. A eletroforese em gel de agarose (1%) foi realizada com o tampão acetato de Tris-EDTA (TAE), com voltagem de 2V/cm por um período de 50 minutos. Após a corrida, o gel foi corado com 0,5 μ g/mL de brometo de etídio durante 15 minutos e fotografado sob a luz ultravioleta (UV). A análise quantitativa das bandas do gel foi realizada utilizando o programa ImageJ (Versão 1.49) (NIH, USA).

4.9 Avaliação da inibição de migração celular utilizando a linhagem de câncer de mama MCF-7.

As células foram distribuídas em placas de seis poços numa densidade de 5×10^4 por poço e incubadas à 37 °C sob atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas. Após atingir a confluência necessária, o meio de crescimento foi aspirado e duas lavagens com PBS 1X

foram realizadas, em seguida, com o auxílio de uma régua metálica foram feitas duas linhas de marcação (estrias) perpendiculares utilizando uma pipeta P1000. Após o procedimento de marcação das estrias as células foram tratadas com meio completo (controle), DMSO 0,1 % e LPSF/AC-05 nas concentrações previamente determinadas pelo IC_{50} , fotografadas no microscópio invertido ($t = 0$) e incubadas por 48 horas ($t = 48$) nas mesmas condições acima. Os dados do ensaio de migração foram obtidos a partir da análise das imagens através do programa ImageJ (Versão 1.49) (NIH, USA).

4.10 Análise estatística dos resultados

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e em três experimentos independentes. Os valores de IC_{50} foram obtidos a partir da média dos resultados de viabilidade celular através do programa OriginPro (Versão:8.0, OriginLab, USA). A significância estatística foi obtida aplicando-se o Teste T de Student através do programa GraphPad Prism (Versão 5.0, GraphPad software, USA), em relação ao controle positivo ou não tratado. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

5.1 Artigo 01

Original article

Human and Experimental Toxicology
1–12

© The Author(s) 2016

Reprints and permissions:

sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav

DOI: 10.1177/0960327116680274

het.sagepub.com



New thiazacridine agents: Synthesis, physical and chemical characterization, and in vitro anticancer evaluation

MBO Chagas¹, NCC Cordeiro², KMR Marques¹, MG Rocha Pitta²,
MJB M Rêgo¹, MCA Lima², MGR Pitta¹ and IR Pitta^{1,2}

Abstract

A series of new thiazacridine agents were synthesized and evaluated as antitumor agents, in terms of not only their cytotoxicity but also their selectivity. The cytotoxicity assay confirmed that all compounds showed cytotoxic activity and selectivity. The new compound, 3-acridin-9-ylmethyl-5-(5-bromo-1*H*-indol-3-ylmethylene)-thiazolidine-2,4-dione (LPSF/AA29 – **7a**), proved to be the most promising compound as it presents lower half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) values (ranging from 0.25 to 68.03 μM) depending on cell lineage. In HepG2 cells, the lowest IC₅₀ value was exhibited by 3-acridin-9-ylmethyl-5-(4-piperidin-1-yl-benzylidene)-thiazolidine-2,4-dione (LPSF/AA36 – **7b**; 46.95 μM). None of the synthesized compounds showed cytotoxic activity against normal cells (IC₅₀ > 100 μM). The mechanism of death induction and cell cycle effects was also evaluated. Flow cytometric analysis revealed that the compounds LPSF/AA29 – **7a** and LPSF/AA36 – **7b** significantly increased the percentage of apoptotic cells and induced G2/M arrest in the cell cycle progression. Therefore, these new thiazacridine derivatives constitute promising antitumor agents whose cytotoxicity and selectivity properties indicate they have potential to contribute to or serve as a basis for the development of new cancer drugs in the future.

Keywords

Acridine, anticancer activity, cell cycle, death induction mechanisms, thiazolidine

Introduction

Acridines and their structural analogues constitute a class of important molecules for the development of promising chemotherapeutic agents.¹ The planar structure of their aromatic rings provides them with the ability to intercalate with the base pairs of DNA.² A series of biological activities have been reported in the literature for these molecules such as analgesic, antiviral, antimicrobial, antiprion, anti-inflammatory, and anticancer activities.^{3–8}

In cancer chemotherapy, acridines can lead to cell cycle arrest and apoptosis,^{7–9} as their major biological targets are enzymes related to DNA synthesis and cell proliferation like topoisomerases (Topo I and Topo II) and telomerase.^{10–12} Amsacrine is one of the most well-known acridine derivatives and was among the first to be used clinically as an anticancer agent. It is considered to be an inhibitor of topoisomerase II.^{13,14}

Amsacrine has a cytotoxic potential that is highly effective in the treatment of acute leukemia and lymphomas; however, it is less effective on solid tumors.¹⁵ On the other hand, thiazolidinediones (TZDs), also known as glitazones, belong to a class of molecules that increase insulin sensitivity and were used in the treatment of type II diabetes mellitus for a long time.¹⁶ These molecules have high affinity for the peroxisome

¹Laboratory for Immunomodulation and New Therapeutic Approaches, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil

²Laboratory for Planning and Drug Synthesis, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil

Corresponding author:

MJB M Rêgo, Rua Tereza Mello, s/n, Cidade Universitária, UFPE
Cidade Universitária/50670-901, Recife, PE, Brazil.
Email: moacyr.rego@gmail.com

proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), a nuclear receptor with a well-established role in lipid homeostasis.^{17,18} Additionally, studies have shown that PPAR γ is expressed in many cancer lineages modulating cell proliferation and apoptosis.¹⁹

The TZD compounds, PPAR γ agonists, constitute emergent antitumor agents against multiple cancers,^{20,21} but some studies have also indicated antiproliferative activity of TZDs in cancer cell lines independent of PPAR γ agonism.^{22–24} In summary, the key mechanisms involved in anticancer activity following TZD treatment are inhibition of cell growth, induction of cell death by apoptosis, and inhibition of cell invasion.^{20,24,25}

Therefore, the strategy of our group was to develop new alternatives for the treatment of cancer using the molecular hybridization technique to unite the nuclei of acridine and TZD molecules to obtain a new class of compounds, the thiazacridines. Here, we describe the synthesis of eight new thiazacridines and results of *in vitro* cytotoxicity evaluation against different cancer cell lineages, including their selective potential and effects on the cell cycle and the induction of programmed death in tumor lines.

Materials and methods

Chemical

The synthesis of all intermediates was performed in parallel to obtain the thiazolidine-2,4-dione nucleus (**2**) and esters of Cope (**6a–g**), which allowed for the synthesis of the new thiazacridine derivatives (**7a–g**).⁸ All melting points (mp) were determined using a Quimis-340.27 apparatus (Quimis, Brazil). Infrared spectroscopy (IR) was performed on an IRPrestige-21 spectrometer (Shimadzu, Japan). Proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR) spectra were recorded at 27°C on a Varian Plus 300 MHz instrument (Varian, Palo Alto, CA, USA) with tetramethylsilane (TMS) as an internal standard and dimethyl sulfoxide (DMSO)-*d*₆ as a solvent. Chemical shifts (δ ppm) were determined using TMS as the internal standard and the coupling constants (*J*) are given in Hertz. Reaction progress was determined by thin layer chromatography on 0.25-mm silica gel plates (Merck, Germany). Mass spectra were obtained using liquid chromatography/mass spectrometry with a HCT Ultra from Bruker Daltonics (Billerica, MA, USA) and were performed by electrospray ionization in positive or negative mode. The base peak of the MS spectrum was set to 100 (in percentage), and

the height of the other peaks was measured relative to the base peak. All reagents used in the present work were of analytical grade.

Experimental. 3-Acridin-9-ylmethyl-5-(5-bromo-1*H*-indol-3-ylmethylene)-thiazolidine-2,4-dione (LPSF/AA29 – **7a**)

C₂₆H₁₆BrN₃O₂S. mp: 298°C. Yield: 53.25%. CCD (*n*-hexane:ethyl acetate, 7:3) *R*_f 0.4. IR (potassium bromide (KBr), cm⁻¹): 3412 (N–H), 1732 (C=O), 1681 (C=O), 1595 (C=C), 1369 (C–N), 750 (C–H), 731 (C=C), 599 (C–Br). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 5.93 (s, 2H, N–CH₂), 7.35 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, Ar–H, *i* pos), 7.44 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, Ar–H, *h* pos), 7.68 (t, 2H, *J* = 15.6 Hz, *j* = 8.0 Hz, *c* pos), 7.8 (s, 1H, =CH), 7.86 (t, 2H, *J* = 15, 2 Hz, *j* = 8.4 Hz, *d* pos), 8.18 (m, 4H, *a*, *g*, *j* pos), 8.50 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, Acr–H, *b* pos). MS *m/z* [%]: 514 [(M + 1)⁺, 43.4], 516 [(M + 3)⁺, 47.1], 251 [100]. HRMS (ESI): calculated for C₂₆H₁₆BrN₃O₂S [M–H][–] 513.0147. Found 512.0026.

3-Acridin-9-ylmethyl-5-(3,4-bis-benzyloxy-benzylidene)-thiazolidine-2,4-dione (LPSF/AA35 – **7b**)

C₃₈H₂₈N₂O₄S. mp: 232°C. Yield: 54.44%. CCD (*n*-hexane:ethyl acetate, 7:3) *R*_f 0.38. IR (KBr, cm⁻¹): 1737 (C=O), 1667 (C=O), 1585 (C=C), 1381 (C–N), 1265 (C–O), 751 (C–H), 697 (C=C). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): 5.17 (s, 2H, O–CH₂), 5.21 (s, 2H, O–CH₂), 5.91 (s, 2H, N–CH₂), 7.15–7.22 (m, 3H, Ar–H), 7.27–7.45 (m, 10H, Ar–H), 7.67 (t, 2H, *J* = 12 Hz, *j* = 8, *c* pos), 7.84 (s, 1H, =CH), 7.86 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz, Acr–H, *d* pos), 8.18 (d, 1H, *J* = 8.79 Hz, Acr–H, *a* pos), 8.44 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, Acr–H, *b* pos). HRMS (ESI): calculated for C₃₈H₂₈N₂O₄S [M + H]⁺ 608.1770. Found 609.1856.

3-Acridin-9-ylmethyl-5-(4-piperidin-1-yl-benzylidene)-thiazolidine-2,4-dione (LPSF/AA36 – **7c**)

C₂₉H₂₅N₃O₂S. mp: 232–233°C. Yield: 39.93%. CCD (*n*-hexane:ethyl acetate, 7:3) *R*_f 0.33. IR (KBr, cm⁻¹): 1677 (C=O), 1576 (C=C), 1377 (C–N). ¹H NMR 400 MHz (δ ppm, DMSO-*d*₆) 1.57 (s, 6H, –CH₂, *j*, *k* pos), 3.36–3.37 (m, 4H, N–CH₂, *i* pos), 5.91 (s, 2H, N–CH₂, *c* pos), 6.99 (d, 2H, *J* = 9.2 Hz, *h* pos), 7.39 (d, 2H, *J* = 9.2 Hz, *g* pos), 7.63 (t, 2H, *J* = 14.4 Hz, *j* = 6.8 Hz, Acr–H, *c* pos), 7.79 (s, 1H, =CH, *f* pos), 7.85 (t, 2H, *J* = 14 Hz, *j* = 6.8 Hz, Acr–H, *d* pos), 8.18 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, Acr–H, *a* pos), 8.47 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, Acr–H, *b* pos). HRMS (ESI): calculated for C₂₉H₂₅N₃O₂S [M+H]⁺ 479.1667. Found 480.1710.

3-Acridin-9-ylmethyl-5-(4-morpholin-4-yl-benzylidene)-thiazolidine-2,4-dione (LPSF/AA-39 – **7d**)

$C_{28}H_{23}N_3O_3S$. mp: 243°C. Yield: 41.83%. CCD (*n*-hexane:ethyl acetate, 7:3) R_f 0.43. IR (KBr, cm^{-1}): 1731 (C=O), 1678 (C=O), 1585 (C=C), 1373 (C-N), 1122 (C-O), 753 (C-H). 1H NMR 400 MHz (δ ppm, DMSO- d_6) 3.26 (t, 4H, $J = 10$ Hz, $j = 4.8$ Hz, morpholin, i pos), 3.70 (t, 4H, $J = 9.6$ Hz, $j = 4.8$ Hz, morpholin, j pos), 5.90 (s, 2H, N-CH₂, e pos), 7.01 (d, 2H, $J = 9.2$ Hz, Ar-H, h pos), 7.42 (d, 2H, $J = 9.2$ Hz, Ar-H, g pos), 7.67 (t, 2H, $J = 15.6$ Hz, $j = 8.8$ Hz, Ar-H, c pos), 7.81 (s, 14, C=CH, f pos), 7.85 (t, 2H, $J = 15.2$ Hz, $j = 8.8$ Hz, Ar-H, d pos), 8.18 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, Ar-H, a pos), 8.47 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, Ar-H, b pos). HRMS (ESI): calculated for $C_{28}H_{23}N_3O_3S$ [M + H]⁺ 481.1460. Found 482.1512.

3-Acridin-9-ylmethyl-5-(4-pyridin-2-yl-benzylidene)-thiazolidine-2,4-dione (LPSE/AA-40 – 7e)

$C_{29}H_{19}N_3O_2S$. mp: 269°C. Yield: 55.63%. CCD (*n*-hexane:ethyl acetate, 7:3) R_f 0.26. IR (KBr, cm^{-1}): 1745 (C=O), 1685 (C=O), 1597 (C=C), 1373 (C-N), 752 (C-H). 1H NMR 400 MHz (δ ppm, DMSO- d_6) 5.92 (s, 2H, N-CH₂, e pos), 6.14 (s, 2H, O-CH₂, benzodioxole, j pos), 6.92–7.05 (m, 3H, Ar-H), 7.69 (t, 2H, $J = 15.2$ Hz, $j = 80$ Hz, Ar-H, c pos), 7.78 (s, 1H, C=CH, f pos), 8.36 (t, 2H, $J = 15.2$ Hz, $j = 8.0$ Hz, Ar-H, d pos), 8.18 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, Ar-H, a pos), 8.44 (d, 2H, $J = 9.2$ Hz, Ar-H, b pos). HRMS (ESI): calculated for $C_{29}H_{19}N_3O_2S$ [M + H]⁺ 473.1198. Found 474.0589.

3-Acridin-9-ylmethyl-5-benzol[1,3]dioxol-5-ylmethylene-thiazolidine-2,4-dione (LPSE/AA-41 – 7f)

$C_{25}H_{16}N_2O_4S$. mp: 252–253°C. Yield: 70.29%. CCD (*n*-hexane:ethyl acetate, 7:3) R_f 0.46. IR (KBr, cm^{-1}): 1737 (C=O), 1689 (C=O), 1614 (C=C), 1381 (C-N), 1244 (C-O), 1062 (C-O), 750 (C-H), 719 (C=C). 1H NMR 400 MHz (δ ppm, DMSO- d_6) 5.94 (s, 2H, N-CH₂), 7.39 (m, 1H, $J = 12$ Hz, Ar-H, k pos), 7.6 (t, 4H, $J = 12$ Hz, Ar-H, c, g pos), 7.88 (m, 3H, $J = 36$ Hz, Ar-H, d, j pos), 7.99 (s, 1H, =CH), 8.04 (d, 1H, 8 Hz, Ar-H, i pos), 8.19 (d, 1H, 8 Hz, Ar-H, a pos), 8.23 (d, 1H, 8 Hz, Ar-H, h pos), 8.47 (d, 2H, $J = 8$ Hz, Ar-H, b pos), 8.69 (d, 2H, $J = 8$ Hz, Ar-H, l pos). HRMS (ESI): calculated for $C_{25}H_{16}N_2O_4S$ [M + H]⁺ 440.0831. Found 441.0281.

3-Acridin-9-ylmethyl-5-(1-phenyl-1H-pyrazol-4-ylmethylene)-thiazolidine-2,4-dione (LPSE/AA-48 – 7g)

$C_{27}H_{18}N_4O_2S$. mp: 239–240°C. Yield: 69.05%. CCD (*n*-hexane:ethyl acetate, 7:3) R_f 0.5. IR (KBr, cm^{-1}): 1732 (C=O), 1678 (C=O), 1612 (C=C), 1373 (C-N), 1328 (C-N aromatic), 752 (C-H), 686 (C=C). 1H NMR 400 MHz (δ ppm, DMSO- d_6) 5.92 (s, 2H, -CH₂), 7.38 (t, 1H, $J = 16$ Hz, $j = 7.6$ Hz, Ar-H, k pos), 7.53

(t, 2N, $J = 16$ Hz, $j = 8$ Hz, Ar-H, j pos), 7.6 (t, 2H, $J = 16$ Hz, $j = 7.2$ Hz, Ar-H, i pos), 7.84–7.89 (m, SH, Ar-H, =CH, cdf pos), 8.09 (s, 1H, HC=N), 8.1 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, Ar-H, a pos), 8.46 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, Ar-H, b pos), 8.82 (s, 1H, =CH). HRMS (ESI): calculated for $C_{27}H_{18}N_4O_2S$ [M + H]⁺ 462.1150. Found 463.0565.

Biological

Cell culture conditions. The cytotoxicity of the compounds was tested against five human tumor cell lines: NG97 (glioblastoma), HepG2 (human hepatocarcinoma), T47D (human ductal carcinoma), Raji (Burkitt's lymphoma), and Jurkat (T-cell leukemia). All cell lineages were obtained from the Rio de Janeiro Tissue Cell Bank except for the NG97 cells that were kindly provide by Professor Roger Chammas (University of São Paulo). Cells were cultured in RPMI-1640 medium, supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine, 100 mg/mL streptomycin, and 100 U/mL penicillin at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

Cytotoxicity assay. The new derivatives were dissolved in DMSO and then diluted in culture medium to obtain final concentrations ranging from 1 μ M to 100 μ M. For all experiments, the cells were plated in 96-well plates (10⁴ cells/well). After 24 h, the compounds were added to each well and incubated for 72 h. Amsacrine (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) was used as a positive control, absence of compound as a negative, and DMSO (0.1%) as a vehicle control.

Neoplastic viability was quantitated and assayed using the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) method. After all treatments, 20 μ L of MTT solution (0.5 mg/mL) was added to each well and incubated for 3 h at 37°C. Formazan, the product of MTT reduction, was dissolved in 20% sodium dodecyl sulfate, and absorbance was measured using a multiplate reader (ELX 800; Biotek, Winooski, VT, USA). The compound effect was quantified as a percentage of the control absorbance of the reduced dye in the 0.1% DMSO-treated group at 570 nm. Then it was calculated half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) from the percentage of viable cells.

Cytotoxicity against human peripheral blood mononuclear cells. Briefly, heparinized blood was diluted in an

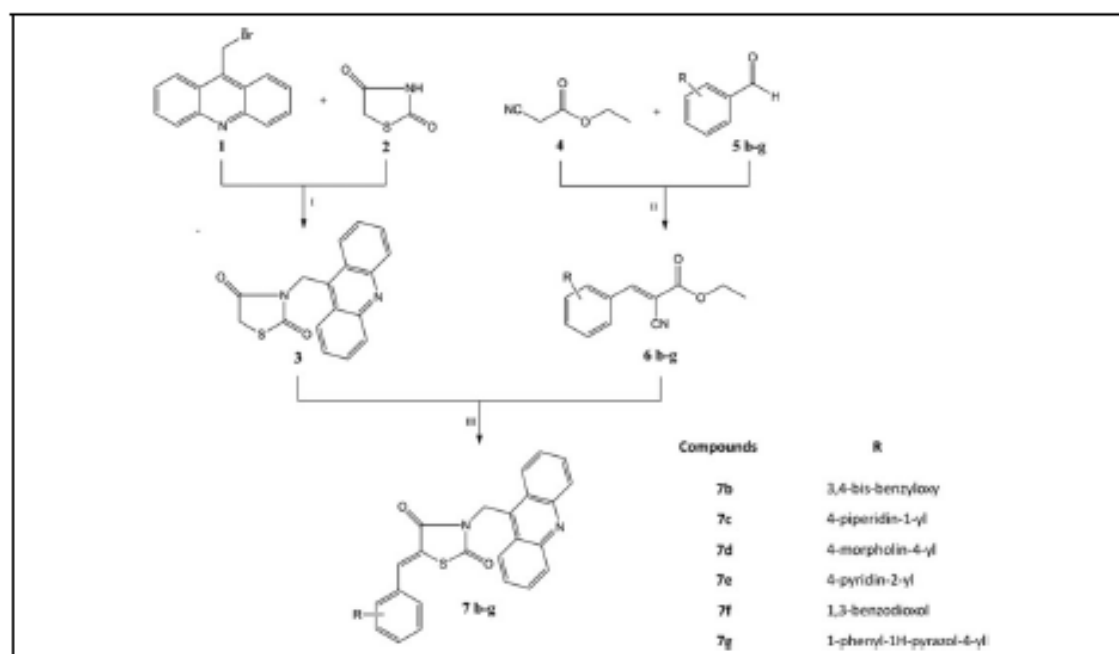


Figure 1. Synthesis diagram of the thiazacridine **7b-g** compounds. (I) Sodium hydroxide and ethanol, 60°C; (II) toluene and morpholine, 110°C; (III) ethanol and morpholine, 60°C.

equal volume of phosphate-buffered saline (PBS). Blood samples came from healthy, nonsmoking volunteers, who had not taken any drugs for at least 15 days prior to sample collection ($n = 15$). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by a standard method of density-gradient centrifugation over Ficoll Paque Plus (1.077 g/mL; GE, Sweden) and then cell counting was performed using 0.4% (w/v) trypan blue (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) exclusion.^{25,26} Cells were only used when viability was >98%. All donors signed an informed consent form for the study, which was approved by the Human Research Ethics Committee of the UFPE Health Sciences Center (CEP/CCS/UFPE-11006). Cells were plated in 96-well plates (10^6 cells/well). After 24 h, the compounds at 1–250 μ M were added and then incubated for 2 days (48 h); after this procedure, the steps outlined in the previous section were performed. The selectivity index (SI) was calculated as the ratio of IC_{50} normal cells/ IC_{50} cancer cells according to Islam et al.²⁷ Compounds with high selectivity have SI value >3.

Flow cytometry – Bromodeoxyuridine incorporation assay. Cells were plated (0.5×10^6 cells/well) in 6-well plates and incubated at 37°C for 24 h. Following this

period, the cells were treated with complete medium (blank), LPSF/AA29 (Raji, Jurkat, NG97, and T47D), LPSF/AA36 (HepG2), and amsacrine (all lineages) in concentrations previously determined by IC_{50} and then incubated for 48 h at 37°C. After treatment, analysis of the potential induction of cell death was performed using the Apo-BrdU kit (eBiosciences, San Diego, CA, USA), following the manufacturer's recommendations. At this stage, the cells were labeled with bromodeoxyuridine (BrdU) triphosphate nucleotides and incubated for 1 h at 37°C, followed by detection by staining with Fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-BrdU monoclonal antibody and then a solution of propidium iodide (PI) and RNase A. The percentage of BrdU-labeled cells was then analyzed by flow cytometry using an Accuri C6 (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) flow cytometer and data analysis was by means of the Accuri C6 software (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA).

Flow cytometry – PI staining for cell cycle analysis. Cells were plated (0.5×10^6 cells/well) in 6-well plates and treated as in previous section. After 24 h, cells were harvested and washed with PBS and fixed with ice-cold 70% EtOH overnight at -20°C.²⁸ Prior to

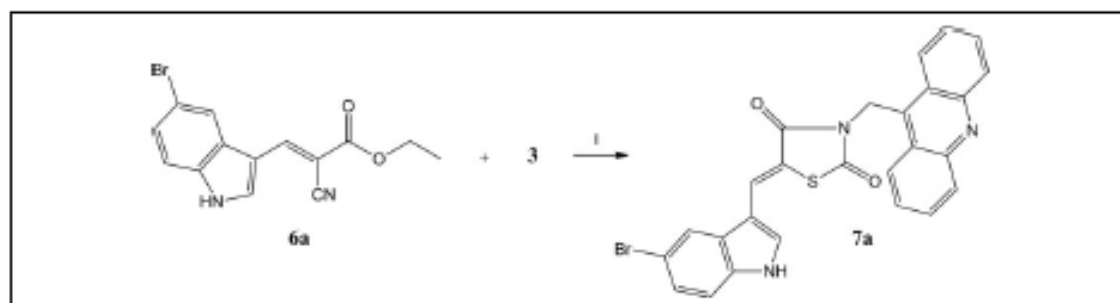


Figure 2. Synthesis diagram of thiazacridine derivative LPSF/AA29 – 7a. (I) Ethanol and morpholine, 60°C.

analysis, cells were incubated with PI (5 µg/mL)/RNase A (100 µg/mL) in PBS for 30 min on ice. Cellular DNA content was analyzed using an Accuri C6 (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) flow cytometer. The cell cycle profile was subsequently analyzed using the Accuri C6 software (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA).

Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate in three independent experiments. IC₅₀ values and 95% confidence intervals were obtained by nonlinear regression with the OriginPro program (version 8.0; OriginLab, Northampton, MA, USA). Statistical significance was tested with a two-tailed, unpaired Student's *t*-test in relation to the untreated or positive controls.

Results and discussion

Synthesis

Thiazacridine derivatives were prepared as shown in Figures 1 and 2. The compound 3-acridin-9-ylmethyl-thiazolidine-2,4-dione (LPSF/AA1A, 3) was synthesized by the *N*-alkylation reaction of thiazolidine-2,4-dione (2) with 9-bromomethyl-acridine (1) in the presence of sodium hydroxide using ethanol as a solvent. The mixture was stirred at 60°C for 7 h. In parallel, the synthesis of cyanoacrylate esters (LPSF/IP, 6a–g) was performed using Knoevenagel condensation with aromatic aldehydes (5a–g) and ethyl cyanoacetate (4) in toluene and in the presence of morpholine at 110°C. The Michael reaction of 3-acridin-9-ylmethyl-thiazolidine-2,4-dione, compound 3, with different cyanoacrylates, compounds 6a–g, was carried out in the presence of morpholine, with

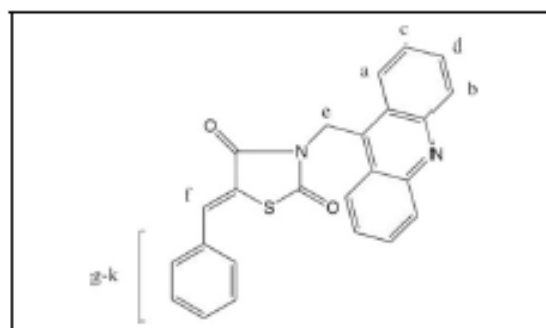


Figure 3. Hydrogen identification for ¹H NMR interpretation: thiazacridine nucleus (a–e), radicals attached to the position 5 of the thiazolidine nucleus (f–k). ¹H NMR: proton nuclear magnetic resonance.

ethanol as a solvent and heated at 60°C. The formation of the exocyclic double bond at position 5 of acridin-9-ylmethyl-thiazolidine-2,4-dione (LPSF/AA1A, 3) was the result of the action of the morpholine, which leads to the formation of a carbanion, leading to the new thiazacridine derivatives (LPSF/AAs, 7a–g). The presence of an arylidene proton peak in the ¹H NMR spectra of the compounds confirmed that the Michael reaction was successful (Figure 3). The identity of the compounds was confirmed by mass spectrometry in positive or negative mode, and the IR spectra of the compounds showed peaks characteristic of acridine and thiazolidine moiety.⁸

In vitro cytotoxic activity in tumor cells

The new thiazacridines synthesized, LPSF/AA29 – 7a, LPSF/AA35 – 7b, LPSF/AA36 – 7c, LPSF/AA39 – 7d, LPSF/AA40 – 7e, LPSF/AA41 – 7f, and LPSF/AA48 – 7g, exhibit cytotoxicity against all tested lineages, with IC₅₀ values ranging from

Table 1. Cytotoxicity of new derivatives on various human tumor cell lines and nontumor cells (PBMCs) – IC₅₀ (μM).^a

Compounds	Cell line					
	HepG2	Jurkat	NG97	Raji	T47D	PBMC
(LPSF/AA29 – 7a)	68.03	0.25	39.59	34.20	31.3	181.47
(LPSF/AA35 – 7b)	48.63	76.66	79.31	80.33	92.31	>250
(LPSF/AA36 – 7c)	46.95	86.79	81.34	68.31	73.14	>250
(LPSF/AA39 – 7d)	55.04	78.18	74.02	71.06	87.49	>250
(LPSF/AA40 – 7e)	87.67	82.24	80.13	86.40	86.42	>250
(LPSF/AA41 – 7f)	97.11	71.40	83.19	82.31	51.13	>250
(LPSF/AA48 – 7g)	65.20	68.26	69.34	71.41	67.11	>250
Amsacrine	1.51	1.1	0.245	4.15	22.87	3.7

PBMC: peripheral blood mononuclear cell.

^aResults are of three independent experiments (performed in triplicate) and expressed as mean values, showing a maximum variation of 10%.

0.25 μM to 97.11 μM. The compound LPSF/AA29 – 7a showed the best results in this screening with the lowest IC₅₀ values for all tested tumor cell lines, except HepG2. For this lineage, LPSF/AA36 – 7c showed the most cytotoxic activity. The potential effects of the new thiazacridine compounds on the viability of tumor cells are summarized in Table 1.

Based on the results, it is suggested that the addition of substituted 5-bromo-1*H*-indole to the thiazacridine core potentially contributed to the in vitro cytotoxic activity against the majority of lineages tested, compared with the other derivatives synthesized. A large number of compounds containing the indole nucleus have been evaluated in the last decade and have been shown to be active against several tumor cell lines. Examples of such cell lines include RH30 (rhabdomyosarcoma), MDA-MB 231 (breast cancer), PaCa-2 (pancreatic cancer cells), A549 (non-small-cell lung cancer), H460 (human lung cancer cells), HT-29 (human colorectal cancer cells), SMMC-7721 (human liver cancer cells), MCF-7 (breast cancer cells), IGR-OV-1 (ovary cancer cells), T47D (breast cancer cells), and CoLo-205 (colon cancer cells), among others.^{29–33} Additionally, the substituent 5-bromo-1*H*-indole, when added to phthalazine molecules, also showed good antitumor activity.³⁴ Su et al.³⁵ highlighted the presence of a bromide substituent in the indole ring that led to the increased anticancer activity against PLC5 cells of compounds derived from obatoxol. Thus, we can infer that bromine also contributes to the toxic effect of the molecule. Although the compounds LPSF/AA36 – 7c, LPSF/AA39 – 7d, and LPSF/AA40 – 7e are the most

Table 2. Selectivity index of new thiazacridine agents and amsacrine.

Compounds	Cell line				
	HepG2	Jurkat	NG97	Raji	T47D
(LPSF/AA29 – 7a)	2.67	725.88	4.58	5.31	5.80
(LPSF/AA35 – 7b)	5.14	3.26	3.15	3.11	2.71
(LPSF/AA36 – 7c)	5.32	2.88	3.07	3.66	3.42
(LPSF/AA39 – 7d)	4.54	3.20	3.38	3.52	2.86
(LPSF/AA40 – 7e)	2.85	3.04	3.12	2.89	2.89
(LPSF/AA41 – 7f)	2.57	3.50	3.01	3.04	4.89
(LPSF/AA48 – 7g)	3.83	3.66	3.61	3.50	3.73
Amsacrine	2.45	3.36	15.10	0.89	0.16

structurally similar compared to the other compounds synthesized, only 7c was shown to be a promising cytotoxic agent against the HepG2 line. The good activity of 7c can be explained by some structural factors, such as absence of oxygen in position 4 of the benzylidene ring and absence of resonance in the second ring (piperidine), when compared to 7d and 7e, respectively. Moreover, the piperidine nucleus is more basic than the pyridine nucleus, thus the nitrogen of piperidine is able to transfer its pair of electrons more easily, which therefore allows increased interaction with the biological receptor. Recently, it has been reported that *N*-containing heterocycles are considered especially “privileged” structures for the synthesis and development of new drugs.^{36,37}

Compounds 7b (bis-benzyloxy substituent), 7f (benzodioxole substituent), and 7g (phenylpyrazole substituent) were the second most active in HepG2, T47D, and Jurkat cell lines, respectively.

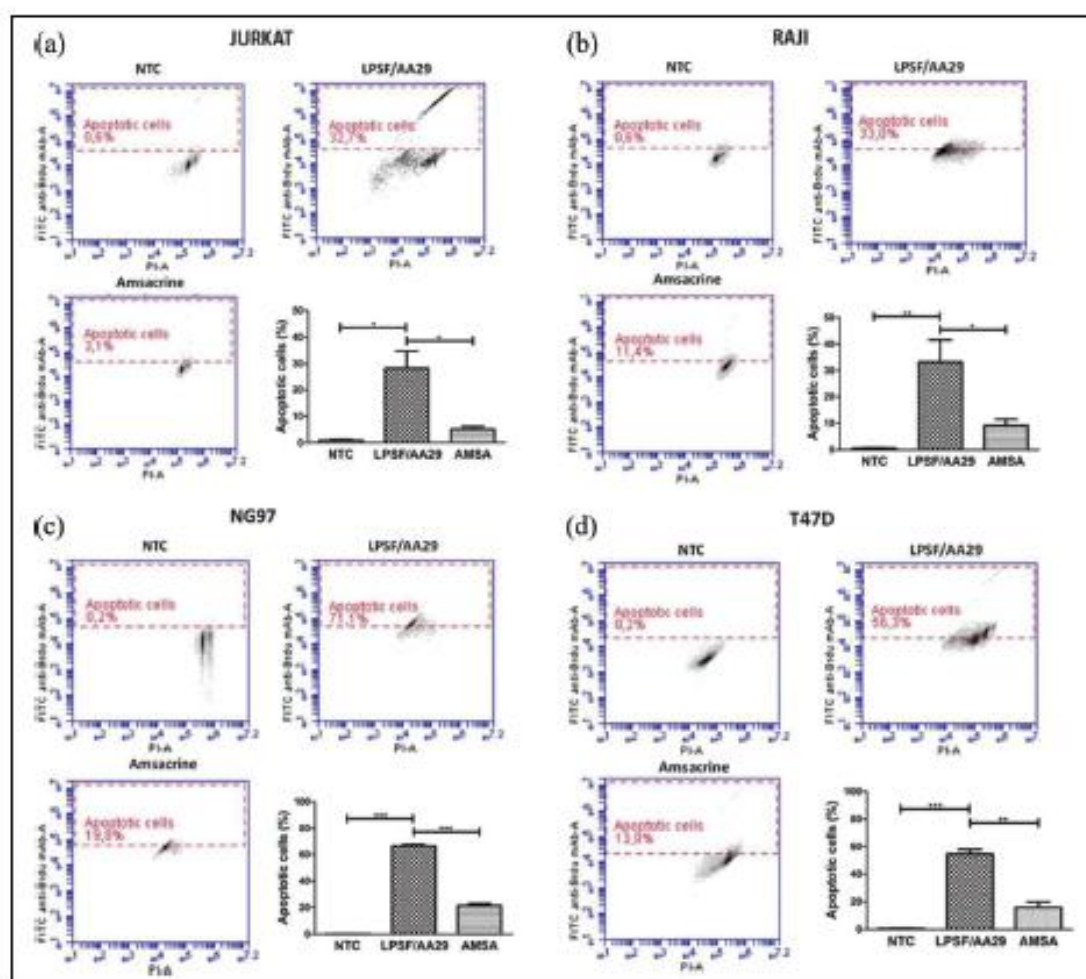


Figure 4. Analysis of the potential induction of apoptosis. (a) Jurkat cells – LPSF/AA29 versus NTC ($p = 0.0376$) and versus amsacrine ($p = 0.0268$). (b) Raji cells – LPSF/AA29 versus NTC ($p = 0.0025$) and versus amsacrine ($p = 0.0322$). (c) NG97 cells – LPSF/AA29 versus NTC ($p = 0.0002$) and versus amsacrine ($p = 0.0010$). (d) T47D cells – LPSF/AA29 versus NTC ($p < 0.0001$) and versus amsacrine ($p = 0.0014$). Values were expressed as percentage of apoptotic cells. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. NTC: nontreated cells.

In vitro cytotoxic activity in normal cells

In this study, the selective potential of these thiazidine derivatives was also evaluated. For this reason, nontumor cells were also exposed to treatment with the new compounds and with the positive control, amsacrine. It was found that the newly synthesized compounds showed IC_{50} values $>250 \mu M$, against PBMCs, except LPSF/AA29 – **7a** which exhibited $IC_{50} = 181.47 \mu M$. The IC_{50} value of the positive control amsacrine was $3.73 \mu M$ (Table 1).

As shown in Table 2, all the synthesized compounds showed higher SI for HepG2, Raji, and T47D, when compared with amsacrine. The agents LPSF/AA35 – **7b**, LPSF/AA39 – **7d**, LPSF/40 – **7e**, LPSF/AA41 – **7f**, and LPSF/AA48 – **7g** were selective for Jurkat; in addition, LPSF/AA29 – **7a** showed this lineage the highest SI in this study. While all the compounds have shown selectivity for NG97, with SI >3 , the amsacrine was more selective.

These results demonstrate that this new series of compounds exhibit low cytotoxicity to nontumor

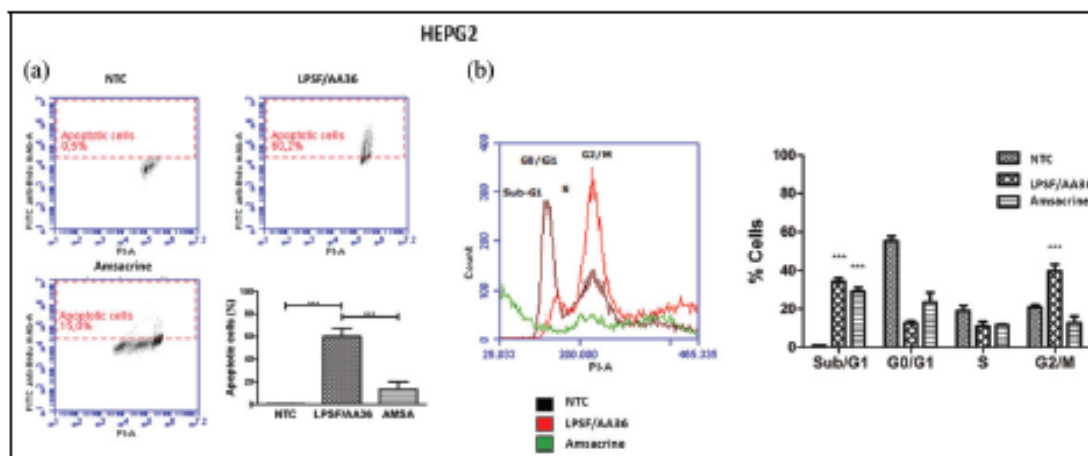


Figure 5. (a) Analysis of the potential induction of apoptosis: LPSF/AA36 versus NTC ($p < 0.0001$) and versus amsacrine ($p < 0.0001$). (b) The effect of LPSF/AA36 and amsacrine on the cell cycle: LPSF/AA36 – sub-G1 ($p < 0.0001$) and G2/M ($p = 0.0008$); amsacrine – sub-G1 ($p < 0.0001$). Values were expressed as percentage of apoptotic cells and cell distribution in each phase of the cycle. *** $p < 0.001$. NTC: nontreated cells.

cells, thus demonstrating their selective property. Poor selectivity of traditional chemotherapy is associated with considerable damages to normal cells, limiting their therapeutic effectiveness. Consequently, drugs with tumor-selective cytotoxicity without impairment of normal cell population are potent candidates for cancer treatment.^{38,39}

Effects of LPSF/AA29 and LPSF/AA36 on the induction of apoptosis

Once it was observed that the new thiazacridine derivatives induced cell death, LPSF/AA29 – 7a and LPSF/AA36 – 7c compounds were submitted to the assay of potential induction of death by flow cytometry. The cell lines Jurkat, Raji, NG97, and T47D were used as they are more sensitive to the derivative LPSF/AA29 – 7a, while HepG2 cells were used to evaluate LPSF/AA36 – 7c for the same reason. Amsacrine was used as a positive control for all lineages.

The results of the evaluation of the potential for inducing apoptosis showed that LPSF/AA29 – 7a and LPSF/AA36 – 7c derivatives significantly increased the percentage of apoptotic cells in all tested lineages, compared to untreated cells and cells treated with amsacrine (Figures 4 and 5(a)). The increase in induction of apoptosis in HepG2 cells by LPSF/AA36 – 7c was the most significant in this study, both compared to untreated cells ($p < 0.0001$) and those treated with amsacrine ($p < 0.0001$). The

LPSF/AA29 – 7a showed the greatest potential to induce apoptosis ($p < 0.0001$) in T47D when compared with untreated cells.

Resistance to cell death is one of the hallmarks of cancer and is a principal biological capability acquired during the multistep development of human tumors.⁴⁰ Consequently, understanding the mechanisms for induction of cell death could be useful in cancer treatment.⁴¹ Therefore, the synthesis and identification of potential agents that induce cell death, in particular apoptosis, have aroused the interest of the scientific community worldwide.^{25,42,43} However, a very common phenomenon of anticancer therapies is the induction of resistance to cell death, thus new molecular studies need to be conducted to better understand the action of LPSF/AA29 – 7a and LPSF/AA36 – 7c in the pathways that regulate apoptosis.

Effects of LPSF/AA29 – 7a and LPSF/AA36 – 7c on the cell cycle

The cell cycle is an event of great importance and its disorganization is related to the development of diseases such as cancer.⁴⁴ At this stage, the effects of LPSF/AA29 – 7a and LPSF/AA36 – 7c on the cell cycle were investigated. The choice for testing these compounds was the same for evaluating the potential induction of apoptosis, namely these compounds presented the best cytotoxicity results. The results showed that both compounds induced a significant

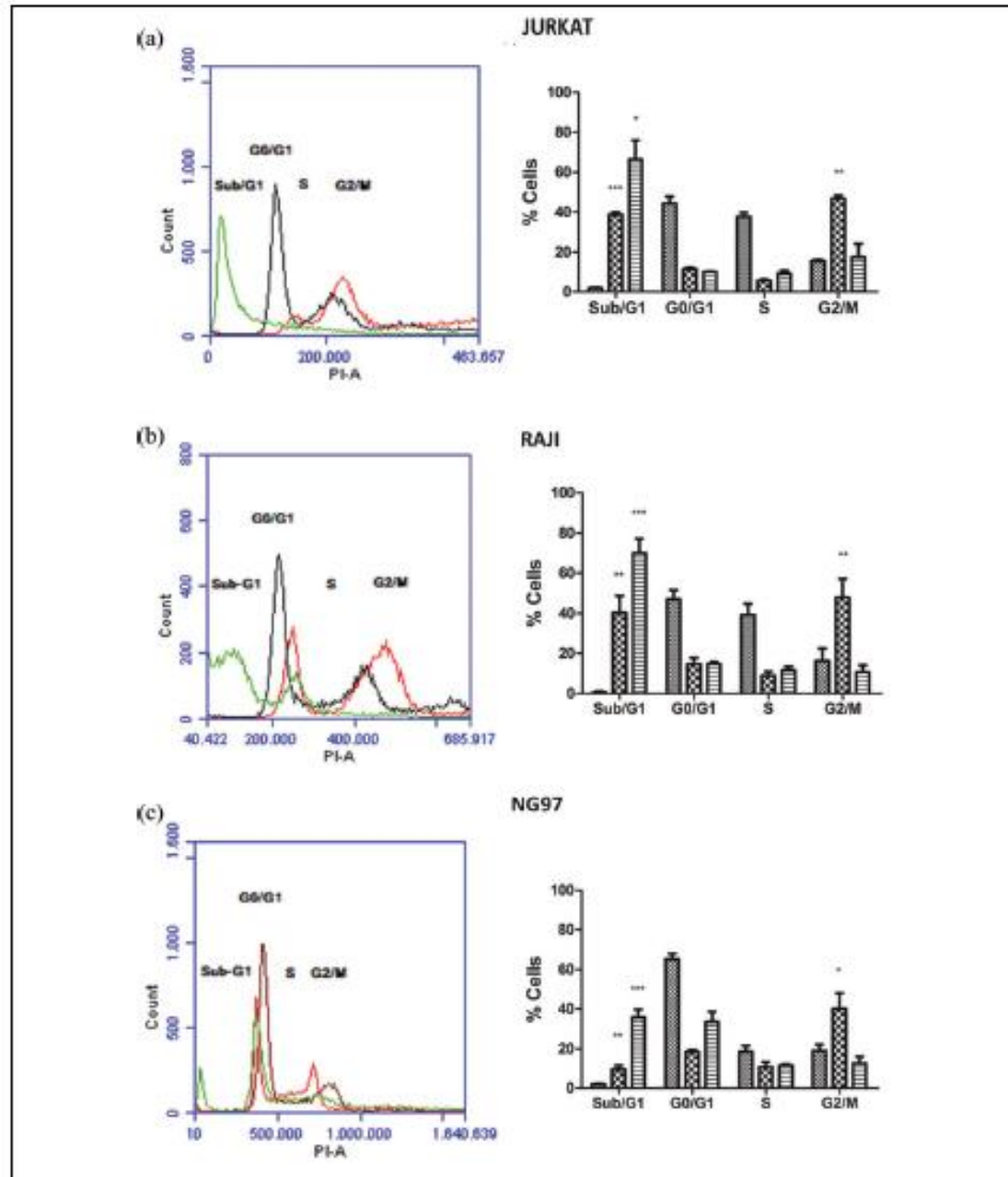


Figure 6. The effect of LPSF/AA29 and amsacrine on the cell cycle. (a) Jurkat cells – LPSF/AA29 – sub-G1 ($p = 0.0006$) and G2/M ($p = 0.0015$); amsacrine – sub-G1 ($p = 0.0105$). (b) Raji cells – LPSF/AA29 – sub-G1 ($p = 0.0012$) and G2/M ($p = 0.0078$); amsacrine – sub-G1 ($p = 0.0001$). (c) NG97 cells – LPSF/AA29 – sub-G1 ($p = 0.0023$) and G2/M ($p = 0.0126$); amsacrine – sub-G1 ($p < 0.0001$). (d) T47D cells – LPSF/AA29 – sub-G1 ($p = 0.0023$) and G2/M ($p < 0.0001$); amsacrine – sub-G1 ($p < 0.0001$). Values were expressed in percentage (%) of cell distribution in each phase of the cycle. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. NTC: nontreated cells.

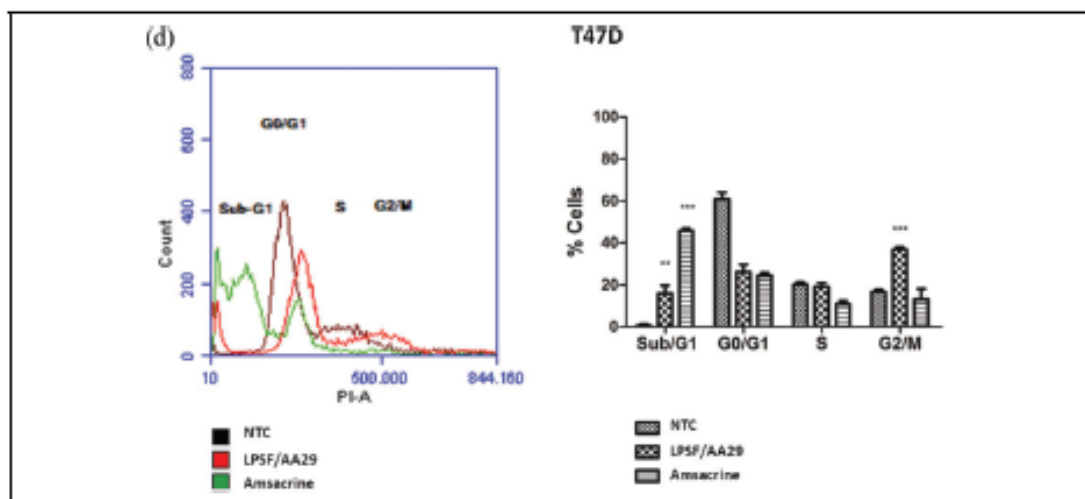


Figure 6. (continued).

increase in the percentage of cells in phases sub-G1 and G2/M compared to untreated cells (Figures 5(b) and 6). Amsacrine was shown to increase the percentage of cells in phase sub-G1 when compared to untreated cells ($p < 0.05$). The increase in sub-G1 peak after treatment with LPSF/AA29 – 7a, LPSF/AA36 – 7c, and amsacrine, measured by the subdiploid population, is considered to be an indicator of cell death,⁴⁵ which is consistent with the results of viability assay and induction of cell death assays. In relation to G2/M arrest, this result can be considered as a further delay in the cell cycle, so that the reorganization of various processes may occur at this stage, including the regulation of chromosome segregation and the attempt to resolve nonrepairable DNA damage.⁴⁶ Molecular studies have revealed that synthetic and natural compounds are capable of inducing G2/M cell cycle arrest and promote cell death by apoptosis, demonstrating that the stop cycle at this stage is also associated with cell death mechanisms.^{47,48} The importance of G2/M cell cycle arrest in the mediation of cell death can be exemplified by paclitaxel, one of the most commonly used drugs to treat breast and ovarian cancer, which acts specifically on this phase of the cycle, thereby inducing apoptosis.^{49,50}

Conclusion

In conclusion, a new series of thiazacridine derivatives was synthesized and had its physical and chemical characteristics defined. Moreover, in vitro studies

demonstrated that all compounds showed antiproliferative activity against various cancer cell lineages and exhibited more selectivity than the positive control, amsacrine. The compound LPSF/AA29 – 7a, which has the 5-bromo-1*H*-indole substituent, showed the greatest antiproliferative activity against Jurkat, Raji, T47D, and NG97 among all compounds. Against HepG2, the highest activity was shown by LPSF/AA36 – 7c, which has a piperidine nucleus. These results suggest a close structure–activity relationship between the compounds and lineages tested. The test results of induction of cell death and cell cycle progression have shown that LPSF/AA29 – 7a and LPSF/AA36 – 7c are potential inducers of apoptosis and significant inhibitors of cell cycle progression at the G2/M phase. In this way, LPSF/AA29 – 7a and LPSF/AA36 – 7c proved able to exert cytotoxic effects against the tested lineages. However, further studies are needed to define their effects in terms of molecular pathways. Therefore, new thiazacridine derivatives constitute promising antitumor agents because they are effective and less toxic and may contribute to the development of new cancer drugs in the future.

Acknowledgement

The authors would like to thank the Brazilian National Research Council (CNPq), the Research Foundation of Pernambuco State (FACEPE), National Institute for Science and Technology in Pharmaceutical Innovation (INCT-if), and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for student fellowships.

Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This study was supported by the Brazilian National Research Council (CNPq), the Research Foundation of Pernambuco State (FACEPE), National Institute for Science and Technology in Pharmaceutical Innovation (INCT-if), and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

References

- Ghosh R, Bhowmik S, Bagchi A, et al. Chemotherapeutic potential of 9-phenyl acridine: biophysical studies on its binding to DNA. *Eur Biophys J* 2010; 39: 1243–1249.
- Almeida VL, Leitão A, Reina LCB, et al. Cancer and cell cycle-specific and cell cycle-nonspecific anticancer DNA-interactive agents: an introduction. *Química nova* 2005; 28: 118–129.
- Sondhi SM, Bhattacharjee G, Jameel RK, et al. Anti-inflammatory, analgesic and kinase inhibition activities of some acridine derivatives. *Cent European Sci J* 2004; 2: 1–15.
- Csuk R, Barthel A, Brezesinski T, et al. Synthesis of dimeric acridine derived antivirals. *Bioorg Med Chem Lett* 2004; 14: 4983–4985.
- Patel MM, Mali MD and Patel SK. Bernthsen synthesis, antimicrobial activities and cytotoxicity of acridine derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 2010; 20: 6324–6326.
- Villa V, Tonelli M, Thellung S, et al. Efficacy of novel acridine derivatives in the inhibition of hPrP90-231 prion protein fragment toxicity. *Neurotox Res* 2011; 19: 556–574.
- Sondhi SM, Singh J, Rani R, et al. Synthesis, anti-inflammatory and anticancer activity evaluation of some novel acridine derivatives. *Eur J Med Chem* 2010; 45: 555–563.
- Rocha Pitta MG, Souza ÉS, Barros FWA, et al. Synthesis and in vitro anticancer activity of novel thiazacridine derivatives. *Med Chem Res* 2012; 22: 2421–2429.
- Lang X, Li L, Chen Y, et al. Novel synthetic acridine derivatives as potent DNA-binding and apoptosis-inducing antitumor agents. *Bioorg Med Chem* 2013; 21: 4170–4177.
- Denny WA. Acridine derivatives as chemotherapeutic agents. *Curr Med Chem* 2002; 9: 1655–1665.
- Belmont P, Bosson J, Godet T, et al. Acridine and acridone derivatives, anticancer properties and synthetic methods: where are we now? *Anticancer Agents Med Chem* 2007; 7: 139–169.
- Li B, Gao CM, Sun QS, et al. Novel synthetic acridine-based derivatives as topoisomerase I inhibitors. *Chin Chem Lett* 2014; 25: 1021–1024.
- Sánchez I, Reches R, Caignard DH, et al. Synthesis and biological evaluation of modified acridines: the effect of N- and O-substituent in the nitrogenated ring on antitumor activity. *Eur J Med Chem* 2006; 41: 340–352.
- Ketron AC, Denny WA, Graves DE, et al. Amsacrine as a topoisomerase II poison: importance of drug-DNA interactions. *Biochemistry* 2012; 51: 1730–1739.
- Barros FW, Silva TG, da Rocha Pitta MG, et al. Synthesis and cytotoxic activity of new acridine-thiazolidine derivatives. *Bioorg Med Chem* 2012; 20: 3533–3539.
- Davis SN. Insulin, oral hypoglycemic agents, and the pharmacology of the endocrine pancreas. In: Brunton LL, Lazo JS and Parker KL (eds) *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGraw-Hill, 2006, pp. 1613–1645.
- Spiegelman BM. PPAR- γ : adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 1998; 47: 507–514.
- DeFronzo RA, Bergenstal RM, Cefalu WT, et al. Efficacy of inhaled insulin in patients with type 2 diabetes not controlled with diet and exercise: a 12-week, randomized, comparative trial. *Diabetes Care* 2005; 28: 1922–1928.
- Han S and Roman J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma: a novel target for cancer therapeutics? *Anticancer Drugs* 2007; 18: 237–244.
- Ban JO, Kwak DH, Oh JH, et al. Suppression of NF- κ B and GSK-3 β is involved in colon cancer cell growth inhibition by the PPAR agonist troglitazone. *Chem Biol Interact* 2010; 188: 75–85.
- Bolden A, Bernard L, Jones D, et al. The PPAR γ agonist troglitazone regulates Erk 1/2 phosphorylation via a PPAR γ -independent, MEK-dependent pathway in human prostate cancer cells. *PPAR Res* 2012; 2012: 929052.
- Palakurthi SS, Aktas H, Grubisich LM, et al. Anticancer effects of thiazolidinediones are independent of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and mediated by inhibition of translation initiation. *Cancer Res* 2001; 61: 6213–6218.
- Abe A, Kiriya Y, Hirano M, et al. Troglitazone suppresses cell growth of KU812 cells independently of PPAR γ . *Eur J Pharmacol* 2002; 436: 7–13.

24. Rêgo MJB, Galdino-Pita MR, Pereira DTM, et al. Synthesis, in vitro anticancer activity and in silico study of new disubstituted thiazolidinedione derivatives. *Med Chem Res* 2014; 23: 3220–3226.
25. Okumura T. Mechanisms by which thiazolidinediones induce anti-cancer effects in cancers in digestive organs. *J Gastroenterol* 2010; 45: 1097–1102.
26. Roland K, Kestemont P, Hénuset L, et al. Proteomic responses of peripheral blood mononuclear cells in the European eel (*Anguilla anguilla*) after perfluorooctane sulfonate exposure. *Aquat Toxicol* 2013; 128–129: 43–52.
27. Islam A, Rodrigues BL, Marzano IM, et al. Cytotoxicity and apoptotic activity of novel organobismuth(V) and organoantimony(V) complexes in different cancer cell lines. *Eur J Med Chem* 2016; 109: 254–267.
28. Solhaug A, Holme JA, Haglund K, et al. Alternariol induces abnormal nuclear morphology and cell cycle arrest in murine RAW 264.7 macrophages. *Toxicol Lett* 2013; 219: 8–17.
29. Ding H, Zhang C, Wu X, et al. Novel indole alpha-methylene-gamma-lactones as potent inhibitors for AKT-mTOR signaling pathway kinases. *Bioorg Med Chem Lett* 2005; 15: 4799–4802.
30. Kaufmann D, Pojarová M, Vogel S, et al. Antimitotic activities of 2-phenylindole-3-carbaldehydes in human breast cancer cells. *Bioorg Med Chem* 2007; 15: 5122–5136.
31. Kumar D, Kumar NM, Akamatsu K, et al. Synthesis and biological evaluation of indolyl chalcones as anti-tumor agents. *Bioorg Med Chem Lett* 2010; 20: 3916–3919.
32. Zhang F, Zhao Y, Sun L, et al. Synthesis and anti-tumor activity of 2-amino-3-cyano-6-(1H-indol-3-yl)-4-phenylpyridine derivatives in vitro. *Eur J Med Chem* 2011; 46: 3149–3157.
33. Kamal A, Srikanth YVV, Khan MNA, et al. Synthesis, anticancer activity and inhibition of tubulin polymerization of bisindole sulfonates. *Lett Drug Des Discov* 2012; 9: 242–250.
34. Haider N, Kabicher T, Käferböck J, et al. Synthesis and in-vitro antitumor activity of 1-[3-(indol-1-yl)prop-1-en-1-yl]phthalazines and related compounds. *Molecules* 2007; 12: 1900–1909.
35. Su JC, Chen KF, Chen WL, et al. Synthesis and biological activity of obatoclax derivatives as novel and potent SHP-1 agonists. *Eur J Med Chem* 2012; 56: 127–133.
36. Dabholkar VV and Ansari FY. Novel pyrimidine derivatives by sonication and traditional thermal methods. *Green Chem Lett Rev* 2012; 3: 245–248.
37. Elavarasan T, Bhakiraj DP and Gopalakrishnan M. Synthesis, spectral analysis, in vitro microbiological evaluation, and molecular docking studies of some novel 1-(1-aryl-1H-tetrazol-5-yl)-2-(piperidin-1-yl)ethanone derivatives. *ISRN Org Chem* 2014; 2014: 120173.
38. Tietze LF, Major F and Schuberth I. Antitumor agents: development of highly potent glycosidic duocarmycin analogues for selective cancer therapy. *Angew Chem Int Ed* 2006; 45: 6574–6577.
39. Chen KC, Schmuck K, Tietze LF, et al. Selective cancer therapy by extracellular activation of a highly potent glycosidic duocarmycin analogue. *Mol Pharm* 2013; 10: 1773–1782.
40. Hanahan D and Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646–674.
41. Amaravadi RK and Thompson CB. The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 7271–7279.
42. De P, Baltas M, Lamoral-Theys D, et al. Synthesis and anticancer activity evaluation of 2(4-alkoxyphenyl)cyclopropyl hydrazides and triazolo phthalazines. *Bioorg Med Chem* 2010; 18: 2537–2548.
43. Jin F, Zhang N, Tan C, et al. 2'-chloro-4'-aminoflavone derivatives selectively targeting hepatocarcinoma cells: convenient synthetic process, G2/M cell cycle arrest and apoptosis triggers. *Arch Pharm (Weinheim)* 2012; 345: 525–534.
44. Malumbres M and Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 153–166.
45. Queiroz MJ, Peixoto D, Calhella RC, et al. New di(hetero)arylethers and di(hetero)arylamines in the thieno[3,2-b]pyridine series: synthesis, growth inhibitory activity on human tumor cell lines and non-tumor cells, effects on cell cycle and on programmed cell death. *Eur J Med Chem* 2013; 69: 855–862.
46. Foster I. Cancer: a cell cycle defect. *Radiography* 2008; 14: 144–149.
47. Lee YB, Gong YD, Yoon H, et al. Synthesis and anticancer activity of new 1-[(5 or 6-substituted 2-alkoxyquinoxalin-3-yl)aminocarbonyl]-4-(hetero)arylpiperazine derivatives. *Bioorg Med Chem* 2010; 18: 7966–7974.
48. Liu Y, Wang W, Fang B, et al. Anti-tumor effect of germacrone on human hepatoma cell lines through inducing G2/M cell cycle arrest and promoting apoptosis. *Eur J Pharmacol* 2013; 698: 95–102.
49. Gallagher BM. Microtubule-stabilizing natural products as promising cancer therapeutics. *Curr Med Chem* 2007; 14: 2959–2967.
50. Zhao F, Siu MK, Jiang L, et al. Overexpression of forkhead box protein M1 (FOXO1) in ovarian cancer correlates with poor patient survival and contributes to paclitaxel resistance. *PLOS ONE* 2014; 9: e113478.

5.2 Artigo 02

LPSF/AC-05, AN IMIDAZACRIDINE DERIVATIVE, INDUCES APOPTOSIS, CELL CYCLE ARREST AND TOPOISOMERASE II INHIBITION IN LEUKEMIA AND LYMPHOMA CELLS

Mardonny Bruno de Oliveira Chagas¹; Wanessa Layssa Batista de Sena¹; Valécia de Cássia Mendonça da Costa¹; Thuanny Maryna dos Santos¹; Maria do Carmo Alves de Lima²; Marina Galdino da Rocha Pitta²; Ivan da Rocha Pitta^{1, 2}; Maira Galdino da Rocha Pitta¹; Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo¹.

1 - Laboratory for Immunomodulation and New Therapeutic Approaches, Federal University of Pernambuco (UFPE).

2 - Laboratory for Planning and Drug Synthesis, Federal University of Pernambuco (UFPE).

* Corresponding author:

Maira Galdino da Rocha Pitta

E-mail: mgrpitta@gmail.com

Phone: +55 (81) 99671-7788

Fax: +55 (81) 2125-8576

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

ABSTRACT

Cancer has become a major cause of morbidity and mortality worldwide. Most currently available treatments are associated to severe adverse effects and drug resistance, which stimulates the development of novel selective antineoplastic drugs. The present work describes the antitumor activity of the imidazacridine derivative 5-acridin-9-ylmethylidene-2-thioxoimidazolidin-4-one (LPSF/AC05). Cytotoxicity assays were performed in Peripheral Blood Mononuclear Cells and in six lymphoma and leukemia cell lines using MTT method. Changes in cell cycle progression and apoptosis detection were assessed by flow cytometry. Moreover, topoisomerase II inhibition activity assays were performed. LPSF/AC05 exhibited cytotoxicity in four of six cell lines tested, showing best results in Toledo, Jurkat and Raji cell lines (IC_{50} = 27.18, 31.04 and 33.36 μ M, respectively). The compound showed great selectivity, with no toxicity in normal human cells (IC_{50} >100 μ M; selectivity index higher than 3). Cell death was primarily induced by apoptosis in all cell lines. Treatment with LPSF/AC05 also induced cell cycle arrest in G0/G1 and Topoisomerase II inhibition. Taken together, these results suggest the potential of LPSF/AC05 for cancer therapy.

Keywords: cancer; therapeutic innovation; cytotoxicity.

1. Introduction

Cancer has become a major public health problem. According to the last Globocan, it is estimated approximately 14 million new cases and 8 million cancer-related deaths in 2012 and incidence rates continue to rise [1]. Cancer therapy represents a medicine field with major advances in the last few decades [2]. However, many current available treatments are associated with severe adverse effects or are transiently effective with subsequent emergence of drug resistance [3]. Thus, search for new drugs with high neoplastic potential and reduced side effects is still necessary.

Acridine derivatives represent a class of bioactive agents characterized by a planar polycyclic system containing three fused aromatic rings [4]. It was initially used in clinical as antimicrobial agents; however, since 1970s acridine-based agents are designed specifically for cancer treatment [5]. The ability to intercalate into DNA and inhibit topoisomerases activity is one of the main reasons for the wide usefulness of acridines as broadly active chemotherapeutic agents [6]. DNA topoisomerases are nuclear enzymes that play important roles in DNA metabolic processes, such as DNA replication, chromosome condensation and chromosome segregation [7]. Inhibition of topoisomerases is a therapeutic strategy used in cancer treatment; several currently approved chemotherapeutic drugs interfere in the action of topoisomerases [8].

Amsacrine (*m*-AMSA), a 9-anilinoacridine derivative, was introduced into clinical use in 1976 [9]. The FDA-approved drug is used in the treatment of Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma as well as against refractory acute lymphocytic and non-lymphocytic leukemias [10]. It was the first synthetic drug approved for clinical use capable to inhibit both isoforms of human type II topoisomerase (α and β) [11]. However, DNA lesions induced by Amsacrine are associated with the production of free radicals, which cause serious disturbances in cancer cells and also normal tissues [12].

Imidazacridine derivatives represent a new class of compounds obtained by coupling an acridine and an imidazolidine nucleus. 5-acridin-9-ylmethylidene-2-thioxoimidazolidin-4-one (LPSF/AC05), first synthesized by our group, is an imidazacridine capable to inhibit human topoisomerase I activity [4]. Here, we describe the antineoplastic effects *in vitro* of LPSF/AC05 in leukemia and lymphoma cells. Cytotoxicity assays were performed in Peripheral Blood Mononuclear Cells and in six cell lines. Apoptosis detection and cell cycle

progression assays by flow cytometry and topoisomerase II inhibition assays were performed in order to elucidate the mechanism of action by which LPSF/AC05 induces cell death.

2. Experimental

2.1 Chemistry. Imidazacridine derivative 5-acridin-9-ylmethylidene-2-thioxoimidazolidin-4-one (LPSF/AC05) was synthesized in Laboratory of Synthesis and Planning of Drug at the Federal University of Pernambuco (UFPE), as previously described in [4]. Figure 1 shows the chemical structure of LPSF/AC05. The compound was initially dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, USA).

2.2 Cell culture conditions. Human leukemia cell lines Jurkat (acute T cell leukemia), HL-60 (acute promyelocytic leukemia), K-562 (chronic myelogenous leukemia), CCRF-CEM (acute lymphoblastic leukemia) and lymphoma cell lines Raji (Burkitt's lymphoma) and Toledo (non-Hodgkin's B cell lymphoma) were obtained from Rio de Janeiro Cell Bank (BCRJ). Cells were cultured in RPMI-1640 medium (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco), 10 mM HEPES (Gibco), 200 U/mL streptomycin and penicillin (Gibco) and incubated in a humid atmosphere of 5% CO₂ at 37°C.

2.3 Cytotoxicity assay. Cells were plated at a density of 1×10^4 cells (100 μ L)/well in 96-well plates. After 24 hours, cells were treated with the compound LPSF/AC05 at different concentrations (1 to 75 μ M) for 72 hours at 37°C with 5% CO₂. Then, 20 μ L of (3-(4,5-dimethylthiazol-2-)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) were added in each well and, three hours later, 130 μ L of 20% SDS. The absorbance was measured 24 hours later using ELx808 Microplate Reader (Biotek, USA) at a wavelength of 570 nm. Non-treated cells were used as negative control, Amsacrine (Sigma-Aldrich, USA) was used as positive control and DMSO (0,1%) as vehicle control. Experiments were performed three independent times in triplicate.

2.4 Selectivity assay. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from whole blood of healthy volunteers (n=3). All donors signed a consent form and the study was approved by Human Research Ethics Committee from Federal University of Pernambuco (CEP/CCS/UFPE-11006). Cells isolation was made using a density-gradient method with Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare). At the end of the process, cell *pellet* was resuspended in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 10 mM HEPES and 200 U/mL streptomycin and penicillin. Cells were seeded in 96-well plates (5×10^5 cells per well)

and treated with LPSF/AC05 (1-100 μ M) for 48 hours. After incubation, steps were performed as previously described in item 2.3. Selectivity index (SI) was calculated according to Islam et al (2016). Compounds with high selectivity have SI value > 3 [13].

2.5 Apoptosis detection assay. Cell apoptosis assays were performed in Jurkat, Raji, CCRF-CEM and Toledo cell lines using Apo-BrdU Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences, USA) according to manufacturer's instructions. Cells were seeded in 6-well plates (5×10^5 cells/well), incubated overnight and then treated with LPSF/AC05 at their respective IC_{50} concentrations for 48 hours. Cells without treatment and treated with Amsacrine were used as controls. After incubation, cells were collected and washed twice with wash buffer and resuspended in DNA Labeling Solution for 1 h at 37 °C. Subsequently, cells were washed twice with rinse buffer, resuspended in Antibody Solution and placed in the dark for 30 min. Then, PI/RNaseA solution was added for 15 min at room temperature in the dark. Samples were analyzed by BD Accuri™ C6 flow cytometry (BD Biosciences, USA). Three experiments were performed in duplicate.

2.6 Cell cycle progression assay. Neoplastic cells were seeded in 6-well plates (5×10^5 cells per well) and treated as previously described in item 2.5. After 48 hours of incubation, cells were washed with PBS and fixed with 70% ethanol overnight at -20°C. Before the analysis, cells were incubated with PI (5 μ g/mL)/RNase A (100 μ g/mL) for 30 minutes in the dark. Cells were analyzed using BD Accuri™ C6 flow cytometry (BD Biosciences, USA). Two experiments were performed in duplicate.

2.7 Topoisomerase II inhibition assay. Inhibitory effects of LPSF/AC05 on topoisomerase II were measured using Human Topoisomerase II assay kit (TopoGEN, USA). Supercoiled plasmid DNA pOHT-1 was incubated with human topo II (5 units) in the presence or absence of LPSF/AC05 (50 and 100 μ M). DMSO (0,2%) was used as vehicle control and etoposide (50 μ M) as positive control. Agarose gel (1%) electrophoresis was performed in Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer at 2V/cm for 50 minutes. Gels were stained with 0,5 μ g/mL ethidium bromide for 15 minutes after run and photographed under UV light. Quantitative analysis of gel bands was performed using ImageJ program (Version 1.49). Two experiments were performed.

2.8 Statistical analysis. IC_{50} values and their 95% confidence intervals were obtained by nonlinear regression with OriginPro program (Version 8.0). Statistical analysis was performed

using a two-tailed unpaired Student's t-test and differences were considered significant when $p < 0,05$.

3. Results and discussion

3.1 Selectivity and cytotoxicity assays

As shown in Table 1, cytotoxicity assays performed in neoplastic cells showed best results of LPSF/AC05 in Toledo (non-Hodgkin's B cell lymphoma), Jurkat (acute T cell leukemia) and Raji (Burkitt's lymphoma) cell lines (IC_{50} = 27.18, 31.04 and 33.36 μ M, respectively). LPSF/AC05 showed no toxicity against HL-60 and K-562 cells ($IC_{50} > 75 \mu$ M).

No significant toxicity of imidazacridine derivative LPSF/AC05 in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) was observed ($IC_{50} > 100 \mu$ M). Amsacrine, used as reference drug, showed low IC_{50} value against non-tumor cells ($IC_{50} = 3,7 \mu$ M). LPSF/AC05 have SI values higher than 3 for Jurkat, Raji and Toledo cells, indicating its selectivity potential (Table 1). Poor selectivity of traditional chemotherapy is associated to considerable damages to normal cells, limiting their therapeutic effectiveness. Consequently, drugs with tumor-selective cytotoxicity without impairment of normal cell population are potent candidates for cancer treatment [14, 15].

3.2 Apoptosis detection and cell cycle analysis

Effects of LPSF/AC05 on apoptosis rates and cell cycle progression were evaluated by flow cytometry. Raji, Jurkat, Toledo and CCRF-CEM cells were exposed to 48 hours of treatment at the IC_{50} concentrations. Imidazacridine derivative LPSF/AC05 increased significantly the percentage of apoptotic cells in all cell lines tested when compared to non-treated cells and also when compared to Amsacrine ($p < 0,05$, Figure 2), indicating that apoptosis is probably a major cell death mechanism induced by LPSF/AC05. Apoptosis evasion is a hallmark of most and perhaps all types of cancer. This characteristic holds important implications for the development of novel types of antitumor therapy, since the restoration of the apoptotic defense mechanism can lead to substantial therapeutic benefit [16]. Although chemotherapeutic agents currently used in clinical have distinct primary intracellular targets, most drug-induced cytotoxicity converges to apoptosis [17].

Treatment with LPSF/AC05 also affects cell cycle progression. As shown in Figure 3B, percentage of cells in G0/G1 and S phase significantly increased after treatment when

compared to untreated control in Raji cells ($p=0.0076$ and 0.043 , respectively); treatment also significantly increased G0/G1 cells when compared to Amsacrine ($p=0.0382$). In Toledo cell line, LPSF/AC05 treatment significantly increased percentage of cells in G0/G1 phase ($p=0.0169$) and significantly reduced S and G2/M cells when compared to untreated control ($p=0.0481$ and 0.0189 , respectively; Figure 3C). These results suggest that LPSF/AC05 acts inhibiting tumor cell cycle progression by preventing G1 to S phase transition. Cancer cells are characterized by uncontrolled cell proliferation due to their ability to evade cell-cycle checkpoints [18]. G1 checkpoint prevents the replication of damaged DNA by blocking entry into S-phase and its alteration is a common feature of cancer cells [19]. Chemotherapeutic agents such as paclitaxel and vincristine shows the capacity to induce cell cycle arrest and its cytostatic effects are associated to cell death induction by apoptosis [20, 21].

3.3 Topoisomerase II activity

In order to evaluate LPSF/AC05 effects on DNA relaxation, supercoiled plasmid pOHT-1 was incubated with human topoisomerase II and compound in concentrations of 50 and 100 μM . Figure 4 shows topoisomerase II inhibitory activity of LPSF/AC05; treatment at 50 and 100 μM significantly reduced relaxed DNA levels when compared to control with DMSO 0,2% ($p=0.0168$ and 0.0127 , respectively). Topoisomerase II is an enzyme that makes transient double-strand breaks in DNA to allow a cell to manipulate its topology. Anticancer agents currently in clinical use, such as doxorubicin and etoposide, stimulate the topoisomerase II-cleavable complex, a transient configuration in which topoisomerase II is covalently attached to DNA. This causes the accumulation of cytotoxic nonreversible DNA double-strand breaks [22, 23]. As previously reported, LPSF/AC05 is also capable to inhibit topoisomerase I activity at 100 and 200 μM [4]. While the majority of topoisomerases inhibitors show selectivity against either type I or II, a small class of compounds can act against both enzymes [24]. LPSF/AC05 is capable to inhibit both topoisomerases, showing its potential as antineoplastic agent.

4. Conclusions

Imidazacridine derivative 5-acridin-9-ylmethylidene-2-thioxoimidazolidin-4-one (LPSF/AC05) showed no toxicity in normal human cells and cytotoxic effects in leukemia and lymphoma cells *in vitro*. Apoptosis induction, cell cycle arrest in G0/G1 phase and inhibition of topoisomerase II activity are mechanisms induced after treatment with LPSF/AC05. Therefore, the compound shows potential as a new candidate for cancer therapy.

5. Acknowledgments

We would like to thank the Brazilian National Research Council (CNPq), the Research Foundation of Pernambuco State (FACEPE), National Institute for Science and Technology in Pharmaceutical Innovation (INCT_if) and CAPES for student fellowships.

6. Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

7. References

1. World Health Organization (2014) World Cancer Report 2014. International Agency for Research in Cancer: Lyon, France.
2. Aliabadi A, Eghbalian E, Kiani A (2013) Synthesis and Evaluation of the Cytotoxicity of a Series of 1,3,4-Thiadiazole Based Compounds as Anticancer Agents. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 16: 1133-1138.
3. Ramos P, Bentires-Alj M (2014) Mechanism-based cancer therapy: resistance to therapy, therapy for resistance. *Oncogene*: 1-10.
4. Lafayette E A et al. (2013) Synthesis, DNA Binding and Topoisomerase I Inhibition Activity of Thiazacridine and Imidazacridine Derivatives. *Molecules*, 18: 15035-15050.
5. Denny W A (2002) Acridine Derivatives as Chemotherapeutic Agents. *Current Medicinal Chemistry*, 9: 1655-1665.
6. Gao C et al. (2015) Synthesis and biological evaluation of benzimidazole acridine derivatives as potential DNA-binding and apoptosis-inducing agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*.
7. Hande K R (2008) Topoisomerase II inhibitors. *Update on Cancer Therapeutics* 3: 13-26.
8. Thakur D S (2011) Topoisomerase II Inhibitors in Cancer Treatment. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*, 3(4): Jan-Mar.

9. Belmont P, Dorange I (2008) Acridine/acridone: a simple scaffold with a wide range of application in oncology. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 18(11).
10. Godbole A A et al. (2014) Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* topoisomerase I by m-AMSA, a eukaryotic type II topoisomerase poison. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 446: 916-920.
11. Barros F W A et al. (2013) Inhibition of DNA topoisomerase I activity and induction of apoptosis by thiazacridine derivatives. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 268: 37-46.
12. Belmont P, Bosson J, Godet T, Tiano M (2007) Acridine and Acridone Derivatives, Anticancer Properties and Synthetic Methods: Where Are We Now? *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 7: 139-169.
13. Islam A et al. (2016) Cytotoxicity and apoptotic activity of novel organobismuth(V) and organoantimony(V) complexes in different cancer cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 109: 254-267.
14. Tietze L F, Major F, Schuberth I (2006) Antitumor Agents: Development of Highly Potent Glycosidic Duocarmycin Analogues for Selective Cancer Therapy. *Angewandte Chemie International Edition*, 45: 6574-6577.
15. Chen K-C, Schmuck K, Tietze L F, Roffler S R (2013) Selective Cancer Therapy by Extracellular Activation of a Highly Potent Glycosidic Duocarmycin Analogue. *Molecular Pharmaceutics*, 10: 1773-1782.
16. Hanahan D, Weinberg R A (2000) The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100: 57-70.
17. Liu J (2001) Activation of apoptosis pathway by different classes of anticancer drugs. Faculty of Medicine, University of Ulm.
18. Baig S et al. (2016) Potential of apoptotic pathways-targeted cancer therapeutic research: Where do we stand? *Cell Death and Disease*, 7.
19. Chen T, Stephens P A, Middleton F K, Curtin N J (2012) Targeting the S and G2 checkpoint to treat cancer. *Drug Discovery*, 17(5/6).

20. Kurose H, Shibata M-A, Iinuma M, Otsuki Y (2012) Alterations in Cell Cycle and Induction of Apoptotic Cell Death in Breast Cancer Cells Treated with α -Mangostin Extracted from Mangosteen Pericarp. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2012.
21. Denkert C et al. (2003) Induction of G0/G1 cell cycle arrest in ovarian carcinoma cells by the anti-inflammatory drug NS-398, but not by COX-2-specific RNA interference. *Oncogene*, 22: 8653-8661.
22. Montecucco A, Zanetta F, Biamonti G (2015) Molecular mechanisms of Etoposide. *EXCLI Journal*, 14: 95-108.
23. Demeunynck M, Charmantray F, Martelli A (2001) Interest of Acridine Derivatives in the Anticancer Chemotherapy. *Current Pharmaceutical Design*, 7: 1703-1724.
24. Denny W A, Baguley B C (2003) Dual Topoisomerase I/II Inhibitors in Cancer Therapy. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 3(3): 339-353.

Table 1. IC₅₀ values (μM) and selectivity index (SI) of LPSF/AC05 compound in PBMC, leukemia and lymphoma cells.

	Jurkat	Raji	CCRF- CEM	Toledo	HL-60	K-562	PBMC
LPSF/AC05	31,04±11	33,36±2,04	54,94±9,2	27,18±1,54	>75±0	>75±0	>100±0
Amsacrine	1,1±0	0,3±0,2	1,84±1	0,5±0,6	1±0,5	0,9±0,2	3,7±0,1
SI _{LPSF/AC05*}	>3,22	>3	>1,82	>3,68	-	-	-

*SI = IC₅₀ normal cells/IC₅₀ tumor cells

Figure 1. Chemical structure of 5-acridin-9-ylmethylidene-2-thioxoimidazolidin-4-one (LPSF/AC05).

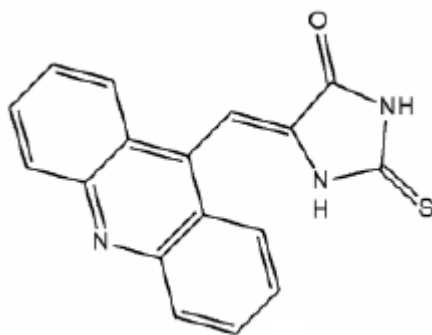


Figure 2. Effects of LPSF/AC05 on apoptotic cells rate after 48 hours of treatment in Raji (A), Jurkat (B), Toledo (C) and CCRF-CEM (D) cell lines. Percentage of apoptotic cells increased significantly in all cell lines after treatment when compared to untreated control and compared to Amsacrine (NTC = non-treated cells; Amsa = Amsacrine) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$

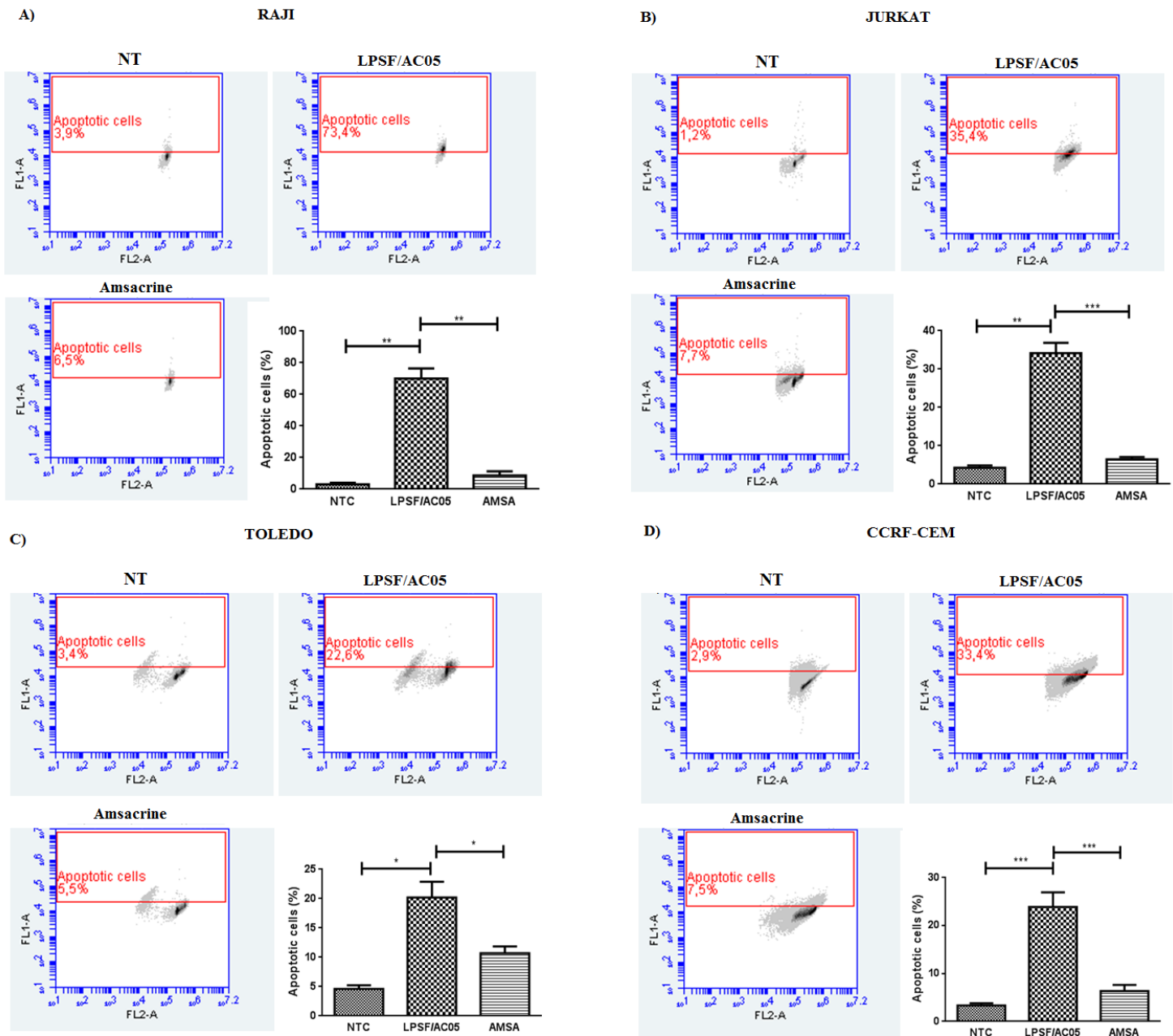


Figure 3. Effects of LPSF/AC05 on cell cycle progression of CCRF-CEM (A), Raji (B), Toledo (C) and Jurkat (D) cells after 48 hours of treatment. Percentage of cells in G0/G1 phase increased significantly in Raji and Toledo cell lines after treatment with LPSF/AC05 when compared to untreated control. (NTC = non-treated cells) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

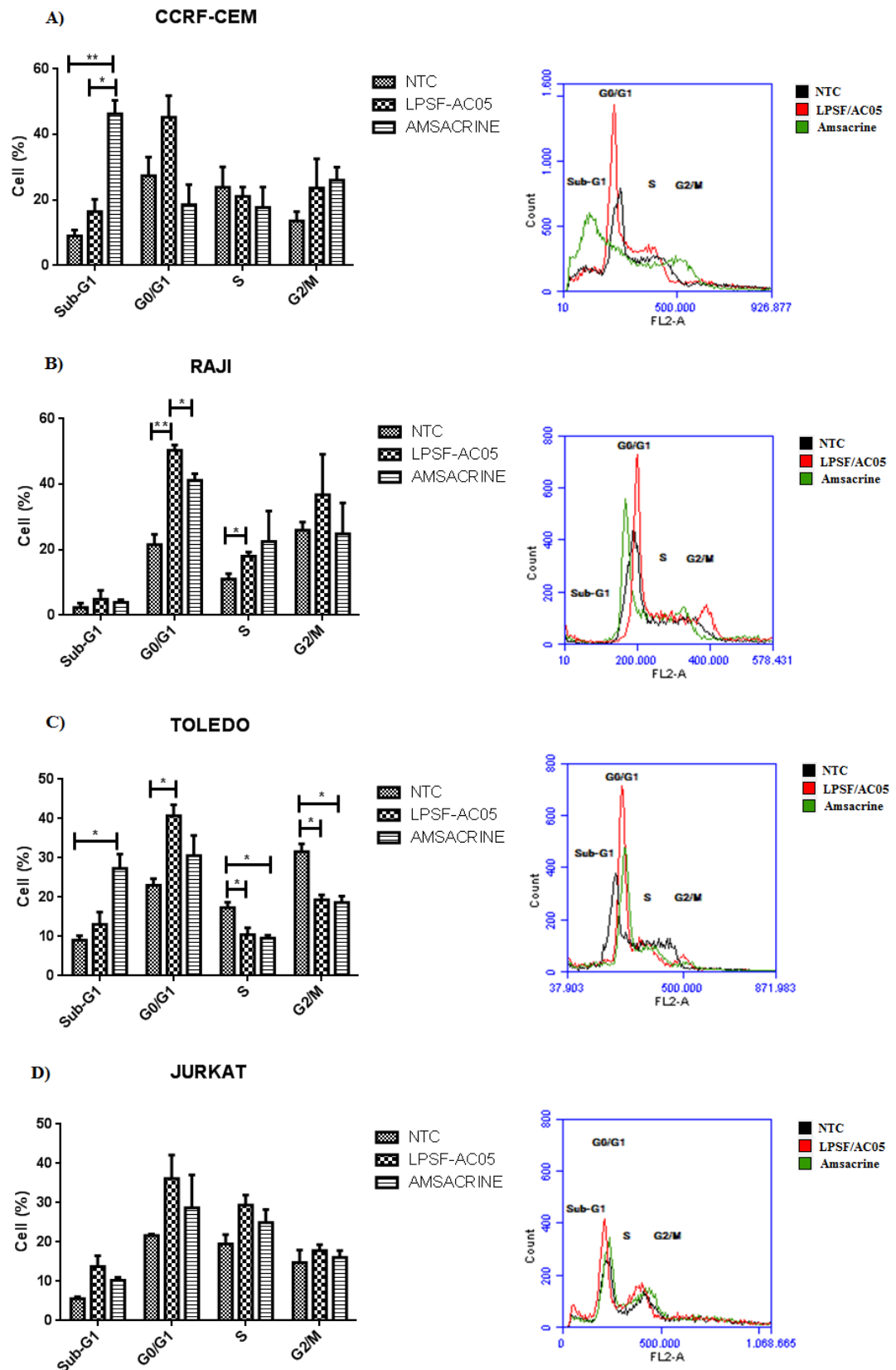
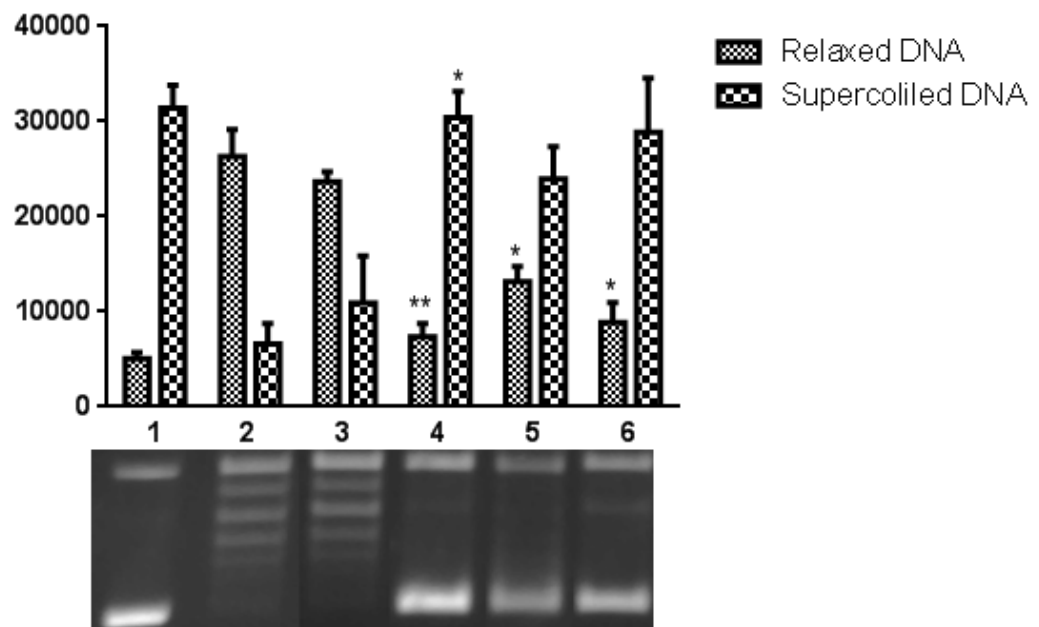


Figure 4. Semi quantitative analysis of LPSF/AC05 effects on pOHT-1 DNA plasmid relaxation by human topoisomerase II. LPSF/AC05 treatment significantly reduced relaxed DNA when compared to vehicle control (DMSO), indicating topoisomerase II inhibition. [1 - DNA pOHT-1; 2- DNA pOHT-1 + topo II; 3- DNA pOHT-1 + topo II + DMSO 0,2%; 4- DNA pOHT-1 + topo II + Etoposide 50 μ M; 5-6- DNA pOHT-1 + topo II + LPSF/AC05 50 and 100 μ M, respectively] *p<0,05, **p<0,01



5.3 Artigo 03

LPSF/AC05: A IMIDAZACRIDINE DERIVATIVE THAT SHOWS APOPTOSIS INDUCTION, CELL CYCLE ARREST AND INHIBITION OF CELL MIGRATION IN BREAST CANCER CELLS.

Mardonny Bruno de Oliveira Chagas¹; Wanessa Layssa Batista de Sena¹; Valécia de Cássia Mendonça da Costa¹; Maria do Carmo Alves de Lima²; Marina Galdino da Rocha Pitta²; Ivan da Rocha Pitta^{1,2}; Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo¹; Maira Galdino da Rocha Pitta¹.

1 - Laboratory for Immunomodulation and New Therapeutic Approaches, Federal University of Pernambuco (UFPE).

2 - Laboratory for Planning and Drug Synthesis, Federal University of Pernambuco (UFPE).

* Corresponding author:

Maira Galdino da Rocha Pitta

E-mail: mgrpitta@gmail.com

Phone: +55 (81) 99671-7788

Fax: +55 (81) 2125-8576

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

ABSTRACT

In female population, breast cancer is the most frequent type of cancer and has high mortality rates. Some currently chemotherapeutic agents are associated to side effects and low therapeutic index, justifying the search for new molecules with therapeutic potential. Thus, this work aimed to evaluate the antitumor activity of the imidazacridine derivative 5-acridin-9-ylmethylidene-2-thioxoimidazolidin-4-one (LPSF/AC05) in tumor breast cells. Cytotoxicity assays were performed in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC), non-tumor breast and tumor breast cell lines using MTT method. Changes in cell cycle progression and apoptosis were detected by flow cytometry. Scratch assays were performed in order to evaluate migration capability of cells after treatment. LPSF/AC05 exhibited cytotoxicity in two of three tumor breast cell lines, showing best result for triple-negative cell line MDA-MB-231 ($IC_{50} = 27.54 \mu M$). The compound showed no toxicity in PBMC ($IC_{50} > 100 \mu M$) and showed better selective potential when compared to doxorubicin. Treatment with LPSF/AC05 induced cell death by apoptosis in tumor cell lines, but not in non-tumor breast cells. Cell cycle arrest in G2/M phase was observed for MDA-MB-231 cells and inhibition of migration in MCF-7 cells after treatment. Taken together, these results suggest the potential of LPSF/AC05 for breast cancer therapy.

Keywords: acridina; cytotoxicity; imizadolidine; therapeutic innovation.

1. Introduction

The number of cancer cases has increased considerably worldwide, mainly from last century, and actually is one of the most important problems of global public health (Torre et al., 2015). Breast cancer is the most frequent type of cancer in female population and has high mortality rates (IARC, 2012). Many risk factors are associated to an increased number of cases, such as excessive use of alcohol and tobacco, obesity and lack of exercise (WHO, 2015). In addition to these factors, some conditions may predispose a woman to breast cancer such as early menarche and late menstruation, nulliparity, oral contraceptive, age and family history (WHO, 2015).

Nowadays many forms of treatment for breast cancer are explored, among them, surgery, radiation therapy, hormone therapy, immunotherapy and especially chemotherapy. Chemotherapy drugs commonly used include 5-fluorouracil, methotrexate, doxorubicin, cyclophosphamide and taxanes (paclitaxel and docetaxel) (Roché et al., 2006; Cancer Research UK, 2015). However, many chemotherapeutic agents are not selective and have a low therapeutic index, leading to dangerous side effects, including myelotoxicity and cardiotoxicity (Regulska et al, 2012; Lafayette et al, 2013). Additionally, the increased number of cases, mortality rate and drug resistance suggest the importance to improve current therapy and particularly for new therapeutic approaches for breast cancer (WHO, 2014).

Acridines represent a class of heterocyclic compounds widely used in the synthesis of several substances with biological activities, such as antimicrobial, antiparasitic and anti-tumor (Eiter et al, 2009; Jones et al, 2009; Chen et al., 2015). These molecules have the property to intercalate between DNA base pairs. Therefore, acridine and its analogues constitute efficient and promising anticancer agents (Almeida et al., 2005; Ghosh et al., 2010).

Imidazolidines and their analogues are constituted by a heterocyclic nucleus containing biologically active nitrogen atoms and exhibit many biological properties, including cytotoxicity against many tumor lines, including breast cancer (Janovec et al., 2011; Čížeková et al., 2014; Dar et al, 2015).

In order to evaluate new anti-cancer agents more effective and less toxic, the strategy adopted by our group was to use a bioactive molecule resulting of hybridization of an imidazolidine and an acridine nucleus. We propose to study the anticancer activity of imidazacridine agent 5-Acridin-9-ylmethylidene-2-thioxoimidazolidin-4-one (LPSF-AC05) and contribute to a better understanding anti breast cancer activity. This agent was subjected to cytotoxicity assays *in vitro* against normal and neoplastic breast cells lineages in order to

evaluate their antiproliferative and toxicity properties. Additionally, was investigated the role of this novel compound in cell cycle, induction of apoptotic death and migratory capacity.

2. Experimental

2.1 Obtaining the imidazacridine derivative

Imidazacridine derivative 5-acridin-9-ylmethylidene-2-thioxoimidazolidin-4-one (LPSF/AC05) (Figure 01) was synthesized in Laboratory for Planning and Drug Synthesis (LPSF) at Federal University of Pernambuco (UFPE), as previously described in Lafayette and collaborators (2013) for biological assays *in vitro* and initially dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, USA).

2.2 Maintenance of cell lines

Human breast neoplastic cell lines MCF-7, ductal carcinoma, positive for estrogen receptor- α (ER- α), progesterone receptor (PR) and negative human epidermal growth factor receptor 2 (Her2) - low potential metastatic; T47-D, invasive ductal carcinoma, positive for ER- α , PR and negative for (Her2) - intermediate potential metastatic; MDA-MB-231, mammary adenocarcinoma, triple-negative for (ER- α), (PR) and (Her2) - high potential metastatic; MCF-10A, non-tumoral breast cells. The cells lines were obtained from Rio de Janeiro Cell Bank (BCRJ). T47-D and MCF-7 were cultured in RPMI-1640 medium (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco), 10 mM HEPES (Gibco), 200 U/mL streptomycin and penicillin (Gibco). MDA-MB-231 cell line was cultured in Leybovitz (L-15) medium (Gibco), supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco), 10 mM HEPES (Gibco), 200 U/mL streptomycin and penicillin (Gibco). MCF-10A cell line was cultured in DMEN/F12 medium (Gibco), supplemented with 5% horse serum (Gibco), 20 ng/mL epidermal growth factor (EGF) (Sigma-Aldrich, USA), 0.5 μ g/ mL hydrocortisone (Sigma-Aldrich, USA), 10 μ g/mL insulin (Sigma-Aldrich, USA), 100 ng/mL of cholera toxin (Sigma-Aldrich, USA) and 1% streptomycin and penicillin (Gibco). During maintenance of the cells, trypsin (0.25%) and EDTA (1 mM) (Sigma-Aldrich, USA) were utilized. Cells were incubated in a humid atmosphere of 5% CO₂ (except MDA-MB-231) at 37 ° C.

2.3 Cytotoxicity assay - MTT

Breast cells were plated at a density of 1×10^4 cells (100 μ L)/well in 96-well plates. After 24 hours, cells were treated with LPSF/AC05 (1, 10, 50 and 75 μ M) dissolved in

DMSO for 72 hours, at 37°C with 5% CO₂ humidified atmosphere. Then, 20 µL of (3-(4,5-dimethylthiazol-2-)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) were added in each well and, three hours later, 130 µL of 20% SDS. The absorbance was measured 24 hours later using ELx808 Microplate Reader (Biotek, USA) at a wavelength of 570 nm. Non-treated cells were used as negative control, doxorubicin (Sigma-Aldrich, USA) was used as positive control and DMSO (0,1%) as vehicle control. Experiments were performed three independent times in triplicate.

2.4 Toxicity assay with peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from whole blood of healthy volunteers (n=3). All donors signed a consent form and the study was approved by Human Research Ethics Committee from Federal University of Pernambuco (CEP/CCS/UFPE N° 11.006). Cells isolation was made using a density-gradient method with Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare). At the end of the process, cell *pellet* was resuspended in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 10 mM HEPES and 200 U/mL streptomycin and penicillin. Cells were seeded in 96-well plates (5x10⁵ cells per well) and treated with LPSF/AC05 different concentrations (1, 10, 25, 75 and 100 µM) for 48 hours (Okumura, 2010). Doxorubicin was used as reference drug. Assays were performed by MTT method as described at item 2.3.

2.5 Apoptosis assay

Cells were plated (1 x 10⁶ cells/well) in 6-well plates and incubated at 37 °C for 24 h. Following this period, the cells were treated with complete medium (blank), LPSF/AC05 or doxorubicin in its IC₅₀ (concentration required to inhibit 50% of the cell viability) during 48h at 37 °C. After treatment, analysis of the potential induction of cell death was performed using Apo-BrdU kit (eBiosciences, USA). Cells were labeled with bromodeoxyuridine triphosphate nucleotides (Br-dUTP) and incubated for 1h at 37 °C, followed by detection with FITC-anti-BrdU monoclonal antibody and then a solution of iodide propidium and RNAase A. Percentage of BrdU-labeled cells was analyzed by flow cytometry using Accuri C6 (Becton, Dickinson and Company, USA) flow cytometer and data were analyzed using Accuri C6 software (Becton, Dickinson and Company, USA).

2.6 Cell cycle assay

Cells were plated (0.5×10^6 cells/well) in 6-well plates and treated as described at item 2.5. After 24 h, cells were harvested and washed with PBS and fixed with ice-cold 70% EtOH overnight at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Prior to analysis, cells were incubated with PI (Sigma-Aldrich, USA) (5 $\mu\text{g/ml}$) / RNase A (Sigma-Aldrich, USA) (100 $\mu\text{g/mL}$) in PBS for 30 min on ice. Cellular DNA content was analyzed using Accuri C6 flow cytometer.

2.7 In vitro scratch assay - migration cell

Cells were distributed in six-well plates at a density of 5×10^4 /well and incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in atmosphere of 5% CO_2 for 24 hours. After reaching the required confluence (100%), growth medium was aspirated and washed with PBS 1X. Then, two perpendicular marking lines (scratch) were made using a pipette P1000 (Valster et al., 2005). After that, cells were treated with complete medium (control), 0.1% DMSO and LPSF/AC05 at concentration previously determined by the IC_{50} , photographed in inverted microscope ($t = 0\text{h}$) and incubated for 48 hours ($t = 48\text{h}$). Data of migration assays were obtained from the analysis of the images using Image J software (NIH, USA) relative to percentage of non-treated cells.

2.8 Statistical analysis

Values of IC_{50} and their 95% confidence intervals were obtained by nonlinear regression with OriginPro program (Version 8.0). Statistical analysis were performed using a two-tailed unpaired Student's t-test and differences were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1 Cytotoxicity assay

Breast cancer is one of the main types of malignant tumors, with a large number of new cases each year and high rates of morbidity and mortality (Desantis et al., 2016). Moreover, breast cancer is a complex disease with different biological characteristics and clinical behavior (Yadav et al., 2015). All progress in the area has not been enough to overcome mechanism of escape and resistance put in place by the tumor cells (Zanardi et al., 2015). These data justify the search for new agents that can act in the treatment this type of cancer.

Cytotoxicity assays were performed using MTT method and it was possible to obtain IC_{50} concentrations when compared to control cells. LPSF/AC05 showed IC_{50} values between 27.54 to $>75\text{ }\mu\text{M}$ in breast cell lines tested (Table 1). In MDA-MB-231, a triple-negative cell line,

it was observed the lowest IC_{50} value for LPSF/AC05, while it was the highest value for doxorubicin when compared to others cell lines. Triple-negative breast cancer (TNBC) constitutes a heterogeneous subtype that represents 15-20% of all diagnosed breast cancer cases (Kalimutho et al., 2015). Patients with TNBC do not respond to hormone therapy; management of these tumors is a challenge because of its aggressive behavior, poor outcome and absence of targeted therapies (Yadav et al., 2015). New efficient therapies are, therefore, urgently needed.

LPSF/AC05 is the result of molecular hybridization of imidazolidine and acridine heterocyclic nucleus. Anticancer properties of acridines have been related to their planar aromatic structure that enables interaction with DNA, intercalating between DNA bases pairs (Ghosh et al., 2010). This important characteristic gives acridines the ability to interfere in the activity of topoisomerases, telomerases and protein kinases. These biomolecules act directly or indirectly in cell division process, through replication of the genetic material or maintenance and regulation of cell cycle (Demeunynck et al., 2001). Furthermore, imidazolidines and their derivatives have affinity with a large number of biological receptors related to inflammation, cell adhesion and proliferation factors involved in many cancers (Head and Mayorov, 2006).

In 2013, Lafayette and collaborators showed that LPSF/AC05 inhibits the action of topoisomerase I. Compounds capable to interfere in the action of topoisomerase enzymes are known as "topoisomerase poisons"; they form a complex ternary drug-DNA-enzyme, leading to successive breaks in DNA structure and destruction of neoplastic cells (Belmont et al., 2007). These characteristics may contribute to the understanding of the cytotoxic role LPSF/AC05 in breast cell lines tested.

In T47-D cells, LPSF/AC05 showed no cytotoxicity ($IC_{50} > 75 \mu M$). Cytotoxic activity of LPSF/AC05 in MDA-MB-231, MCF-7 and MCF-10A and inactivity in T47-D shows a cell-compound specific relationship which can occur between cells line from the same tissue (Pozo-stew et al., 2002).

When compared to doxorubicin, one of the most widely used agents in clinical for treatment of breast cancer, LPSF/AC05 was less toxic against non-tumor breast cell line MCF-10A. Although LPSF/AC05 showed an IC_{50} value of $28.53 \mu M$, it was still 30 times less toxic than doxorubicin (Table 1). Doxorubicin is a member of anthracycline antineoplastic drugs and is used as first-line agent for the treatment of various solid tumors; however, it has high toxicity. Liposomal doxorubicin is currently used in clinical in order to decrease the

cytotoxicity of doxorubicin, but is still associated to side effects and far from a real safe dose (Papagiannaros et al., 2006; Mohammadi et al., 2015).

We also evaluate the toxicity of LPSF/AC05 and the reference drug, doxorubicin, in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy volunteers. It was found that LPSF/AC05 and doxorubicin showed IC_{50} values of >100 and $7,2 \mu M$, respectively, or 13 times less toxic than doxorubicin (Table 1). According to Valeri and collaborators (2010), important factors in any potential new anticancer drugs are effectiveness and low cytotoxicity.

3.2 Effects of LPSF/AC05 in apoptosis induction

In order to elucidate the mechanism of action by which LPSF/AC05 induces cell death, apoptosis detection assays were performed by flow cytometry. MDA-MB-231, MCF-7 and MCF-10A were treated with LPSF/AC05 or doxorubicin at their respective IC_{50} concentration. Percentage of apoptotic cells significantly increased after treatment with LPSF/AC05 in MDA-MB-231 and MCF-7 when compared to untreated cells ($p=0,0002$ and $0,0018$, respectively) and also compared to doxorubicin ($p=0,001$ and $0,0025$, respectively) (Figure 2A and 2B). LPSF/AC05 did not significantly increased the percent of non-tumor breast cells MCF-10A, whereas doxorubicin showed significantly increased of apoptotic cells when compared to untreated cells ($p=0,0113$) and compared to LPSF/AC05 treatment ($p=0,0160$) (Figure 2C).

Resistance to cell death is one of the hallmarks of cancer by the apoptotic evasion, a biological ability acquired during the various stages of the development of human tumors (Hanahan and Weinberg, 2011). The promotion of apoptosis is revealed as important strategy for elimination of cells that mechanism of death was deregulated (Fesik, 2005). Moreover, the induction of death by apoptosis has no inflammatory responses in corresponding tissue, consisting a minimal process aggression to vicinal cells (Kroemer et al., 2009).

3.3 Effect of LPSF/AC05 in cell cycle of breast cell lines

Cell cycle analysis shows that treatment with LPSF/AC05 significantly increased the percentage of G2/M cells when compared to untreated control ($p=0,0343$) and also compared to doxorubicin ($p=0,0277$) in MDA-MB-231, a triple negative cell line (Figure 3B). Treatment with doxorubicin does not significantly altered cell cycle progression in the same cell line. LPSF/AC05 also increased G2/M cells in MCF-7, but the difference was not considered significant (Figure 3A).

Checkpoint in G2/M prevents cells to continue mitosis when DNA is damaged and can provide an opportunity for the repair of injured cells. However, when a large number of cells stop in G2/M, tumor suppressor proteins (such as p53) act on the inhibition of proteins that lead to the progression of cell cycle, even with damaged DNA (Stark and Taylor, 2004). Moon and collaborators (2010) reported arrest in G2/M for MCF-7 and MDA-MB-231 cells linked to downregulation of cyclin B1, cdc2 expression and cdc25 phosphorylation after treatment with pectenotoxin-2 (PTX-2). These results demonstrate that arrest in G2/M it can be considered as demonstrating the cytotoxic potential LPSF/AC05 this phase of the cycle. Just a molecular study may provide information on the performance of LPSF/AC05 in pathways that regulate the cycle.

Analysis of MCF-10A cell cycle showed no significant changes after treatment with LPSF/AC05, demonstrating no induction of cell cycle arrest in non-tumor breast cells. However, doxorubicin significantly reduced the percentage of cells in G0/G1 and S phase and significantly increased G2/M cells when compared to non-treated cells ($p=0.0077$, 0.0214 and 0.0061 , respectively) and compared to LPSF/AC05 treatment ($p=0.0078$, 0.0137 and 0.0024 , respectively) (Figure 3C).

3.4 Inhibition of cell migration in MCF-7

Results of migration assays in MCF-7 cells revealed that migration area was significantly reduced after 48 hours of treatment with LPSF/AC05 ($30 \mu\text{M}$) when compared to vehicle control DMSO 0.1% ($p=0.0205$; Figure 4). After incubation period, when observed at inverted light microscope, cells that not migrated proved to be adhered and with good appearance, indicating that LPSF/ AC05 is capable to inhibit cell migration in this cell line.

The use of a lower concentration than IC_{50} was not toxic to MCF-7 cells, but may have caused sufficient stress to inhibit their mobility *in vitro*.

The cell invasion caused by the migration of cells in a tissue is an important mechanism in the development of tissue repair and immune responses. However, this route can become aberrant in tumor cells and lead to malignant invasion of adjacent tissues and blood vessels. These factors can lead to the formation of metastases (Wodarz et al. 2007).

4. Conclusions

Imidazacridine derivative 5-acridin-9-ylmethylidene-2-thioxoimidazolidin-4-one (LPSF/AC05) showed no toxicity in peripheral blood mononuclear cells. In breast tumor cell

lines, LPSF/AC05 exhibited better results in MDA-MB-231 (a triple negative type), inducing apoptosis and cell cycle arrest in G2/M phase. The compound showed lower toxicity in non-tumor breast cells when compared to doxorubicin, showing its selective potential. Therefore, LPSF/AC05 is a promising agent and has the potential to contribute or provide basis for development of new drugs to breast cancer treatment.

5. Acknowledgments

We would like to thank the Brazilian National Research Council (CNPq), the Research Foundation of Pernambuco State (FACEPE), National Institute for Science and Technology in Pharmaceutical Innovation (INCT_if) and CAPES for student fellowships.

6. Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

7. References

ALMEIDA V.L et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quim. Nova** v. 28, n. 1, p.118-129, 2005.

BELMONT, P. et al. Acridine and acridone derivatives, anticancer properties and synthetic methods: where are we now? **Anticancer Agents Med Chem**, v. 7, n. 2, p. 139-69, 2007.

CANCER RESEARCH UK. About breast cancer chemotherapy [internet] 2015. Available at: <<http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/type/breast-cancer/>>

CHEN, K. et al. New benzimidazole acridine derivative induces human colon cancer cell apoptosis in vitro via the ROS-JNK signaling pathway. **Acta Pharmacol Sin**, v. 36, n. 9, p. 1074-84, 2015.

CIŽEKOVÁ, L. et al. Novel 3,6-bis(imidazolidine)acridines as effective photosensitizers for photodynamic therapy. **Bioorg Med Chem**, v. 22, n. 17, p. 4684-93, 2014.

DAR, A. M.; SHAMSUZZAMAN; KHAN, S. Spectroscopic, Viscositic, DNA Binding and Cytotoxic Studies of Newly Synthesized Steroidal Imidazolidines. **J Fluoresc**, 2015.

DEMEUNYNCK, M.; CHARMANTRAY, F.; MARTELLI, A. Interest of acridine derivatives in the anticancer chemotherapy. **Curr Pharm Des**, v. 7, n. 17, p. 1703-24, 2001.

DESANTIS, C. E. et al. Breast cancer statistics, 2015: Convergence of incidence rates between black and white women. **CA Cancer J Clin**, v. 66, n. 1, p. 31-42, 2016.

ELLSWORTH, R. E. et al. Breast cancer in the personal genomics era. **Curr Genomics**, v. 11, n. 3, p. 146-61, 2010.

FESIK, S. W. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 11, p. 876-85, 2005.

GHOSH, R. et al. Chemotherapeutic potential of 9-phenyl acridine: biophysical studies on its binding to DNA. **Eur Biophys J**, v. 39, n. 8, p. 1243-9, 2010.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, 2011.

HEAD, G. A.; MAYOROV, D. N. Imidazoline receptors, novel agents and therapeutic potential. **Cardiovasc Hematol Agents Med Chem**, v. 4, n. 1, p. 17-32, 2006.

INTERNACIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. - IARC. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: Lyon: IARC press, 2012. Available at: <<http://globocan.iarc.fr>>.

JANOVEC, L. et al. Cytotoxic 3,6-bis((imidazolidinone)imino)acridines: synthesis, DNA binding and molecular modeling. **Bioorg Med Chem**, v. 19, n. 5, p. 1790-801, 2011.

KALIMUTHO, M. et al. Targeted Therapies for Triple-Negative Breast Cancer: Combating a Stubborn Disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36(12), p. 822-846, 2015.

KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death Differ**, v. 16, n. 1, p. 3-11, 2009.

LAFAYETTE, E. A. et al. Synthesis, DNA binding and topoisomerase I inhibition activity of thiazacridine and imidazacridine derivatives. **Molecules**, v. 18, n. 12, p. 15035-50, 2013.

MOHAMMADI, Z. A. et al. Liposomal Doxorubicin Delivery System: Effects of Formulation and Processing Parameters on Drug Loading and Release Behaviour. **Curr Drug Deliv**, v. 13, 2015.

OKUMURA, T. Mechanisms by which thiazolidinediones induce anti-cancer effects in cancers in digestive organs. **J Gastroenterol**, v. 45, n. 11, p. 1097-102, 2010.

PAPAGIANNAROS, A. et al. A liposomal formulation of doxorubicin, composed of hexadecylphosphocholine (HePC): physicochemical characterization and cytotoxic activity against human cancer cell lines. **Biomed Pharmacother**, v. 60, n. 1, p. 36-42, 2006.

REGULSKA, K.; STANISZ, B.; REGULSKI, M. [Individualization of anticancer therapy; molecular targets of novel drugs in oncology]. **Postepy Hig Med Dosw (Online)**, v. 66, p. 855-67, 2012.

ROCHÉ, H. et al. Sequential adjuvant epirubicin-based and docetaxel chemotherapy for node-positive breast cancer patients: the FNCLCC PACS 01 Trial. **J Clin Oncol**, v. 24, n. 36, p. 5664-71, 2006.

STARK, G. R.; TAYLOR, W. R. Analyzing the G2/M checkpoint. **Methods Mol Biol**, v. 280, p. 51-82, 2004.

TORRE, L.A. et al. Global cancer statistics, 2012. **CA Cancer J Clin**. v. 65, p. 87-108. 2015.

VALSTER, A. et al. Cell migration and invasion assays. **Methods**, v. 37, n. 2, p. 208-15, 2005.

WODARZ A and NÄTHKE I. Cell polarity in development and cancer. **Nat Cell Biol.**; v. 9, p.1016-24, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. World Cancer Report. International Agency for Research in Cancer: Lyon: IARC press, 2014. Available at: <<http://globocan.iarc.fr>>

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Breast cancer: prevention and control [internet] 2015. Available at: <<http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/>>.

YADAV, B. S.; CHANANA, P.; JHAMB, S. Biomarkers in triple negative breast cancer: A review. **World J Clin Oncol**, v. 6, n. 6, p. 252-263, 2015.

ZANARDI, E. et al. Better Together: Targeted Combination Therapies in Breast Cancer. **Semin Oncol**, v. 42, n. 6, p. 887-95, 2015.

Table 1. IC₅₀ values (μM) of LPSF/AC05 in PBMC, non-tumor breast cell MCF-10A and breast tumor cells.

Compound	Lineages				
	MCF-7	MDA-MB231	T47-D	MCF-10A	PBMCs
LPSF/AC05	42.03±6.5	27.54±4.7	>75±0	28.53±6.2	>100±0
Doxorubicin	2.71±0,8	10,66±1.9	4,27±1,5	<1±0	7,2±4,2

Figure 1. Chemical structure of 5-acridin-9-ylmethylidene-2-thioxoimidazolidin-4-one (LPSF/AC05).

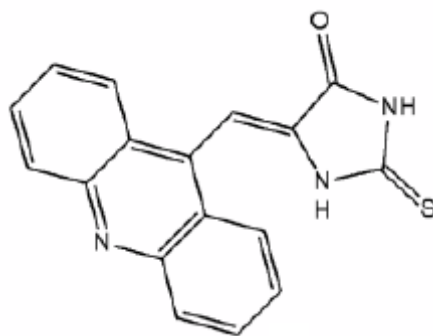


Figure 2. Effects of LPSF/AC05 on apoptotic cells rate after 48 hours of treatment in MCF-7 (A), MDA-MB-231 (B) and MCF-10A (C) cell lines. Percentage of apoptotic cells increased significantly in MCF-7 and MDA-MB-231 after treatment when compared to untreated control and compared to Doxorubicin (NTC = non-treated cells; Doxo = Doxorubicin) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$. . Results are of three independent experiments (performed in triplicate) and expressed as mean values.

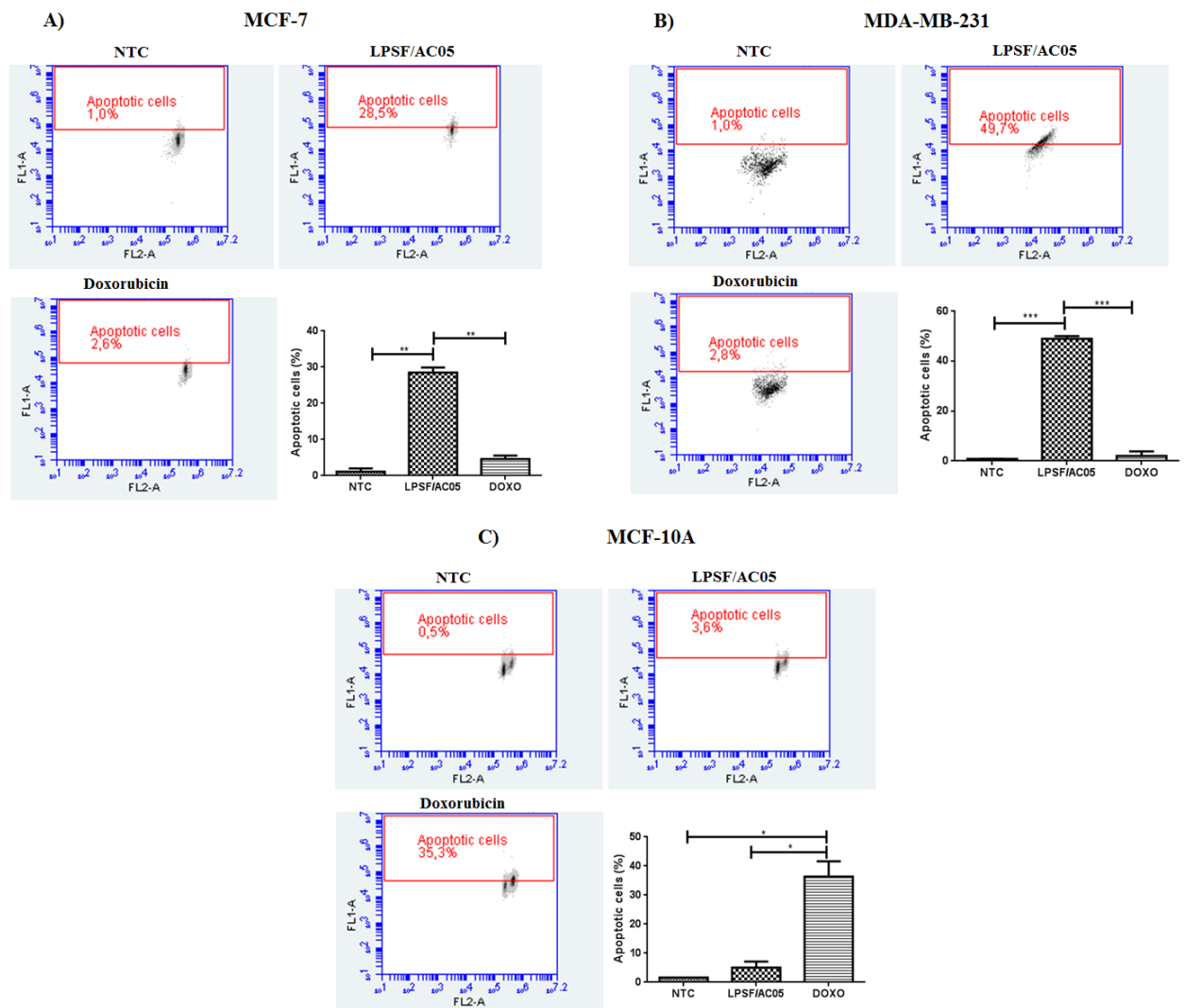


Figure 3. Effects of LPSF/AC05 on cell cycle progression of MCF-7 (A), MDA-MB-231 (B) and MCF-10A (C) cells after 48 hours of treatment (NTC = non-treated cells; DOXO = doxorubicin) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Results are of three independent experiments (performed in triplicate) and expressed as mean values.

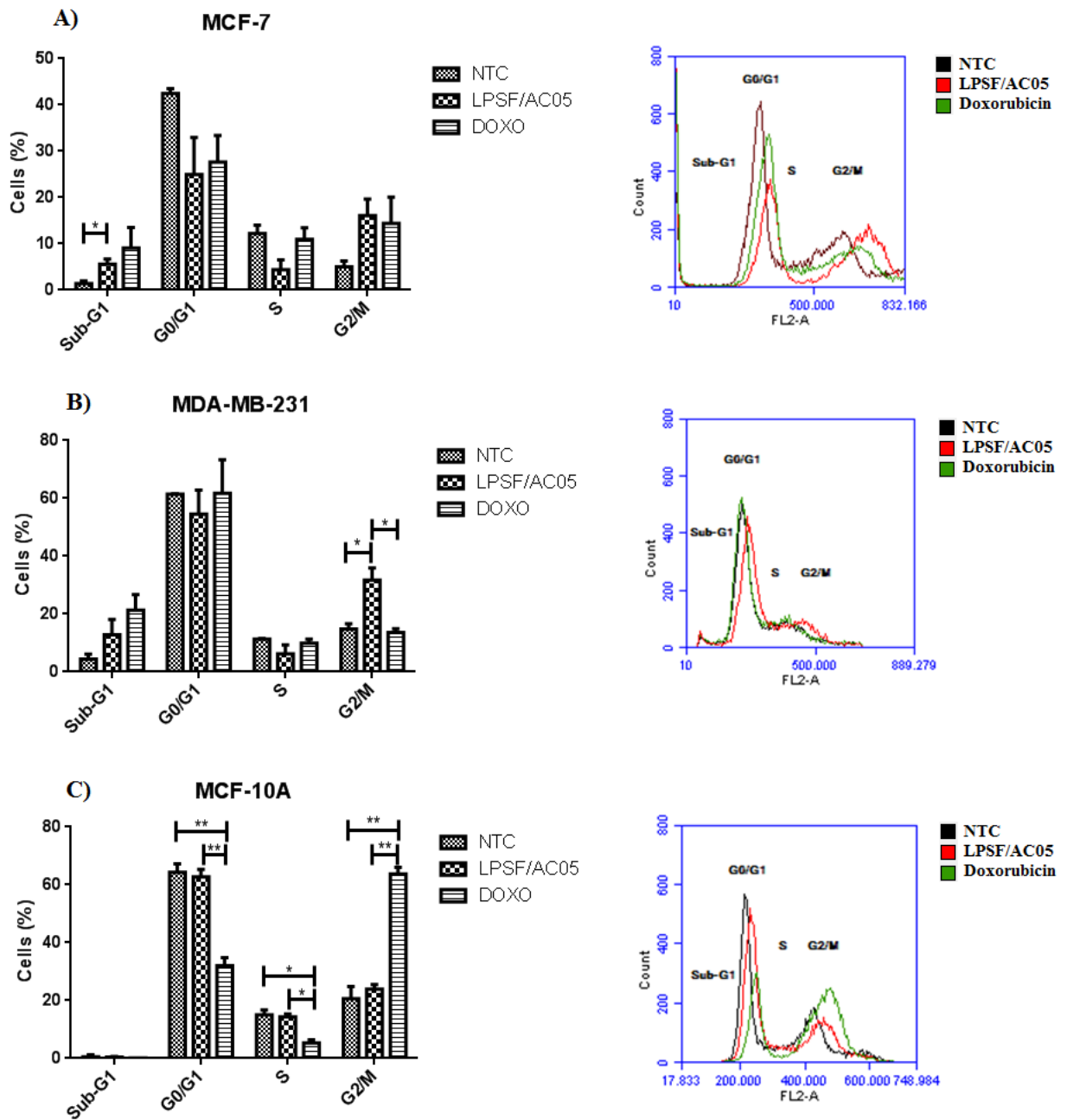
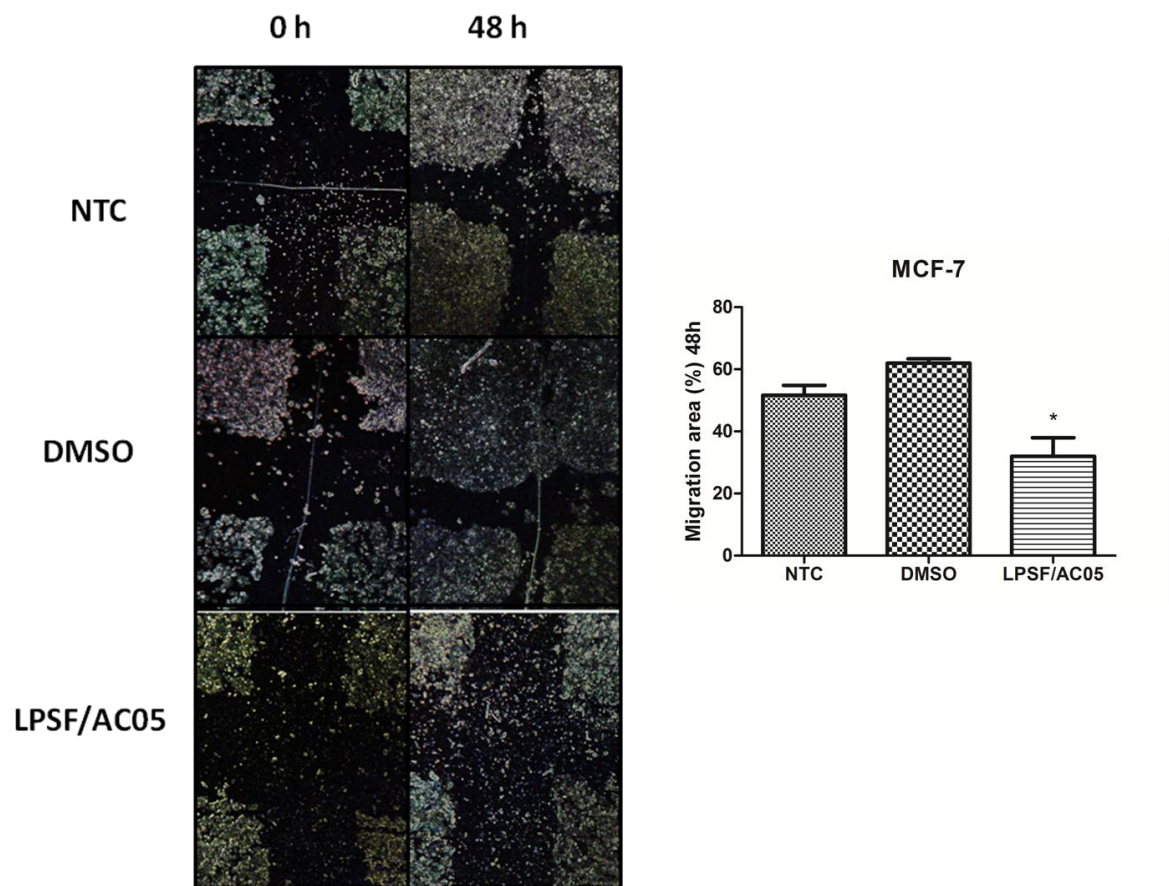


Figure 4. Effects of LPSF/AC05 on cell migration after 48 hours of treatment in MCF-7 cells. LPSF/AC05 significantly reduced migration area when compared to control DMSO 0,1% (NTC= non-treated cells) * $p < 0,05$. . Results are of three independent experiments (performed in triplicate) and expressed as mean values.



Atualmente, a quimioterapia é o método mais utilizado por pacientes com câncer, mas, infelizmente a maioria das drogas apresenta limitações terapêuticas e apresentam efeitos colaterais que são prejudiciais a qualidade de vida dos pacientes, desse modo a busca por novos agentes para o tratamento das neoplasias, têm sido algo constante (Almeida, 2005). Uma das alternativas pode ser a utilização de novas moléculas com potencial atividade anticâncer e com baixa toxicidade. As acridinas e seus derivados, apresentam um grande variedade de atividade biológicas que veem sendo descritas na literatura, dentre estas destaca-se a promissora atividade anticâncer (Pitta et al., 2012).

Em relação aos compostos tiazacridínicos, todos os compostos testados apresentaram atividade citotóxica em linhagens neoplásicas, no entanto, o composto LPSF/AA29 foi o que apresentou os melhores resultados para um número maior de linhagens. A partir dos resultados obtidos, sugere-se que a adição do substituinte 5-bromo-*1H*-indol no núcleo tiazacridínico do LPSF/AA29 contribuiu positivamente com sua potencial atividade citotóxica *in vitro* frente a maioria das linhagens testadas, em comparação com os outros derivados sintetizados. Um grande número de compostos contendo o núcleo indol foi avaliado na última década e, em alguns, foi observada a atividade citotóxica frente à linhagens tumorais de origem diversa como, por exemplo, RH30 (rabdomiossarcoma), MDA-MB231, PaCa-2 (carcinoma de pâncreas), A549 (adenocarcinoma pulmonar), H460 (carcinoma pulmonar), HT-29 (adenocarcinoma cólon retal), SMMC-7721 (hepatoma), MCF-7, IGR-OV-1 (adenocarcinoma ovariano), T47-D, CoLo-205 (carcinoma de cólon), entre outras (Ding, et al., 2005; Kaufmann et al., 2007; Kumar et al., 2010; Zhang et al., 2011; Kamal et al., 2012).

Adicionalmente, o substituinte 5-bromo-*1H*-indol quando inserido em núcleos ftalazinícos também apresentou atividade antitumoral (Haider et al., 2007). Su e colaboradores (2012) também destacaram a presença do substituinte bromo no anel indol no aumento do potencial anticâncer de compostos derivados do obatoclax contra a linhagem PLC5 (hepatoma).

Apesar dos compostos LPSF/AA36, LPSF/AA39 e LPSF/AA40 apresentarem maior semelhança estrutural em comparação com os demais compostos testados, apenas o primeiro destacou-se quando testado contra a linhagem Hep-G2. Esta atividade pode ser explicada por alguns fatores estruturais como, as ausências do oxigênio na posição 4 (núcleo morfolino) e de ressonância no anel piperidínico observada em LPSF/AA39 e LPSF/AA40, respectivamente. Além disso, o núcleo piperidínico é mais básico do que o núcleo de

piridiníco, assim, o nitrogênio da piperidina é capaz de transferir o seu par de elétrons mais facilmente, o que permite uma maior interação com possíveis receptores biológicos. Recentemente, foi relatado que heterociclos nitrogenados são estruturas consideradas especialmente “privilegiadas” para a síntese e o desenvolvimento de novas drogas por conta de sua afinidade com estruturas biológicas (Dabholkar et al., 2010; Elavarasan et al., 2014).

O derivado imidazacridínico LPSF/AC05 apresentou atividade citotóxica contra seis linhagens tumorais (linfomas, Raji e Toledo; leucemias, Jurkat e CCRF-CEM; mama, MCF-7 e MDA-MB) das nove testadas. Este composto é resultante da hibridização molecular dos heterocíclicos imidazolidina e acridina. As imidazolidinas e seus análogos são constituídos por um núcleo heterocíclico contendo átomos de nitrogênio biologicamente ativos e apresentam várias propriedades biológicas, entre elas, citotóxica (Janovec et al., 2011; Čížeková et al., 2014; Dar et al., 2015).

Além disso, as imidazolidinas e seus derivados possuem afinidade com um grande número de receptores biológicos relacionados com inflamação, adesão e proliferação celular, fatores envolvidos em muitas neoplasias (Head e Mayorov, 2006).

As propriedades anticâncer das acridinas têm sido relacionadas à sua estrutura aromática planar que possibilita a interação com o DNA celular, intercalando-se entre os pares de bases da dupla hélice desta macromolécula (Ghosh et al., 2010).

A avaliação da atividade citotóxica dos derivados tiazacridínicos e de LPSF/AC05 frente às células normais também foi investigada. Por esta razão, células normais foram expostas ao tratamento com os compostos acridínicos e com amsacrina. Verificou-se que todos os compostos mostraram-se menos tóxicos que a droga de referência, amsacrina, quando testados em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). Estes resultados demonstram que esta série de compostos exibe baixa citotoxicidade para as células não tumorais, demonstrando assim a sua propriedade seletiva.

O composto LPSF/AC05 também foi testado frente a linhagem não tumoral de mama MCF-10A e apresentou uma média do valor de IC_{50} cerca de 30 vezes menor que a concentração da doxorubicina. A doxorubicina é um membro da família antraciclina de fármacos antineoplásicos e é utilizado como agente de primeira linha para o tratamento de vários tipos de tumores sólidos, porém, revela-se muito tóxico (Papagiannaros et al., 2006).

Um fator importante no desenvolvimento de quaisquer potenciais novos fármacos anticancerígenos é, sem dúvida, que eles sejam eficazes e que apresentem baixa citotoxicidade (Parent-Massin et al., 2010; Valeri et al., 2010).

Uma vez observado que os derivados acridínicos LPSF/AA29, LPSF/AA36 e LPSF/AC05 exibiram efeitos citotóxicos em linhagens tumorais, seus mecanismos de morte foram investigados e todos mostraram-se potentes indutores apoptóticos. A resistência à morte celular é uma das principais características do câncer através da evasão apoptótica, uma habilidade biológica adquirida durante as várias etapas do desenvolvimento de tumores humanos (Hanahan e Weinberg, 2011). Por conseguinte, induzir a apoptose e compreender os mecanismos para a indução deste tipo de morte celular é bastante útil no tratamento do câncer (Amaravadi et al., 2007).

Adicionalmente, a identificação de potenciais agentes que induzam a morte celular, em particular a apoptose, tem despertado o interesse da comunidade científica mundial (De et al., 2010; Okumura, 2010; Jin et al., 2012). Como já citado, um fenômeno muito comum ocasionado por este tipo de terapia é a indução de resistência à morte celular, por isso, novos estudos moleculares estão sendo realizados para melhor compreender a ação de compostos nas vias que regulam a apoptose.

Em relação aos efeitos dos novos compostos tiazacridínicos sobre o ciclo celular foi observado o aumento da porcentagem de células na fase sub-G1, população sub-diplóide, após o tratamento com LPSF/AA29, LPSF/AA36 e amsacrina. A presença desta população nesta fase é considerada um indicador de morte celular (Queiroz et al., 2013) o que é consistente com os resultados dos ensaios com MTT e indução de morte celular.

Além disso, também foi observado um arrasto celular na fase G2/M após o tratamento com LPSF/AA29, LPSF/AA36 e LPSF/AC05 (em tumores de mama), este resultado pode ser considerado como um atraso no ciclo celular de modo que a reorganização de vários processos pode ocorrer nesta fase, incluindo a regulação da segregação dos cromossomos e a tentativa de reparar danos ao DNA (Foster, 2008). Estudos moleculares têm revelado que compostos sintéticos e naturais são capazes de induzir o arrasto na fase G2/M do ciclo celular e promover a morte celular por apoptose, demonstrando que a parada do ciclo nesta fase também está associada com mecanismos de morte celular (Lee et al., 2010; Liu et al., 2013). A importância do aumento do número de células estacionadas em G2/M na mediação de morte celular pode ser exemplificada pela droga paclitaxel, um dos medicamentos mais utilizados no tratamento do câncer da mama e de ovário, que atua especificamente sobre esta fase do ciclo e, em seguida, induz a apoptose (Gallagher e Brian, 2007; Zhao et al., 2014).

Em células de leucemia e linfoma LPSF/AC05 induziu um parada no ciclo celular na fase G0/G1. O checkpoint em G1 impede a replicação do DNA danificado, bloqueando a entrada em fase S e sua alteração é uma característica comum das células cancerosas (Chen et

al., 2012) . Os agentes quimioterapêuticos, tais como paclitaxel e vincristina apresentam a capacidade de induzir o arrasto do ciclo celular nesta fase e os seus efeitos citostáticos estão associados à indução da morte celular por apoptose (Denkert et al., 2003; Kurose et al., 2012).

O derivado LPSF/AC05 revelou-se como um agente inibidor da atividade da enzima topoisomerase II. Esta é uma enzima que faz quebras na fita dupla do DNA permitindo a manipulação da sua topologia. Agentes anticâncer, atualmente em uso clínico, tais como doxorubicina e etoposídeo inibem a topoisomerase II e provocam quebras não reparáveis na cadeia dupla do DNA (Demeunynck et al., 2001; Montecucco et al., 2015). LPSF/AC05 também é capaz de inibir a actividade da topoisomerase I em 100 e 200 μM (Lafayette et al., 2013). Embora a maioria dos inibidores de topoisomerasas mostrem seletividade para apenas um tipo de topoisomerase I ou II, uma pequena classe de compostos pode atuar contra ambas as enzimas (Denny e Baguley, 2003). LPSF/AC05 é capaz de inibir ambas as topoisomerasas reforçando seu potencial como agente antineoplásico.

Ademais, foi observado que após o tratamento por um período de 48 horas LPSF/AC05 inibiu o número de células migrantes, quando comparado às células não tratadas. A invasão celular provocada pela migração de células em um tecido é um mecanismo muito importante no desenvolvimento do tecido, reparação e respostas imunitárias. Porém, esta via pode tornar-se aberrante em células tumorais e levar a invasão maligna nos tecidos adjacentes e vasos sanguíneos. Estes fatores podem levar a formação de metástases (Wodarz et al., 2007).

- ✓ Os novos acridínicos apresentaram atividade citotóxica e citostática frente a linhagens neoplásicas de diferentes histotipos;
- ✓ O composto tiazacridínico LPSF/AA29 que possui o substituinte 5-bromo-*1H*-indol exibiu os menores valores de IC₅₀ para a maioria das linhagens testadas, exceto para hepatocarcinoma (Hep-G2);
- ✓ Dentre os compostos testados, o agente tiazacridínico LPSF/AA36, que possui o núcleo piperidínico, foi o que apresentou maior citotoxicidade contra a linhagem Hep-G2.
- ✓ O composto imidazacridínico LPSF/AC05 apresentou atividade citotóxica contra linhagens de câncer de mama, linfomas e leucemias.
- ✓ Todos os compostos testados mostraram-se menos tóxicos para as linhagens celulares normais (PBMCs) quando comparados às drogas amsacrina ou doxorrubicina;
- ✓ O composto imidazacridínico LPSF/AC05 foi menos tóxico em células não tumorais de mama, em comparação à droga de referência doxorrubicina;
- ✓ Os derivados LPSF/AA29, LPSF/AA36 e LPSF/AC05 são potenciais agentes indutores de morte celular por apoptose;
- ✓ Os derivados LPSF/AA29 e LPSF/AA36 mostraram-se inibidores significativos da progressão do ciclo celular na fase G2/M;
- ✓ O derivado LPSF/AC05 mostrou-se inibidor da progressão do ciclo celular nas fases G0/G1, em linhagens de leucemias/linfomas, G2/M na linhagem MCF-7;
- ✓ O derivado LPSF/AC05 atuou na inibição da atividade da enzima topoisomerase II;

- ✓ O derivado LPSF/AC05 mostrou-se um inibidor da migração celular na linhagem de câncer de mama MCF-7.

- ✓ Avaliar o efeito dos derivados acridínicos em outras linhagens celulares;
- ✓ Avaliar o efeito dos derivados acridínicos sobre as caspases 3,8 e 9;
- ✓ Estabelecer quais mecanismos moleculares estão relacionados a atividade anticâncer dos derivados acridínicos;
- ✓ Avaliar a toxicidade aguda e subcrônica dos derivado acridínicos.
- ✓ Realizar ensaios de citotoxicidade *in vitro* dos derivados acridínicos em coadministração a fármacos já utilizados na terapêutica, para a análise de sinergismo de ação.
- ✓ Realizar a análise proteômica de linhagens neoplásicas após o tratamento com os novos agentes acridínicos.

REFERÊNCIAS

ACS - American Cancer Society. What is cancer. Disponível em: <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>. 2014 Acesso em: 15 Jan. 2015.

Almeida VL, Leitão A, Reina LCB., Montanari. CA., Donnici, CL. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Quim. Nova* 2005; 28(1):118-129.

Almeida SM, Lafayette EA, da Silva LP, Amorim CA, de Oliveira TB, Ruiz AL, de Carvalho JE, de Moura RO, Beltrão EI, de Lima MoC, et al. Synthesis, dna binding, and antiproliferative activity of novel acridine-thiosemicarbazone derivatives. *Int J Mol Sci* 2015;16(6):13023-13042.

Amaravadi RK, Thompson CB. The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. *Clin Cancer Res* 2007;13(24):7271-7279.

Barros FW, Silva TG, da Rocha Pitta MG, Bezerra DP, Costa-Lotufo LV, de Moraes MO, Pessoa C, de Moura MA, de Abreu FC, de Lima MoC, et al. Synthesis and cytotoxic activity of new acridine-thiazolidine derivatives. *Bioorg Med Chem* 2012;20(11):3533-3539.

Belmont P, Bosson J, Godet T, Tiano M. Acridine and acridone derivatives, anticancer properties and synthetic methods: Where are we now? *Anticancer Agents Med Chem* 2007;7(2):139-169.

Bicknell R. The realisation of targeted antitumour therapy. *Br J Cancer* 2005;92 Suppl 1:S2-5.

Bonse S, Santelli-Rouvier C, Barbe J, Krauth-Siegel RL. Inhibition of trypanosoma cruzi trypanothione reductase by acridines: Kinetic studies and structure-activity relationships. *J Med Chem* 1999;42(26):5448-5454.

Braga PA, Dos Santos DA, Da Silva MF, Vieira PC, Fernandes JB, Houghton PJ, Fang R. In vitro cytotoxicity activity on several cancer cell lines of acridone alkaloids and n-phenylethyl-benzamide derivatives from swinglea glutinosa (bl.) merr. *Nat Prod Res* 2007;21(1):47-55.

Brasil. Ministério da Saúde, - DATASUS - Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>. Acesso em: 15 Jan. 2015.

Bridewell DJ, Finlay GJ, Baguley BC. Topoisomerase i/ii selectivity among derivatives of n-[2-(dimethylamino)ethyl]acridine-4-carboxamide (daca). *Anticancer Drug Des* 2001;16(6):317-324.

Burger AM, Dai F, Schultes CM, Reszka AP, Moore MJ, Double JA, Neidle S. The g-quadruplex-interactive molecule braco-19 inhibits tumor growth, consistent with telomere targeting and interference with telomerase function. *Cancer Res* 2005;65(4):1489-1496.

Cabeza-Alvarez CI, González-Rubio M, García-Montero R, Alvarez-Tejerina A. [parkinsonian syndrome related to tacrine]. *Neurologia* 1999;14(2):96.

Caterina MC, Perillo IA, Boiani L, Pezaroglo H, Cerecetto H, González M, Salerno A. Imidazolidines as new anti-Trypanosoma cruzi agents: Biological evaluation and structure-activity relationships. *Bioorganic & medicinal chemistry* 2008;16(5):2226-2234.

Chang JY, Lin CF, Pan WY, Bacherikov V, Chou TC, Chen CH, Dong H, Cheng SY, Tasi TJ, Lin YW, et al. New analogues of aha as potential antitumor agents: Synthesis and biological activity. *Bioorg Med Chem* 2003;11(23):4959-4969.

Chen C, Kong AN. Dietary cancer-chemopreventive compounds: From signaling and gene expression to pharmacological effects. *Trends Pharmacol Sci* 2005;26(6):318-326.

Chen K, Chu BZ, Liu F, Li B, Gao CM, Li LL, Sun QS, Shen ZF, Jiang YY. New benzimidazole acridine derivative induces human colon cancer cell apoptosis in vitro via the ros-jnk signaling pathway. *Acta Pharmacol Sin* 2015;36(9):1074-1084.

Chen YG, Wang Q, Lin SL, Chang CD, Chuang J, Chung J, Ying SY. Activin signaling and its role in regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006;231(5):534-544.

Chen Y, Tang Y, Guo C, Wang J, Boral D, Nie D. Nuclear receptors in the multidrug resistance through the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters. *Biochem Pharmacol* 2012;83(8):1112-1126.

Chen T, Stephens PA, Middleton FK and Curtin NJ. Targeting the S and G2 checkpoint to treat cancer. *Drug Discov Today*. 2012; 17: 194-202.

Cižeková L, Grolmusová A, Ipóthová Z, et al. Novel 3,6-bis(imidazolidine)acridines as effective photosensitizers for photodynamic therapy. *Bioorg Med Chem*. 2014; 22: 4684-93.

Csuk R, Barthel A, Raschke C, Kluge R, Ströhl D, Trieschmann L, Böhm G. Synthesis of monomeric and dimeric acridine compounds as potential therapeutics in alzheimer and prion diseases. *Arch Pharm (Weinheim)* 2009;342(12):699-709.

Dabholkar VV, Ansari FY. Novel pyrimidine derivatives by sonication and traditional thermal methods *Green Chemistry Letters and Reviews* 2010;3(3):245–248.

Dar AM, Shamsuzzaman and Khan S. Spectroscopic, Viscositic, DNA Binding and Cytotoxic Studies of Newly Synthesized Steroidal Imidazolidines. *J Fluoresc*. 2015.

David-Cordonnier MH, Laine W, Lansiaux A, Kouach M, Briand G, Pierré A, Hickman JA, Bailly C. Alkylation of guanine in dna by s23906-1, a novel potent antitumor compound derived from the plant alkaloid acronycine. *Biochemistry* 2002;41(31):9911-9920.

Davis SN. Insulin, oral hypoglycemic agents, and the pharmacology of the endocrine pancreas. In: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, editors. *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York: McGraw- Hill, 2006.

DeFronzo RA, Bergenstal RM, Cefalu WT, Pullman J, Lerman S, Bode BW, Phillips LS. Efficacy of inhaled insulin in patients with type 2 diabetes not controlled with diet and exercise. *Diabetes Care* 2005;28(8):1922-1928.

De P, Baltas M, Lamoral-Theys D, Bruyère C, Kiss R, Bedos-Belval F, Saffon N. Synthesis and anticancer activity evaluation of 2(4-alkoxyphenyl)cyclopropyl hydrazides and triazolo phthalazines. *Bioorg Med Chem* 2010;18(7):2537-2548.

Demeunynck, M. Antitumour acridines. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 2004;14(1):

55-70.

Demeunynck M, Charmantray F, Martelli A. Interest of acridine derivatives in the anticancer chemotherapy. *Curr Pharm Des* 2001;7(17):1703-1724.

Denkert C, Fürstenberg A, Daniel PT, et al. Induction of G0/G1 cell cycle arrest in ovarian carcinoma cells by the anti-inflammatory drug NS-398, but not by COX-2-specific RNA interference. *Oncogene*. 2003; 22: 8653-61.

Denny WA and Baguley BC. Dual topoisomerase I/II inhibitors in cancer therapy. *Curr Top Med Chem*. 2003; 3: 339-53.

Denny WA. Acridine derivatives as chemotherapeutic agents. *Curr Med Chem* 2002;9(18):1655-1665.

Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* 2008;112(13):4793-4807.

Ding H, Zhang C, Wu X, Yang C, Zhang X, Ding J, Xie Y. Novel indole alpha-methylene-gamma-lactones as potent inhibitors for akt-mtor signaling pathway kinases. *Bioorg Med Chem Lett* 2005;15(21):4799-4802.

Eiter LC, Hall NW, Day CS, Saluta G, Kucera GL, Bierbach U. Gold(I) analogues of a platinum-acridine antitumor agent are only moderately cytotoxic but show potent activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Chem* 2009; 52(21): 6519-22.

Elavarasan T, Bhakiaraj DP, Gopalakrishnan M. Synthesis, spectral analysis, in vitro microbiological evaluation, and molecular docking studies of some novel 1-(1-aryl-1H-tetrazol-5-yl)-2-(piperidin-1-yl)ethanone derivatives. *ISRN Org Chem* 2014;2014:120173.

Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007;35(4):495-516.

Ertmer A, Huber V, Gilch S, Yoshimori T, Erfle V, Duyster J, Elsässer HP, Schätzl HM. The anticancer drug imatinib induces cellular autophagy. *Leukemia* 2007;21(5):936-942.

Foster I. Cancer: A cell cycle defect. *Radiography* 2008;14(2):144–149.

Ferguson LR, Denny WA. The genetic toxicology of acridines. *Mutat Res* 1991;258(2):123-160.

Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 2006;25(34):4798-4811.

Galdino-Pitta MR, Pitta MG, Lima MC, Galdino LS, Pitta RI. Niche for acridine derivatives in anticancer therapy. *Mini Rev Med Chem* 2013;13(9):1256-1271.

Gallagher BM. Microtubule-stabilizing natural products as promising cancer therapeutics. *Curr Med Chem* 2007;14(28):2959-2967.

Garraway LA, Lander ES. Lessons from the cancer genome. *Cell* 2013;153(1):17-37.

Gemma S, Kukreja G, Fattorusso C, Persico M, Romano MP, Altarelli M, Savini L, Campiani

G, Fattorusso E, Basilico N, et al. Synthesis of n1-arylidene-n2-quinolyl- and n2-acrydinyldhydrazones as potent antimalarial agents active against cq-resistant p. Falciparum strains. *Bioorg Med Chem Lett* 2006;16(20):5384-5388.

Ghosh R, Bhowmik S, Bagchi A, Das D, Ghosh S. Chemotherapeutic potential of 9-phenyl acridine: Biophysical studies on its binding to dna. *Eur Biophys J* 2010;39(8):1243-1249.

Girault S, Grellier P, Berecibar A, Maes L, Mouray E, Lemièrre P, Debreu MA, Davioud-Charvet E, Sergheraert C. Antimalarial, antitrypanosomal, and antileishmanial activities and cytotoxicity of bis(9-amino-6-chloro-2-methoxyacridines): Influence of the linker. *J Med Chem* 2000;43(14):2646-2654.

Gleave RJ, Walter DS, Beswick PJ, Fonfria E, Michel AD, Roman SA, Tang SP. Synthesis and biological activity of a series of tetrasubstituted-imidazoles as P2X 7 antagonists. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 2010; 20(16):4951-4954.

Gonzalez-Malerva L, Park J, Zou L, Hu Y, Moradpour Z, Pearlberg J, Harlow E, LaBaer J. Autophagy and tamoxifen resistance in breast cancer. *Cancer Research* 2009; 69(24):5135-5135.

González-Sánchez I, Solano JD, Loza-Mejía MA, Olvera-Vázquez S, Rodríguez-Sotres R, Morán J, Lira-Rocha A, Cerbón MA. Antineoplastic activity of the thiazolo[5,4-b]quinoline derivative d3clp in k-562 cells is mediated through effector caspases activation. *Eur J Med Chem* 2011;46(6):2102-2108.

Grivicich I, Regner A, Rocha AB. Morte Celular por Apoptose. *Rev Bras Cancerologia* 2007; 53(3):335-343.

Groenwald SL. The Behavior of Malignancies, Capítulo 01. In: Johnson BL, Gross J. *Handbook of Oncology Nursing*. 3 ed. Sudbury: J & B Publishers, 1998.

Guerra MR, Gallo CVM, Mendonça GAS. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. *Ver Bras Cancerologia* 2005; 51(3):227-234.

Guilbaud N, Léonce S, Tillequin F, Koch M, Hickman JA, Pierré A. Acronycine derivatives as promising antitumor agents. *Anticancer Drugs* 2002;13(5):445-449.

Guittat L, De Cian A, Rosu F, Gabelica V, De Pauw E, Delfourne E, Mergny JL. Ascididemin and meridine stabilise g-quadruplexes and inhibit telomerase in vitro. *Biochim Biophys Acta* 2005;1724(3):375-384.

Han S, Roman J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma: a novel target for cancer therapeutics? *Anti-Cancer Drugs* 2007;18(3):237-244.

Head GA and Mayorov DN. Imidazoline receptors, novel agents and therapeutic potential. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2006; 4: 17-32.

INCA - Instituto Nacional do Câncer José de Alencar - *Estimativas 2010: Incidência de câncer no Brasil*. 2009. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/estimativa20091201.pdf>>. Acessado em: 30 jul. 2015.

INCA - Instituto Nacional do Câncer José de Alencar O que é o câncer? 2012. Disponível em:

<http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 28 set. 2015.

INCA - Instituto Nacional do Câncer José de Alencar - *Estimativas 2016: Incidência de câncer no Brasil*. 2016 Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/dados-apresentados.pdf>>. Acesso em: 01 jan. 2016.

Haider N, Kabicher T, Käferböck J, Plenk A. Synthesis and in-vitro antitumor activity of 1-[3-(indol-1-yl)prop-1-yn-1-yl]phthalazines and related compounds. *Molecules* 2007;12(8):1900-1909.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57-70.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 2011;144(5):646-674.

Houtgraaf JH, Versmissen J, van der Giessen WJ. A concise review of dna damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovasc Res* 2006;7(3):165-172.

Imperatore C, Aiello A, D'Aniello F, Senese M, Menna M. Alkaloids from marine invertebrates as important leads for anticancer drugs discovery and development. *Molecules* 2014;19(12):20391-20423.

Janočková J, Plšíková J, Kašpárková J, Brabec V, Jendželovský R, Mikeš J, Koval' J, Hamul'áková S, Fedoročko P, Kuča K, et al. Inhibition of dna topoisomerases i and ii and growth inhibition of hl-60 cells by novel acridine-based compounds. *Eur J Pharm Sci* 2015;76:192-202.

Janovec L, Kožurková M, Sabolová D, et al. Cytotoxic 3,6-bis((imidazolidinone)imino)acridines: synthesis, DNA binding and molecular modeling. *Bioorg Med Chem*. 2011; 19: 1790-801.

Jin F, Zhang N, Tan C, Gao D, Zhang C, Liu F, Chen Z, Gao C, Liu H, Li S, et al. 2'-chloro-4'-aminoflavone derivatives selectively targeting hepatocarcinoma cells: Convenient synthetic process, g(2)/m cell cycle arrest and apoptosis triggers. *Arch Pharm (Weinheim)* 2012;345(7):525-534.

Johnson DG, Walker CL. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999;39:295-312.

Jones M, Mercer AE, Stocks PA, La Pensée LJ, Cosstick R, Park BK, Kennedy ME, Piantanida I, Ward SA, Davies J, et al. Antitumour and antimalarial activity of artemisinin-acridine hybrids. *Bioorg Med Chem Lett* 2009;19(7):2033-2037.

Junqueira LC, Carneiro J. *Biologia celular e molecular*. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

Kamal A, Srikanth YVV, Khan MNA, Shaik TB, Kalivendi SV. Synthesis, Anticancer Activity and Inhibition of Tubulin Polymerization of Bisindole Sulfonates. *Letters in Drug Design & Discovery* 2012; 9(3):242-250.

Kastan MB, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 2004;432(7015):316-323.

Kaufmann D, Pojarová M, Vogel S, Liebl R, Gastpar R, Gross D, Nishino T, Pfaller T, von Angerer E. Antimitotic activities of 2-phenylindole-3-carbaldehydes in human breast cancer cells. *Bioorg Med Chem* 2007;15(15):5122-5136.

Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* 2000;256(1):42-49.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26(4):239-257.

Kerr JF. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 2002;181-182:471-474.

Ketron AC, Denny WA, Graves DE, Osheroff N. Amsacrine as a topoisomerase ii poison: Importance of drug-dna interactions. *Biochemistry* 2012;51(8):1730-1739.

Korgun ET, Celik-Ozenci C, Acar N, Cayli S, Desoye G, Demir R. Location of cell cycle regulators cyclin b1, cyclin a, pcna, ki67 and cell cycle inhibitors p21, p27 and p57 in human first trimester placenta and deciduas. *Histochem Cell Biol* 2006;125(6):615-624.

Korth C, May BC, Cohen FE, Prusiner SB. Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(17):9836-9841.

Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 2007;87(1):99-163.

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, et al. Classification of cell death: Recommendations of the nomenclature committee on cell death 2009. *Cell Death Differ* 2009;16(1):3-11.

Kumar D, Kumar NM, Akamatsu K, Kusaka E, Harada H, Ito T. Synthesis and biological evaluation of indolyl chalcones as antitumor agents. *Bioorg Med Chem Lett* 2010;20(13):3916-3919.

Kuraishy A, Karin M, Grivennikov SI. Tumor promotion via injury- and death-induced inflammation. *Immunity* 2011;35(4):467-477.

Kurose H, Shibata MA, Iinuma M and Otsuki Y. Alterations in cell cycle and induction of apoptotic cell death in breast cancer cells treated with α -mangostin extracted from mangosteen pericarp. *J Biomed Biotechnol*. 2012; 2012: 672428.

Lafayette EA, Vitalino de Almeida SM, Pitta MG, Carneiro Beltrão EI, da Silva TG, Olímpio de Moura R, Pitta IaR, de Carvalho LB, de Lima MoC. Synthesis, dna binding and topoisomerase i inhibition activity of thiazacridine and imidazacridine derivatives. *Molecules* 2013;18(12):15035-15050.

Lavrik I, Golks A, Krammer PH. Death receptor signaling. *J Cell Sci* 2005;118(Pt 2):265-267.

Lee YB, Gong YD, Yoon H, Ahn CH, Jeon MK, Kong JY. Synthesis and anticancer activity of new 1-[(5 or 6-substituted 2-alkoxyquinoxalin-3-yl)aminocarbonyl]-4-(hetero)arylpiperazine derivatives. *Bioorg Med Chem* 2010;18(22):7966-7974.

- Li-Weber M. Targeting apoptosis pathways in cancer by chinese medicine. *Cancer Lett* 2013;332(2):304-312.
- Liu Y, Wang W, Fang B, Ma F, Zheng Q, Deng P, Zhao S, Chen M, Yang G, He G. Anti-tumor effect of germacrone on human hepatoma cell lines through inducing g2/m cell cycle arrest and promoting apoptosis. *Eur J Pharmacol* 2013;698(1-3):95-102.
- Loeb LA, Harris CC. Advances in chemical carcinogenesis: A historical review and prospective. *Cancer Res* 2008;68(17):6863-6872.
- Lyakhov SA, Suveyzdis YI, Litvinova LA, Andronati SA, Rybalko SL, Dyadyun ST. Biological active acridine derivatives. Part 4: Synthesis and antiviral activity of some bis-acridinylated diamides. *Pharmazie* 2000;55(10):733-736.
- Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, cdks and cancer: A changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 2009;9(3):153-166.
- Martín de Civetta MT, Civetta JD. Carcinogenesis. *Salud Publica Mex* 2011;53(5):405-414.
- May BC, Fafarman AT, Hong SB, Rogers M, Deady LW, Prusiner SB, Cohen FE. Potent inhibition of scrapie prion replication in cultured cells by bis-acridines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(6):3416-3421.
- McColl N, Auvinen A, Kesminiene A, Espina C, Erdmann F, de Vries E, Greinert R, Harrison J, Schüz J. European code against cancer 4th edition: Ionising and non-ionising radiation and cancer. *Cancer Epidemiol* 2015.
- McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015;7(4).
- Meurman JH. Infectious and dietary risk factors of oral cancer. *Oral Oncol* 2010;46(6):411-413.
- Muller PA, Vousden KH. P53 mutations in cancer. *Nat Cell Biol* 2013;15(1):2-8.
- Montecucco A, Zanetta F and Biamonti G. Molecular mechanisms of etoposide. *EXCLI J*. 2015; 14: 95-108.
- Narisawa-Saito M, Kiyono T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: Roles of e6 and e7 proteins. *Cancer Sci* 2007;98(10):1505-1511.
- Nesto RW, Bell D, Bonow RO, Fonseca V, et al. Thiazolidinedione use, fluid retention, and congestive heart failure: a consensus statement from the American Heart Association and American Diabetes Association. *Circulation*. 2003;108:2941-2948.
- Neves JK, Botelho, SP, Melo, CML, Pereira VR, Lima MCA, Pitta I, Albuquerque M, Galdino SL. Biological and immunological activity of new imidazolidines against adult worms of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology research* 2010; 107(3):531-538.
- Nisbet IC, LaGoy PK. Toxic equivalency factors (tefs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (pahs). *Regul Toxicol Pharmacol* 1992;16(3):290-300.

Okumura T. Mechanisms by which thiazolidinediones induce anti-cancer effects in cancers in digestive organs. *J Gastroenterol* 2010;45(11):1097-1102.

Okumura T. Mechanisms by which thiazolidinediones induce anti-cancer effects in cancers in digestive organs. *J Gastroenterol* 2010;45(11):1097-1102.

Olszewska P, Szymański J, Mikiciuk-Olasik E, Szymański P. New cyclopentaquinoline derivatives with fluorobenzoic acid induce g1 arrest and apoptosis in human lung adenocarcinoma cells. *Eur J Pharmacol* 2014;729:30-36.

OMS - Organização Mundial de Saúde - *WHO/Cancer*. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 01 set. 2015.

Opacić N, Barbaric M, Zorc B, Cetina M, Nagl A, Frkovic D, Kralj M, Pavelić K, Balzarini J, Andrei G, Snoeck R, De Clercq E, Raić-Malić S, Mintas M. The novel L- and D-amino acid derivatives of hydroxyurea and hydantoins: synthesis, X-ray crystal structure study, and cytostatic and antiviral activity evaluations. *Journal of medicinal chemistry* 2005;48(2):475-482.

Papagiannaros A, Hatziantoniou S, Dimas K, Papaioannou GT and Demetzos C. A liposomal formulation of doxorubicin, composed of hexadecylphosphocholine (HePC): physicochemical characterization and cytotoxic activity against human cancer cell lines. *Biomed Pharmacother*. 2006; 60: 36-42.

Parent-Massin D, Hymery N, Sibiril Y. Stem cells in myelotoxicity. *Toxicology* 2010;267(1-3):112-117.

Patel MV, Bell R, Majest S, Henry R, Kolasa T. Synthesis of 4, 5-diaryl-1 H-pyrazole-3-ol derivatives as potential COX-2 inhibitors. *The Journal of organic chemistry* 2004;69(21):7058-7065.

Pattle SB, Farrell PJ. The role of epstein-barr virus in cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2006;6(11):1193-1205.

Peters JM, Shah YM, Gonzalez FJ. The role of peroxisome proliferator-activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention. *Nat Rev Cancer* 2012;12(3):181-195.

Pitta MGR, Souza ES, Barros F WA, Moraes-Filho MO, Pessoa CO, Hernandez MZ., Lima MCA, Galdino SL, Pitta IR. Synthesis and in vitro anticancer activity of novel thiazacridine derivatives. *Med Chem Research* 2012;22(5):2421-2429.

Pons OR, Gregorio DM, Mateo JVG, Calatayud JM. Flow-injection analysis study of the chemiluminescent behaviour of proflavine and acriflavine. *Analytica Chimica Acta* 2011;1(438):149-156.

Qin Y, Pang JY, Chen WH, Cai Z, Jiang ZH. Synthesis, dna-binding affinities, and binding mode of berberine dimers. *Bioorg Med Chem* 2006;14(1):25-32.

Queiroz MJ, Peixoto D, Calhelha RC, Soares P, Dos Santos T, Lima RT, Campos JF, Abreu RM, Ferreira IC, Vasconcelos MH. New di(hetero)arylethers and di(hetero)arylamines in the thieno[3,2-b]pyridine series: Synthesis, growth inhibitory activity on human tumor cell lines and non-tumor cells, effects on cell cycle and on programmed cell death. *Eur J Med Chem*

2013;69:855-862.

Rêgo MJBD, Galdino-Pitta MR., Pereira DTM, Silva JC., Rabello MM, Lima, MCA, Hernandez MZ, Pitta IR, Galdino SL, Rocha Pitta, M. G. (2014). Synthesis, in vitro anticancer activity and in silico study of new disubstituted thiazolidinedione derivatives. *Med Chem Research* 2014; 23(6):3220-3226.

Regulska K, Stanis B, Regulski M. [individualization of anticancer therapy; molecular targets of novel drugs in oncology]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2012;66:855-867.

Ricci MS, Zong WX. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. *Oncologist* 2006;11(4):342-357.

Rinehart KL, Holt TG, Fregeau NL, Keifer PA, Wilson GR, Perun TJ, Sakai R, Thompson AG, Stroh JG, Shield LS. Bioactive compounds from aquatic and terrestrial sources. *J Nat Prod* 1990;53(4):771-792.

Roland K, Kestemont P, Hénuset L, Pierrard MA, Raes M, Dieu M, Silvestre F. Proteomic responses of peripheral blood mononuclear cells in the european eel (*anguilla anguilla*) after perfluorooctane sulfonate exposure. *Aquat Toxicol* 2013;128-129:43-52.

Saczewski J, Hudson, AL., Rybczyńska. A. 2-[(Arylmethoxy) imino] imidazolidines with potential biological activities. *Acta poloniae pharmaceutica* 2008; 66(6):671-680.

Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 2004;23(16):2861-2874.

Samraj AK, Keil E, Ueffing N, Schulze-Osthoff K, Schmitz I. Loss of caspase-9 provides genetic evidence for the type i/ii concept of cd95-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 2006;281(40):29652-29659.

Samraj AK, Sohn D, Schulze-Osthoff K, Schmitz I. Loss of caspase-9 reveals its essential role for caspase-2 activation and mitochondrial membrane depolarization. *Mol Biol Cell* 2007;18(1):84-93.

Sasvari Z, Bach S, Blondel M, Nagy PD. Inhibition of rna recruitment and replication of an rna virus by acridine derivatives with known anti-prion activities. *PLoS One* 2009;4(10):e7376.

Sharma V, Khan MSY Synthesis of novel tetrahydroimidazole derivatives and studies for their biological properties. *European journal of medicinal chemistry* 2001; 36(7):651-658.

Schwartz GK, Shah MA. Targeting the cell cycle: A new approach to cancer therapy. *J Clin Oncol* 2005;23(36):9408-9421.

Schwartz GK, Shah MA. Targeting the cell cycle: A new approach to cancer therapy. *J Clin Oncol* 2005;23(36):9408-9421.

Siebert R, Willers CP, Opalka B. Role of the cyclin-dependent kinase 4 and 6 inhibitor gene family p15, p16, p18 and p19 in leukemia and lymphoma. *Leuk Lymphoma* 1996;23(5-6):505-520.

Singh N. Apoptosis in health and disease and modulation of apoptosis for therapy: An overview. *Indian J Clin Biochem* 2007;22(2):6-16.

Sivapackiam J, Gammon ST, Harpstrite SE, Sharma V. Targeted chemotherapy in drug-resistant tumors, noninvasive imaging of p-glycoprotein-mediated functional transport in cancer, and emerging role of pgp in neurodegenerative diseases. *Methods Mol Biol* 2010;596:141-181.

Smyre CL, Saluta G, Kute TE, Kucera GL, Bierbach U. Inhibition of dna synthesis by a platinum-acridine hybrid agent leads to potent cell kill in non-small cell lung cancer. *ACS Med Chem Lett* 2011;2(11):870-874.

Solhaug A, Holme JA, Haglund K, Dendele B, Sergent O, Pestka J, Lagadic-Gossmann D, Eriksen GS. Alternariol induces abnormal nuclear morphology and cell cycle arrest in murine raw 264.7 macrophages. *Toxicol Lett* 2013;219(1):8-17.

Sondhi SM, Singh J, Rani R, Gupta PP, Agrawal SK, Saxena AK. Synthesis, anti-inflammatory and anticancer activity evaluation of some novel acridine derivatives. *Eur J Med Chem* 2010;45(2):555-563.

Stark A, Gregoire L, Pilarski R, Zarbo A, Gaba A, Lancaster WD. Human papillomavirus, cervical cancer and women's knowledge. *Cancer Detect Prev* 2008;32(1):15-22.

Su JC, Chen KF, Chen WL, Liu CY, Huang JW, Tai WT, Chen PJ, Kim I, Shiau CW. Synthesis and biological activity of obatoclax derivatives as novel and potent shp-1 agonists. *Eur J Med Chem* 2012;56:127-133.

Sylvester P. Optimization of the tetrazolium dye (mtt) colorimetric assay for cellular growth and viability. *Drug Design and Discovery* 2011;716:157-168.

Symonds RP, Foweraker K. Principles of chemotherapy and radiotherapy. *Curr. Obstet. Gynaecol.* 2006;16:100-106.

Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J and Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015; 65: 87-108.

Valeri A, Alonso-Ferrero ME, Cerrato L, Martínez S, Bueren JA, Albella B. Development of an in vitro model for the simultaneous study of the efficacy and hematotoxicity of antileukemic compounds. *Toxicol Lett* 2010;199(3):317-322.

Van Cruchten S, Van Den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* 2002;31(4):214-223.

Vermeulen K, Berneman ZN, Van Bockstaele DR. Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif* 2003;36(3):165-175.

Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: A review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 2003;36(3):131-149.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000;408(6810):307-310.

Wang J, Luo T, Li S, Zhhang Y, Wang C, Zhao J. Synthesis, structure-activity relationship

and biological activity of acridine derivatives as potent mdr-reversing agents. *Curr Med Chem* 2013;20(32):4070-4079.

Wang SS, Lee YJ, Hsu SC, Chang HO, Yin WK, Chang LS, Chou SY. Linker-modified triamine-linked acridine dimers: Synthesis and cytotoxicity properties in vitro and in vivo. *Bioorg Med Chem* 2007;15(2):735-748.

Wang W, Ho WC, Dicker DT, MacKinnon C, Winkler JD, Marmorstein R, El-Deiry WS. Acridine derivatives activate p53 and induce tumor cell death through bax. *Cancer Biol Ther* 2005;4(8):893-898.

Ward LS. Understanding the molecular process of tumorigenesis. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2002; 46(4):351-360.

Wong RS. Apoptosis in cancer: From pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res* 2011;30:87.

Wong RS. Apoptosis in cancer: From pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res* 2011;30:87.

Wodarz A and Näthke I. Cell polarity in development and cancer. *Nat Cell Biol.* 2007; 9: 1016-24.

Zhang F, Zhao Y, Sun L, Ding L, Gu Y, Gong P. Synthesis and anti-tumor activity of 2-amino-3-cyano-6-(1h-indol-3-yl)-4-phenylpyridine derivatives in vitro. *Eur J Med Chem* 2011;46(7):3149-3157.

Zhao F, Siu MK, Jiang L, Tam KF, Ngan HY, Le XF, Wong OG, Wong ES, Gomes AR, Bella L, et al. Overexpression of forkhead box protein m1 (foxm1) in ovarian cancer correlates with poor patient survival and contributes to paclitaxel resistance. *PLoS One* 2014;9(11):e113478.

Zhao J, Bowman L, Magaye R, Leonard SS, Castranova V, Ding M. Apoptosis induced by tungsten carbide-cobalt nanoparticles in jh6 cells involves ros generation through both extrinsic and intrinsic apoptosis pathways. *Int J Oncol* 2013;42(4):1349-1359.

ANEXO 01 - Parecer Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFPE

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Universidade Federal de Pernambuco Centro de Ciências da Saúde / UFPE-CCS

PROJETO DE PESQUISA

Título: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICÂNCER DE NOVOS AGENTES TIAZACRIDÍNICOS

Pesquisador: Maira Galdino da Rocha Pitta

Versão: 1

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

CAAE: 01172912.3.0000.5208

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 11006

Data da Relatoria: 26/04/2012

Apresentação do Projeto:

A presente proposta tem como preocupação a busca de novas alternativas terapêuticas para tratamento do câncer, uma doença que representa um grave problema de saúde pública em todas as nações do mundo.

Objetivo da Pesquisa:

Avallar a atividade anticâncer de novos derivados tiazacridínicos, bem como a preocupação a busca de novas alternativas terapêuticas para tratamento do câncer, uma doença que representa um grave problema de saúde pública em todas as nações do mundo. A incidência do câncer tem aumentado devido à crescente exposição da população a fatores de risco e ao aumento da expectativa de vida. Nesse contexto, como estratégia de combate ao câncer, a comunidade científica aposta em pesquisa básica e aplicada voltadas para a descoberta e desenvolvimento de novos farmoquímicos com propriedades anticâncer.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos estão adequados, entretanto, os benefícios devem ser modificados e que sejam ligados diretamente aos pesquisados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A presente pesquisa tem uma elaboração adequada e está bem orientada pela pesquisadora.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória estão anexados:

- 1) Folha de Rosto
- 2) Documento do CNPq como apoio financeiro
- 3) Curriculum vitae dos pesquisadores
- 4) TCLE para alfabetizados e analfabetos

Recomendações:

As recomendações foram aceitas e adequadas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências foram atendidas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado considera aprovado o protocolo em questão.

Projeto foi avaliado, aprovado e liberado para o início da coleta de dados. A APROVAÇÃO definitiva do projeto será dada, por meio de ofício impresso, após a entrega do relatório final ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE.