



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL E ESTUDOS DE MECANISMOS DE AÇÃO DE
DERIVADOS 5-NITROTIOFENO-TIOSSEMICARBAZÔNICOS

KARLA MIRELLA ROQUE MARQUES

RECIFE - PE

2017

KARLA MIRELLA ROQUE MARQUES

DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL E ESTUDOS DE MECANISMOS DE AÇÃO DE
DERIVADOS 5-NITROTIOFENO-TIOSSEMICARBAZÔNICOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Orientador:

Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior

Departamento de Ciências Biológicas - UEPB

Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas - LSVM

Co-orientadora:

Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva

Departamento de Antibióticos - UFPE

Laboratório de Prospecção de Produtos Bioativos - BIOFARMATOX

RECIFE - PE

2017

Catalogação na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Marques, Karla Mirella Roque

Determinação do potencial antitumoral e estudos de mecanismos de ação de derivados 5-nitrotiofeno-tiossemicarbazônicos / Karla Mirella Roque Marques-Recife: O Autor, 2017.

74 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior

Coorientadora: Teresinha Gonçalves da Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Inovação Terapêutica, 2017.

Inclui referências

1. Quimioterapia
 2. Câncer
 3. Toxicidade- testes
- I. Mendonça Junior, Francisco Jaime Bezerra(orientador) II. Silva, Teresinha Gonçalves da (coorientadora) III. Título

615.58

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-251

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

Parecer da comissão examinadora da dissertação de mestrado de

KARLA MIRELLA ROQUE MARQUES

**DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL E ESTUDOS DE MECANISMOS DE AÇÃO DE
DERIVADOS 5-NITROTIOFENO-TIOSSEMICARBAZÔNICOS**

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro, considera a candidata **KARLA MIRELLA ROQUE MARQUES** como:

APROVADA

Recife, 23 de Fevereiro de 2017.

Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior

Orientador

Departamento de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas

Universidade Estadual da Paraíba - UEPB

Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva

Co-orientadora

Departamento de Antibióticos

Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Profa. Dra. Paloma Lys de Medeiros

Departamento de Histologia e Embriologia

Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Profa. Dra. Sinara Mônica Vitalino de Almeida

Universidade de Pernambuco - Campus Garanhuns - UPE

*À minha querida e amada avó materna Edite Alves Marques (in memoriam), minha maior
incentivadora, com amor e saudade dedico mais esta conquista.
À minha amada mãe Vanderlene Marques da Silva, com todo o meu amor, gratidão, respeito
e carinho ofereço. Obrigada por tudo.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da minha vida, pelo seu amor, cuidado e proteção. Por ter me dado força e coragem para seguir adiante, por sempre iluminar e abençoar o meu caminho. Meu Deus, por tudo muito obrigada.

A todos os meus familiares, em especial a minha mãe Vanderlene Marques da Silva, meu avô paterno Valdemiro Santos Marques, minha tia Maria Valdjane Alves Marques e meus padrinhos Valdirene Marques Maciel e Roberto Maciel da Silva, pelo amor, carinho e apoio.

Ao meu orientador Profº Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior, pela confiança, oportunidade, profissionalismo, apoio e incentivo durante o desenvolvimento deste trabalho.

A minha co-orientadora Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva, pela dedicação, oportunidade, apoio, paciência, sabedoria e ensinamentos.

As minhas amigas, Priscila Alves, Anna Karla e Renata Cabral. Obrigada, pela amizade sincera, paciência, compreensão e alegrias compartilhadas.

Aos meus amigos de graduação, Hugo Deleon, Luana Cavalcanti, Jackeline Maria, Amanda Virgínia, Sivoneide Maria, Tayane de Cássia, Rosângela Maria, Rayra Simonelly e Moana Santiago. Obrigada, por terem me permitido fazer parte da caminhada de vocês.

À todos que fazem parte do Laboratório de Prospecção Farmacotoxicológica de Produtos Bioativos (BIOFARMATOX), em especial aos meus queridos, Maria Rodrigues, Sandrine Arruda, Natalie Ribeiro, Jeyce Andrade, Jhonatta Alexandre, Temístocles Santana e Carlson Hélder.

À Profa. Dra. Sinara Mônica Vitalino de Almeida, pela colaboração e realização de experimentos em seu laboratório para a execução deste projeto.

Ao Profº. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo, pela primeira oportunidade, confiança, incentivo e ensinamentos, os quais contribuíram para o meu crescimento profissional.

A universidade Federal de Pernambuco, em especial a todos que fazem parte do Departamento de Antibióticos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, pela possibilidade do desenvolvimento desta pesquisa e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

A todos, muito obrigada.

“Deus marcou o tempo certo para cada coisa”.

(Eclesiastes 3,11).

RESUMO

Nitro-heterocíclicos e tiossemicarbazonas são compostos que despertam o interesse da comunidade científica por apresentarem importantes propriedades citotóxicas e antineoplásicas, entre outras. Neste sentido, com o presente estudo se propôs a avaliar o potencial antitumoral de nove novos derivados 5-nitrotifeno-tiossemicarbazônicos em diferentes linhagens de células tumorais humanas, assim como seus possíveis mecanismos de ação associados. Os ensaios de citotoxicidade com o método do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] frente a sete linhagens de células neoplásicas (HEp-2, HL-60, HT-29, K-562, MCF-7, MOLT-4 e NCIH-292) e células mononucleares do sangue periférico humano utilizando o reagente alamar blue. A análise morfológica foi realizada através de microscopia óptica, por coloração com hematoxilina/eosina. Os estudos de mecanismos de ação foram feitos através dos testes de inibição da topoisomerase II, despolarização de membrana mitocondrial e análise do ciclo celular. O estudo de docking foi realizado usando o sitio ativo da enzima Ribonucleotídeo Redutase, PDB id: 4X3V com auxílio do programa Autodock. Os resultados dos testes de citotoxicidade, revelaram que oito compostos foram capazes de promover a inibição do crescimento celular com percentual superior a 80% em pelo menos uma das linhagens avaliadas, com destaque para o composto LNN-05 que exibiu citotoxicidade frente ao maior número de linhagens com valores de IC_{50} entre 0,5 e 1,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$. No teste do Alamar Blue, os derivados avaliados apresentaram $IC_{50} > 4,0 \mu\text{g}/\text{mL}$ em células saudáveis, mostrando-se menos tóxicos que a doxorrubicina. Os testes de atividade hemolítica em eritrócitos humanos também indicaram ausência de hemólise em 100% para os compostos testados até a concentrações máxima avaliada (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A avaliação morfológica por microscopia óptica, demonstrou que as células de K-562 apresentaram características de morte celular por apoptose, quando tratadas com o derivado LNN-05 nas concentrações de 0,7, 1,4 e 2,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Contudo, os estudos de mecanismo de ação conduzidos com o derivado LNN-05 indicaram que sua atividade não se dá por inibição da enzima topoisomerase II. No entanto, a avaliação do potencial transmembrânico e a análise do ciclo celular evidenciaram que o LNN-05, na concentração de 2,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, causa despolarização mitocondrial em $64,2 \pm 2,5\%$; e indução de parada do ciclo celular na fase G1 em células K-562, na dose de 1,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ com acúmulo de 86,1% de células nesta fase. Estudo de docagem molecular indicou que os compostos se ligam à enzima ribonucleotídeo redutase, através dos resíduos Glicina50, Valina51, Treonina52, Metionina14 e principalmente, a Arginina21 e que o melhor ligante potencial é o composto LNN-03 com $E_{\text{value}} = -7,84 \text{ Kcal/mol}$, sendo LNN-05 um dos derivados com menor afinidade de ligação com $E_{\text{value}} = -6,39 \text{ Kcal/mol}$. Com base nesses resultados foi possível identificar que derivados 5-nitrotifeno-tiossemicarbazônicos possuem promissor potencial citotóxico em células neoplásicas humanas, porém estudos adicionais para elucidação dos possíveis mecanismos de ação ainda necessitam ser conduzidos para completo entendimento de seus modos de ação.

Palavras-chave: Câncer. Quimioterapia. Morte celular.

ABSTRACT

Nitro-heterocyclic and thiosemicarbazone are compounds that have aroused the scientific community interest due to, but not limited to its cytotoxic and antineoplastic activities. In this regard, we propose in this project to evaluate the antitumor potential of nine new 5-nitrothiophene-thiosemicarbazone derivatives against several human cancer cell lines, as well as its possible mechanisms of action. The cytotoxicity tests to evaluate the derivatives activity were the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] test for the seven cancer cell lines (HEp-2, HL-60, HT-29, K-562, MCF-7, MOLT-4 and NCIH-292), and peripheral blood mononuclear human cells utilizing the alamar blue test. To analyse the cells morphology, cells were stained with hematoxylin/eosin dyes and visualized through optical microscopy. The mechanism of action studies was accessed via topoisomerase II inhibition, mitochondrial depolarization and cell cycle analysis. Docking analysis using the active site of the ribonucleotide reductase enzyme, PBD id:4X3V was performed utilizing the Autodock software. The results obtained from the MTT test demonstrated that eight compounds were capable of inhibit cell growth more than 80% in at least one of the cell lines, with a highlight for the LNN-05 compound which exhibited cytotoxic activity against most of the cell lines with the lowest IC₅₀ value (0.5 and 1.9 µg/mL). In the alamar blue test, the derivatives showed IC₅₀ value > 9.0 µg/mL against non-cancer cells (peripheral blood mononuclear cells), which means that the compounds are less toxic than doxorubicin. The haemolytic activity test using human erythrocyte also indicated absence of haemolysis for all tested compounds with a maximum dose of 250 µg/mL. The morphological evaluation showed that K-562 cells presented characteristics of cellular death by apoptosis, when treated with the derivative LNN-05 at 0,7, 1,4 e 2,8 µg/mL concentrations. The mechanism of action studies was carried out using the LNN-05 derivative and the analysis suggests that its activity is not by the inhibition of the topoisomerase II enzyme. However, the evaluation of the transmembrane potential and the cell cycle analysis revealed that LNN-05 causes mitochondrial depolarization of 64.2 ± 2.5% at the concentration of 2.8 µg/mL and cell cycle arrest in G1 phase, totalizing 86.1 ± 0.3% at 1.4 µg/mL against K-562 cells. The docking analysis indicated that the compounds bind to the enzyme through the residues of glicine50, valine51, threonine52, methionine14, and mainly arginine21. In addition, the best ligand was LNN-03 with E_{value} = -7.84 Kcal/mol, and LNN-05 one of the weakest ligand with E_{value} = -6.39 Kcal/mol. Concerning this study, we could identify that the 5-nitrothiophene-thiosemicarbazone derivatives have promising cytotoxic potential against human neoplastic cells; however, further studies are needed to fully elucidate the mechanisms of action of the tested derivatives.

Keywords: Cancer. Chemotherapy. Cell Death.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidência estimada para 2016 de novos casos de câncer entre homens e mulheres.....	21
Figura 2. Esquema de complexos CDK-Ciclina no ciclo celular.....	25
Figura 3. Via extrínseca e intrínseca da apoptose.....	28
Figura 4. Esquema do mecanismo catalítico das topoismerases I e II.....	33
Figura 5. Estrutura do anel tiofeno.....	36
Figura 6. Estrutura química básica das tiossemicarbazonas.	38
Figura 7. Potencial de inibição do crescimento celular dos derivados LNNs em concentração única de 25 µg/mL em linhagens de células neoplásicas.	50
Figura 8. Concentração inibitória média (IC_{50}) do derivado LNN-05 em diferentes linhagens de células neoplásicas humanas.	52
Figura 9. Análise da inibição de topoisomerase II pelo LNN-05.	54
Figura 10. Fotomicrografias de células K-562, após 72 horas de tratamento com o derivado LNN-05.....	55
Figura 11. Potencial transmembrânico do composto LNN-05 em células K-562, após 72 horas de tratamento.....	57
Figura 12. Efeito do composto LNN-05 nas fases do ciclo celular em células K-562, após 72 horas de incubação.....	58
Figura 13. Interação 3D dos derivados LNNs com a enzima ribonucleotídeo redutase (RR). ...	60
Figura 14. . Interação do melhor ligante (menor energia de afinidade) com a RR.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação, estrutura química e atividades dos agentes antineoplásicos ciclo celular específico (CCS) e ciclo celular não específico (CCNS), utilizados na terapêutica do câncer....	32
Tabela 2. Estruturas químicas dos derivados 5-nitrotiofeno-tiossemicarbazônicos.....	40
Tabela 3. Linhagens de células tumorais humanas utilizadas no teste de citotoxicidade <i>in vitro</i> , através do método MTT.....	41
Tabela 4. Configurações do Grid Box para os compostos LNNs.....	45
Tabela 5. IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) dos compostos 5-nitrotiofeno-tiossemicarbazônicos (LNN-01 a LNN-09) e doxorrubicina (controle positivo) em células neoplásicas e em células mononucleares de sangue periférico humano (CMSPH), através do ensaio colorimétrico MTT e alamar blue, após 72 horas de tratamento	51
Tabela 6. Progressão do ciclo celular de K-562 tratadas com LNN-05 (0,7, 1,4 e 2,8 $\mu\text{g/mL}$) e doxorrubicina (0,15 $\mu\text{g/mL}$), após 72 horas de tratamento.....	59
Tabela 7. Energias de afinidade finais (E_F)dos derivados 5-nitrotiofeno-tiossemicarbazônicos com a enzima ribonucleotídeo redutase.....	59

LISTA DE ABREVIASÕES E SIGLAS

μg - Micrograma

μM - Micromolar

Δψm - Potencial transmembrânico

3-AP - Triapina

786-0 - Adenocarcinoma renal

A549 - Câncer de pulmão

ACD - Ácido cítrico, citrato de sódio e dextrose

ANOVA - *Analisis of variance* (Análise de variância)

ATP - Adenosina trifosfato

APAF-1- Fator apoptótico ativado por protease

BAX- *Bcl-2-associated X protein*

Bcl-2 - *B-cell lymphoma 2*

Bid - *BH3 interacting-domain death agonist*

BCS - Bacillus Calmette Guédes

BCRJ - Banco de células do Rio de Janeiro

BPL - Boas práticas de laboratório

CASPASE - *Cysteine-dependent aspartate-directed proteases*

CCS - Ciclo celular específico

CCNS - Ciclo celular não específico

CDC - Fosfatases

CDK - Quinases dependentes de ciclina

CDKI - Inibidores de CDK

Cl₅₀ - Concentração inibitória média

CE₅₀ - Concentração efetiva média

c-myc - Fosfoproteína nuclear

CTP - Camptotecina

CMPSH - Células mononucleares de sangue periférico humano

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dATP - Trifosfato de desoxiadenosina

d-NTPs - Desoxirribonucleotídeos tri-fosfatos

- DOX** - Doxorrubicina
- DISC** - Complexo de sinalização indutor de morte
- DMSO** – Dimetilsulfóxido
- DMS-53** - Carcinoma de pulmão
- DMEN** - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- EGF** - Fator de crescimento epidérmico
- E2F** - Fatores de transcrição
- FADD** - Domínio de morte associado ao Fas
- FEB** - *Free energy of binding*
- HEp-2** - Carcinoma epidermoide de laringe
- HL-60** - Leucemia promielocítica aguda
- HT-15** - Adenocarcinoma de cólon humano
- HT-29** - Adenocarcinoma de cólon humano
- HTP** - Derivados hematoporfirínicos
- IAP** - Proteínas inibidoras de proteínas
- INCA** - Instituto Nacional do Câncer
- IC** - Inibição do crescimento celular
- IC₅₀** - Concentração média inibitória
- IC₉₅** - Intervalo de confiança
- K-562** - Leucemia mielóide crônica
- LBM** - Laboratório de Biologia Molecular
- LNN** - Derivado 5-nitrotifeno-tiosemicarbazônico
- LQIT** - Laboratório de Química em Inovação Terapêutica
- LSVM** - Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas
- MCR-5**- Fibroblastos humanos
- MCF-7** - Carcinoma ductal mamário
- MOMP** - Permeabilização da membrana externa mitocondrial
- MOLT-4** - Leucemia linfoblástica aguda
- MTT** - Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H tetrazolio
- NCI** - Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos
- NCCD** - *Nomenclature Committee on Cell Death*

NCIH-292 - Carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano
NCIH-460 - Carcinoma de pulmão de não pequenas células
OMS - Organização Mundial de Saúde
p21 - Proteína recombinante humana
p27 - Proteína inibidora de CDK
p57 - Proteína supressora de tumor
p53 - Proteína tumoral 53
PBS - *Phosphate Buffer Solution* (Tampão fosfato)
PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas
pUC19 - DNA plasmidial
Rb - Proteína retinoblastoma
RR - Enzima ribonucleosídeo difosfato redutase
RNAm - Ácido ribonucleico
RPMI - *Roswell Park Memorial Institute Medium*
rTNF - Receptores de fatores de necrose tumoral
SBDD - *Structure-basead drug desing*
SF-268 - Células de glioblastoma
SK-N-MC - Neuroepitelioma
tBid - Proteína pró-apoptótica
TOPO - Topoisomerase
TNF α - Fator de necrose tumoral alfa
TPP - Timidina-trifosfato
TSC – Tiossemicarbazonas
T98G - Glioblastoma
U87 – Glioblastoma multiforme
WHO - *World Heath Organization*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 Geral	19
2.2 Específicos.....	19
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
3.1 Câncer: conceito e considerações gerais	20
3.2 Epidemiologia do câncer	21
3.3 Carcinogênese	22
3.4 Biologia do câncer	22
3.4.1 <i>Proto-oncogenes e genes de supressão tumoral</i>	22
3.4.2 <i>Ciclo celular e câncer</i>	23
3.4.3 <i>Morte celular e câncer</i>	25
3.5 Quimioterapia do câncer	29
3.6 Classificação de agentes antineoplásicos.....	29
3.6.1 <i>Agentes naturais</i>	30
3.6.2 <i>Agentes alquilantes</i>	30
3.6.3 <i>Antimetabólitos</i>	30
3.6.4 <i>Agentes hormonais</i>	31
3.6.5 <i>Antibióticos naturais</i>	31
3.7 Inibidores de topoisomerases	33
3.8 Importância dos testes de citotoxicidade <i>in vitro</i>	34
3.9 Docagem molecular	35
3.10 Compostos com potencial anticâncer.....	36
3.10.1 <i>Nitro-heterociclos e anel tiofeno</i>	36
3.10.2 <i>Tiosemicarbazonas</i>	37
4. METODOLOGIA	40
4.1 Compostos	40
4.2 Cultura de células	41
4.3 Obtenção de células mononucleares de sangue periférico humano (CMSPH)	41
4.4 Teste de citotoxicidade em células neoplásicas	42
4.5 Ensaio de citotoxicidade em CMSPH	43

4.6 Avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos humanos	43
4.7 Docagem molecular	44
4.8 Ensaio de topoisomerase	45
4.9 Análise morfológica - Coloração por hematoxilina/eosina	46
4.10 Avaliação do potencial transmembrânico ($\Delta\psi m$)	46
4.11 Análise do efeito citostático	46
4.12 Análise estatística	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.1 Estudo da atividade citotóxica e hemolítica dos novos derivados LNNs.....	48
5.2 Análise da inibição de topoisomerase II.....	53
5.3 Análise morfológica - Coloração por hematoxilina/eosina	54
5.4 Análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi m$)	55
5.5 Avaliação da progressão do ciclo celular realizado por citometria de fluxo	57
5.6 Estudo de docagem molecular	59
6. CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS.....	63

1. INTRODUÇÃO

Câncer é um conjunto de mais de 100 tipos de diferentes doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células com potencial invasivo. O surgimento do câncer está relacionado a condições multifatoriais, que podem agir em conjunto ou em sequência para iniciar ou promover o processo de carcinogênese (INCA, 2012; INCA, 2015). Atualmente, o câncer é considerado como um grande problema de saúde pública em todo o mundo, tornando-se assim imprescindível o desenvolvimento de novas pesquisas na tentativa de compreender melhor os mecanismos de sobrevivência das células neoplásicas (BARROS, 2010; WHO, 2012; INCA, 2015).

Dentre os principais tratamentos do câncer, destaca-se a quimioterapia que consiste no uso de compostos químicos, denominados de quimioterápicos. Quando aplicada ao câncer, essa modalidade terapêutica é chamada de quimioterapia antineoplásica e pode ser utilizada através do emprego de um ou mais fármacos, que têm o objetivo primário de alcançar as células cancerígenas e conservar as saudáveis (SAK, 2012; INCA, 2013). No entanto, a resistência das células tumorais aos medicamentos utilizados e a citotoxicidade dos antineoplásicos em células normais, tem-se mostrado como os principais problemas para a eficácia do tratamento. Dessa forma, se faz necessário a busca constante por agentes antitumorais mais eficazes, seguros e com menores efeitos colaterais (HOLOHAN et al., 2013; RUMJANEK et al., 2013).

Neste sentido, os nitrocompostos e os derivados tiossemicarbazonas tornaram-se alvos de pesquisas por apresentarem variado espectro de atividades químicas e biológicas, com evidência para ação antifúngica (EL-SHARIEF et al., 2013), antibacteriana (SIVADAS; SUBBAYA, 2011; ARORA et al., 2013; EL-SHARIEF et al., 2013), antimarial (LIESEN et al., 2010) e especialmente antineoplásica (SILVA et al., 2010).

Os nitrocompostos são moléculas que contém um grupo nitro ligado diretamente a uma cadeia carbônica principal, podendo essa cadeia ser acíclica, aromática ou heteroaromática. Esses compostos foram inseridos na terapêutica da década de 40, e comumente são associados ao anel tiofeno, molécula amplamente utilizada na obtenção de novos fármacos por apresentar-se como protótipo (CHAUDHARY et al.; 2012). Atualmente, os nitro-heterocíclos assim formados despertam o interesse da comunidade científica por demonstrarem potencial

anticâncer *in vitro* e *in vivo*, mostrando-se uma classe promissora para o desenvolvimento de novos agentes antitumorais.

As tiossemicarbazonas compõem uma importante classe de compostos sintéticos que exibem grande versatilidade química e que também apresenta uma vasta gama de atividades biológicas associadas, tais como: antifúngica, antibacteriana, antimalária e anticâncer (MENDES et al., 2009; LIESEN et al., 2010; SILVA et al., 2010; EL-SHARIEF et al., 2013). Grande parte dos mecanismos de ação das tiossemicarbazonas se dá por inibição enzimática, sendo a inibição da enzima ribonucleotídeo redutase um dos principais mecanismos de ação envolvidos na atividade antitumoral dessas moléculas (AYE et al., 2012).

Dessa forma, tendo em vista o cenário no qual o câncer está inserido e a necessidade do desenvolvimento de novos agentes com propriedades anticâncer, o presente estudo teve por finalidade avaliar a atividade antitumoral e estudar alguns dos prováveis mecanismos de ação de novos derivados 5-nitro-tiofeno-tiossemicarbazônicos (compostos que contem na mesma estrutura química os dois farmacóforos: nitro-tiofenos e tiossemicarbazonas), frente a algumas linhagens de câncer de importância médica.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Analisar *in vitro* a atividade anticâncer de derivados 5-nitrotiofeno-tiosemicarbazônicos e seus possíveis mecanismos de ação.

2.2 Específicos

- Avaliar a atividade citotóxica dos derivados 5-nitrotiofeno-tiosemicarbazônicos em linhagens de células neoplásicas e em células mononucleares de sangue periférico humano (CMSPH);
- Determinar a atividade hemolítica dos compostos 5-nitrotiofeno-tiosemicarbazônicos em eritrócitos humanos;
- Estudar, por meio de métodos de docagem molecular, as interações dos derivados 5-nitrotiofeno-tiosemicarbazônicos frente a enzima ribonucleotídeo redutase;
- Investigar a ação do composto LNN-05 sobre a atividade da enzima topoisomerase II, por eletroforese em gel;
- Analisar a morfologia de células K-562 tratadas com o derivado LNN-05, através da coloração diferencial por hematoxilina/eosina;
- Analisar o potencial transmembrânico do derivado 5-nitrotiofeno-tiosemicarbazônico (LNN-05) em células K-562;
- Analisar os efeitos do composto LNN-05 sobre o ciclo celular das células leucêmicas humanas K-562.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Câncer: conceito e considerações gerais

Câncer é uma palavra de origem grega (*karkinos*), que significa “caranguejo” em analogia ao modo infiltrante das células neoplásicas, com a forma de fixação das patas do crustáceo. A descoberta mais antiga do câncer ocorreu no Egito há aproximadamente 1600 a.C., com a identificação de oito casos de tumores de mama (JEMAL et al., 2010; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014).

Atualmente, o câncer é considerado uma doença complexa caracterizada pelo crescimento desordenado de células (INCA, 2012). Segundo Hanahan e Weinberg (2011), as mutações nos oncogenes (superexpressão) e nos genes supressores de tumor (silenciamento), favorecem a reativação ou modificação de programas celulares que controlam os processos de multiplicação, migração, diferenciação e apoptose (LUO; SOLIMINI; ELLEDGE, 2009). Dessa forma, as células malignas tornam-se diferentes das células normais por mostrarem capacidade de multiplicação ilimitada, autossuficiência quanto aos fatores de crescimento, manutenção da angiogênese, evasão da apoptose e potencial de invasão e migração para diferentes tecidos do organismo (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Geralmente, o desenvolvimento do câncer está relacionado à exposição a fatores carcinógenos exógenos e endógenos. O primeiro grupo corresponde a 80% dos casos e inclui os hábitos alimentares (dietas inadequadas), estilo de vida (consumo excessivo de bebidas alcoólicas, sedentarismo, tabagismos, uso de drogas), agentes físicos (radiação ionizante e não ionizante), agentes químicos (produtos químicos) e agentes biológicos (*Helicobacter pylori*, vírus *Epstein Barr*, vírus do papiloma humano, vírus da hepatite B, parasitas como *Schistosoma haemotobium* e *Clonorchis sinensis*). O segundo grupo compreende a constituição genética do indivíduo, idade, equilíbrio do sistema endócrino, danos ao sistema imunológico, condição fisiológica e inflamações de origem desconhecida, tais como, colite ulcerosa e pancreatite (JEMAL et al.; 2010; INCA, 2013).

3.2 Epidemiologia do câncer

O câncer constitui um dos grandes problemas de saúde pública em todo o mundo, sendo responsável por cerca de 10 milhões de óbitos por ano. Sua problemática tende a aumentar devido à crescente exposição aos fatores de risco associados ao aumento da expectativa de vida da população (INCA, 2012). Em 2008, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou a incidência de 12,4 milhões de novos casos de câncer e 7,6 milhões de mortes por câncer no mundo. Destes, os mais diagnosticados foram o câncer de pulmão (principal causa de morte), mama e colorretal. Em 2030 estima-se a ocorrência de 27 milhões de novos casos e 17 milhões de mortes no mundo (WHO, 2008; INCA, 2012).

No Brasil, as neoplasias malignas são consideradas a segunda causa de morte entre as doenças não-transmissíveis. Entre 1979 e 2003, foi observado um aumento de 30% na taxa de mortalidade por câncer, o que resultou no aumento em mais de 103% nos gastos para a prevenção e tratamento, configurando-se assim, como um grande desafio para a saúde pública brasileira (INCA, 2007). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), as estimativas para os anos de 2016 e 2017, indicam para 596 mil novos casos de câncer, distribuídos entre homens (295.200) e mulheres (300.870) (Figura 1), com maior incidência para o câncer de pele não melanoma (175.750 novos casos), que contempla 29% do total estimado. Seguido pelo câncer de próstata (61.200), mama (57.960), intestino grosso (34.280), pulmão (28.220), estômago (20.520), colo do útero (16.340), e cavidade oral (15.490) (INCA, 2015).

Figura 1. Incidência estimada para 2016 de novos casos de câncer entre homens e mulheres.

Localização Primária	Casos	%		Localização Primária	Casos	%	
Próstata	61.200	28,6%	Homens	Mulheres	Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Colón e Reto	17.620	8,6%
Colón e Reto	16.660	7,8%			Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

Fonte: Adaptado de INCA, 2015.

3.3 Carcinogênese

O surgimento do câncer ocorre geralmente através de um processo lento, podendo-se levar vários anos até que seja detectado. Este processo é conhecido como carcinogênese e acontece em três etapas diferentes: iniciação, promoção e progressão (PITOT, 2011; INCA, 2012). A iniciação é uma etapa rápida e irreversível, marcada pela ocorrência de danos ao DNA devido ao contato das células com os agentes carcinógenos. Nesta fase, as células encontram-se geneticamente alteradas. A promoção é um estágio reversível, onde as células sofrem os efeitos dos agentes cancerígenos, conhecidos como oncopromotores. Esta fase é caracterizada pela transformação das células em malignas, de forma lenta e gradual, o qual é necessário uma longa e continuada exposição ao agente carcinogênico. A progressão é considerada um estágio irreversível e dar-se pela multiplicação descontrolada das células, com o aumento da massa celular primária que apresenta alto potencial invasivo e metastático (GARCÍA; HAZA; MORALES, 2011; INCA, 2012; PITOT, 2011).

3.4 Biologia do câncer

A multiplicação celular em sua normalidade é uma atividade complexa, que requer a ação coordenada de vários genes, os quais são responsáveis por controlar o processo em resposta a estímulos externos e internos (CHAMAS, 2013).

No caso de tumores, o crescimento descontrolado das células, bem como a sua independência dos controles externos é resultado de mutações ou ativações de genes específicos que controlam o ciclo celular (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Dessa forma, a desregulação desse evento pode levar a instabilidade genômica, a qual exerce um papel fundamental na etiologia de diversos cânceres hereditários ou genéticos (JAFARNEJAD; LI, 2011; DANTAS, 2014).

3.4.1 Proto-oncogenes e genes de supressão tumoral

As alterações e danos ao DNA observadas nas células cancerígenas acontecem em sua maioria em genes especiais, denominados proto-oncogenes e genes supressores de tumor (JAFARNEJAD; LI, 2011; INCA, 2012; DANTAS, 2014).

Os proto-oncogenes são responsáveis por codificar as proteínas que regulam a multiplicação e diferenciação celular, quando mutados têm a capacidade de transformarem-se

em oncogenes, que são os causadores do processo de malignização das células normais (CALA; CEPENA; ARIAS, 2012; SHIRAHAMA; YAMAMOTO; NAMBA, 2013).

Os genes supressores de tumor são geralmente reguladores negativos da proliferação e do crescimento celular, e estão envolvidos na regulação da expressão gênica, no programa de morte celular e na estabilidade genômica. A inativação desses genes em consequência de mutações, leva à incapacidade dos mecanismos de controle que regulam a divisão celular (CALA; CEPENA; ARIAS, 2012; SHIRAHAMA; YAMAMOTO; NAMBA, 2013).

3.4.2 Ciclo celular e câncer

O ciclo celular é um evento universal dividido em quatro fases: G₁, S (síntese), G₂ e M (mitose), no qual ocorre a replicação de uma célula-filha geneticamente idêntica à célula-mãe, através dos processos de duplicação do DNA e divisão nuclear (mitose) (LACERDA, 2012).

Para que as células em repouso (G₀) entrem no ciclo celular é necessário o estímulo de fatores de crescimento, tais como PDGF, EGF, insulina, hormônios esteroides e citocinas sintetizadas pelas próprias células ou por células a sua volta. Essas moléculas ligam-se aos seus receptores de membrana específicos e desencadeiam a ativação de fatores de transcrição, como c-myc, c-jun, c-fos, que promovem a síntese de enzimas e moléculas essenciais, para que a célula progrida da fase G₀ para as fases G₁-S-G₂ e mitose (MALUMBRES; BARBACID, 2009).

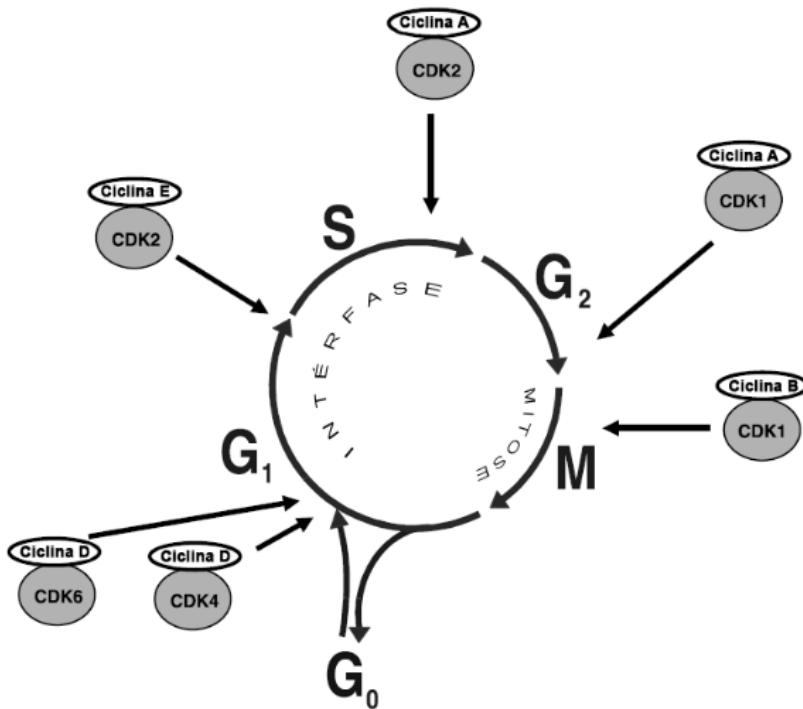
O desenvolvimento dos eventos do ciclo celular é mediado por diferentes fatores, que têm a sua síntese e destruição ocorrida em momentos determinados. Dentre os principais estão: as ciclinas A, B, e D; proteínas quinases dependentes de ciclinas (CDK-1, CDK-2, CDK-4 e CDK-6); fosfatases (cdc-25, A, B e C); proteínas inibidoras de CDKs, as CKIs (p21, p27, p57); e fatores de transcrição (c-myc, E2F, Rb e p53) (FERREIRA et al, 2010). Os complexos formados por CDK-ciclina-CKI estão envolvidos na transição do ciclo celular através de sua inativação e ativação. A ativação dos complexos CDK-4/Ciclina-D ou CDK-6/Ciclina-D no progresso da fase G₁ promove a fosforilação gradativa de retinoblastoma (Rb), que forma um complexo inibitório com fatores de transcrição da família E2F. Essa fosforilação é finalizada pela ativação do complexo CDK-2/Ciclina-E que inativa irreversivelmente a Rb, e dissocia o fator E2F, permitindo o início da transcrição de genes na fase S. No início desta fase, a ativação do complexo CDK-2/ciclina-A provoca, através de fosforilação, a inativação de E2F, o que impede a interação deste fator com o DNA. O final da fase de síntese e início da fase G₂ é marcado pelo aumento nos níveis de ciclina A e B e compartilhamento de proteínas envolvidas na duplicação de DNA

pelos complexos CDK-2/Ciclina-A e CDK-1/Ciclina-B. Durante a fase G₂ o complexo CDK-1/Ciclina-B promove a fosforilação de variadas proteínas nucleares, bem como a condensação dos cromossomos, a formação do fuso mitótico e o início da mitose. Por fim, a degradação da ciclina B cessa a atividade enzimática do complexo, e marca o término do ciclo celular (MALUMBRES; BARBACID, 2009; JOHNSON; SKOTHEIN, 2013; MEDINA; TURNER; GORDAN, 2016). A Figura 2 mostra os complexos ciclina-CDKs envolvidos com o ciclo celular.

A progressão do ciclo celular é interrompida em momentos específicos, denominados como pontos de checagem (*checkpoints*). Estes pontos atuam como mecanismos de controle nas passagens das fases G₀-G₁ (ponto de restrição R₁), G₁-S e G₂-M, para correção de possíveis erros no DNA, a fim de evitar a fixação e propagação das mutações, o que colabora para a malignização da célula. Os *checkpoints* são dependentes de reações em cascata mediada por enzimas quinases e fosfatases, e geralmente há o envolvimento de proteínas CKIs, que são divididas em dois tipos: as proteínas inibidoras de CDK-4 e CDK-6, e as proteínas que afetam a atividade de quinases dependentes das ciclinas D, E e A (MALUMBRES; BARBACID, 2009; YOSHIDA et al.; 2010).

Na maioria das vezes, esse mecanismo de controle do ciclo envolve a ação do gene *p53* que atua na transcrição de vários genes, como o *p21*. É mediante a conjugação com o promotor desse gene que *p53* bloqueia a inativação de pRb por CDK-4. Esta atividade causa a parada do ciclo celular na etapa G₁ e possibilita o reparo do DNA, se identificado algum erro. Contudo, caso a via com a proteína pRb não esteja intacta, a *p53* pode atuar induzindo as células à morte. Além disso, *p53* também está envolvido no *checkpoint* na transição da fase S para G₂, portanto, quando se encontra mutado, as células escapam da restauração dos danos, o que pode iniciar um clone maligno (FERREIRA, 2010; COSTA-SOUZA, 2011; LACERDA, 2012; DONEOWER, 2014).

Figura 2. Esquema de complexos CDK-Ciclina no ciclo celular.



A progressão do ciclo celular ocorre mediante a presença de ciclinas A, B e D que associadas as proteínas dependentes de ciclina (CDK), formam os complexos CDK-Ciclina, que através da sua ativação e inativação permitem a transição das células para as diferentes etapas do ciclo. A ativação dos complexos CDK-4/Ciclina-D ou CDK-6/Ciclina-D na fase G1 é essencial para a fosforilação gradativa da retinoblastoma (Rb), a qual é finalizada pela formação do complexo CDK-2/Ciclina-E no início da fase S. Em sequência a ativação de CDK-2/Ciclina-A, CDK-1/Ciclina-A e CDK-1/Ciclina-B possibilitam o progresso das células para as fases G2 e M. Fonte: Vermeulen, Bockstaele & Berneman, 2003.

3.4.3 Morte celular e câncer

A morte celular é um fenômeno fisiológico necessário para o equilíbrio entre a proliferação e perda celular e para o desenvolvimento normal e manutenção da forma dos tecidos do indivíduo (COULIDIATI, 2014). Segundo o NCCD, (*Nomenclature Committee on Cell Death*) os mecanismos de morte celular são classificados de acordo com a morfologia das células atingidas e seus aspectos bioquímicos. Dessa forma, distinguindo-se em: senescênci, catástrofe mitótica, autofagia, necrose e apoptose (KROEMER et al., 2009).

A senescênci é o tipo de morte celular caracterizada pela perda irreversível da capacidade de divisão celular das células somáticas. Esse processo é essencial para o envelhecimento e o seu controle envolve o desgaste dos telômeros e ativação de genes supressores de tumor (SARETZKI, 2010).

A catástrofe mitótica refere-se ao mecanismo de morte celular em que a célula tenta se dividir sem que tenha ocorrido o reparo do DNA, em consequência ao funcionamento defeituoso do *checkpoint*, o que resulta na formação de células multinucleadas com cromossomos condensados (SINGH; GEORGE; SHUKLA, 2010; GALLUZZI; PEDRO; KROEMER, 2014).

A autofagia acontece em resposta a um distúrbio metabólico e se caracteriza pela degradação dos componentes celulares. Neste tipo de morte, ocorre o encapsulamento das porções do citoplasma por membranas, que resulta na formação de autofagossomos. Estas estruturas se fusionam com os lisossomos e têm o seu conteúdo quebrado por hidrolases lisossomais (KROEMER et al.; 2009).

A necrose é um tipo de morte celular definida como alterações morfológicas decorrentes da destruição celular de um tecido vivo e geralmente é deflagrada através da ação progressiva de enzimas nas células que sofreram alguma lesão letal (KROEMER et al.; 2009). Contudo, estudos recentes sugeriram que a necrose pode também ser desencadeada pelos mesmos sinais de morte que induzem a apoptose, o que caracteriza uma forma programática de morte necrótica, definida como necroptose (HONG, 2013; NIKOLETOPOULOU et al.; 2013; GALLUZZI et al.; 2014). No entanto, em linhas gerais, esse processo é caracterizado pela interrupção do suprimento energético, falha da homeostase do tecido celular, inchaço das células com perda da integridade da membrana, organelas edemaciadas, condensação da cromatina e rompimento da membrana plasmática. Durante esse mecanismo o conteúdo celular é liberado, o que causa danos às células vizinhas e reação inflamatória aguda local (KROEMER et al., 2009).

A apoptose, também denominada de morte celular programada se caracteriza por uma série de modificações celulares que incluem a retração da célula, condensação da cromatina, formação de prolongamentos da membrana plasmática (*blebs*) e formação de vesículas na membrana celular e de corpos apoptóticos, que contêm o conteúdo nuclear e citoplasmático, sendo estes fagocitados rapidamente por macrófagos, a ponto de evitar uma resposta inflamatória (KROEMER et al., 2009; INDRAN et al., 2011). Esta etapa ocorre mediante a externalização da fosfatidilserina (fosfolipídio presente na membrana celular), que atua como um sinalizador para o reconhecimento das células fagocitárias (INDRAN et al., 2011).

Na apoptose estima-se que 50 a 70 bilhões de células morram a cada dia no adulto, de modo que em um ano cada pessoa produzirá e erradicará uma massa de células equivalente

ao peso do corpo inteiro. Dessa forma, esse mecanismo deve ser altamente regulado, visto que defeitos no maquinário apoptótico podem contribuir para o aumento da sobrevivência de células, colaborando assim, para expansão de células anormais (KREUZALER; WATSON, 2012).

A regulação da apoptose acontece por vários fatores genéticos e bioquímicos, com a participação das caspases, que são um tipo especial de cisteína protease sintetizadas como pró-enzimas. Essas enzimas classificam-se em dois grupos: as caspases iniciadoras (2, 8, 9 e 10) e caspases executoras (3, 6 e 7), e têm a sua desregulação prevenida por membros de proteínas inibidoras da apoptose (IAPs), que se ligam as caspases impedindo diretamente a sua ativação (WONG, 2011). As proteínas da família Bcl-2 participam também do processo regulatório da apoptose como indutoras ou repressoras. Essas proteínas são divididas de acordo com a homologia e função em duas subfamílias: a subfamília que inclui Bcl-2 e Bcl-xL, que exercem atividade anti-apoptose; e a subfamília representada por BAX e BAK, que atuam como pró-apoptóticas (WONG, 2011; SANKARI et al., 2012).

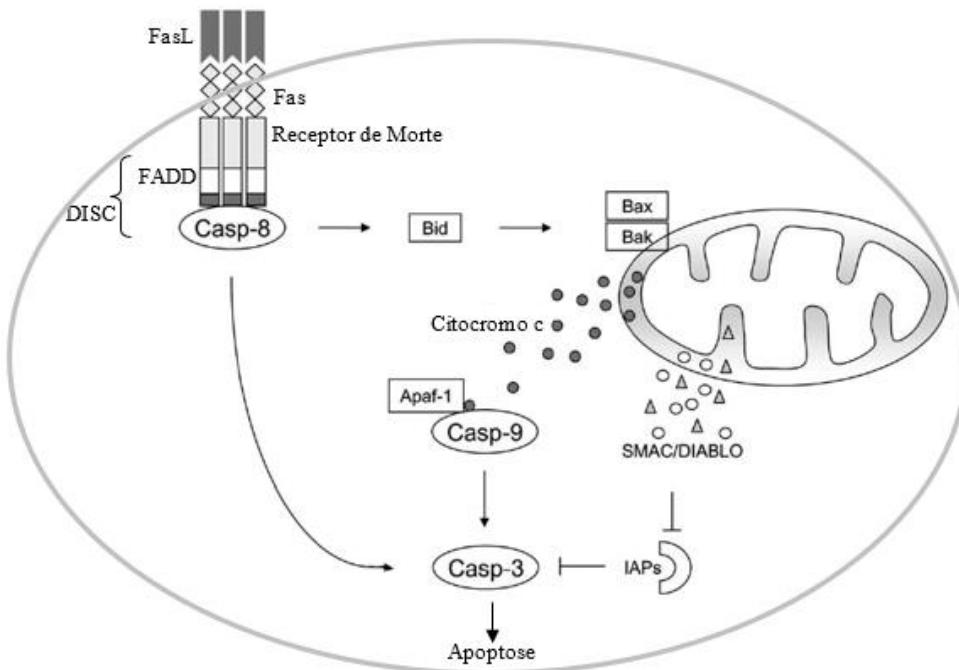
A ativação da apoptose pode ser iniciada por duas vias, a via extrínseca ou citoplasmática que é acionada pela ativação de receptores de morte na superfície da membrana plasmática e a via intrínseca ou mitocondrial, que ocorre através de sinais de estresse originário do interior ou exterior da célula, como danos no DNA, perda de adesão, ausência de fatores de crescimento, inibição de síntese macromolecular e outros (Figura 3) (INDRAN et al., 2011; WONG, 2011; SANKARI et al., 2012). Essas vias podem se interligar através de uma proteína pró-apoptótica citosólica (Bid), que normalmente é clivada pela caspase 8. Essa clivagem resulta na formação de uma proteína truncada (tBid), que translocada para a mitocôndria, ativa o Bax, iniciando assim, a liberação de citocromo c com perda da função mitocondrial. A associação dessas vias tem como resultado a ampliação do sinal e ativação das caspases essenciais para a indução de morte celular (WONG, 2011; SANKARI et al., 2012).

A via extrínseca é iniciada pela ligação do TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) aos receptores da superfamília de fatores de necrose tumoral (rTNF) (RIBEIRO et al., 2012). Essa ligação irá atrair o FADD (proteína do domínio de morte associado ao Fas) e as pró-caspases 8 e 10, formando o DISC (complexo sinalizante de morte induzida). Este complexo possibilita a ativação das caspases iniciadoras 8 e 10, que por sua vez ativam as caspases executoras 3, 6 e 7 que irão finalizar o processo apoptótico (FRANCISCHETTI et al., 2010; INDRAN et al., 2011; WONG, 2011; SANKARI et al., 2012). Nessa via para que não ocorra uma ativação desregulada

das caspases, as IAPs inibem a ativação direta da caspase 3 ativa, impossibilitando a ativação das demais caspases (WONG, 2011; SANKARI et al., 2012).

A via intrínseca é iniciada por sinais de estresse identificados pela mitocôndria, tais como danos no DNA e ausência fatores de crescimento, que favorecem para liberação do citocromo C, em decorrência a permeabilização da membrana externa mitocondrial (MOMP), após a formação do complexo das proteínas BAX e BAK (WONG, 2011; SANKARI et al., 2012). O citocromo C liberado interage com o APAF-1 (Fator de ativação da protease associada a apoptose 1) e a pró-caspase 9, para formar uma holoenzima, o apoptosoma, que na presença de ATP/dATP ativa a caspase 9, a qual irá ativar as caspases 3 e 7, desencadeando a morte celular (WONG, 2011; SANKARI et al., 2012; GALLUZZI et al., 2014). As IAPS atuam nessa via através da inibição da ativação da caspase 9, que ocasiona o bloqueio da ativação das pró-caspases 3, 6 e 7 (WONG, 2011; SANKARI et al., 2012).

Figura 3. Via extrínseca e intrínseca da apoptose.



É observado que a via extrínseca da apoptose é iniciada pela ativação de receptores de morte na superfície da membrana plasmática, que irão atrair o FADD (proteína do domínio de morte associado ao Fas) e as pró-caspases 8 e 10 para a formação do complexo sinalizante de morte induzida (DISC), que possibilitará a ativação das caspases iniciadoras 8 e 10 e executoras 3, 6 e 7. Contudo, sinais de estresse como danos ao DNA identificados pela mitocôndria, podem desencadear a via intrínseca, mediante a liberação do citocromo C, após a formação do complexo BAX/ BAK. Dessa forma, o citocromo C ao interagir com o APAF-1 (Fator de ativação da protease associada a apoptose 1) e a pró-caspase 9 ativará a caspase 9, que por sua vez ativará as caspases 3 e 7. Adaptado de Bruin; Medema, 2008.

A apoptose é considerada o tipo de morte mais estudado na terapia anticâncer, sendo um alvo potencial para o desenvolvimento de novos agentes antineoplásicos, visto que a evasão à apoptose é uma das principais características das neoplasias (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Além disso, a resistência das células tumorais aos fármacos utilizados tem-se mostrado um dos principais problemas, o que se faz necessário a busca constante por medicamentos eficazes, seguros e com menores efeitos colaterais (URRUTICOECHEA et al., 2010).

3.5 Quimioterapia do câncer

A quimioterapia aplicada desde os anos de 1940 representou uma das bases para o tratamento do câncer (SAK, 2012). Essa modalidade terapêutica consiste comumente na combinação de vários agentes antineoplásicos, atuantes em diferentes etapas do ciclo celular, os quais têm o objetivo primário de alcançar as células cancerígenas e conservar as saudáveis. Dessa forma, por definição, o tratamento quimioterápico deve interferir com o programa bioquímico que a célula está envolvida a ponto de causar seletivamente a morte celular (SAK, 2012). Entretanto, a maioria dos fármacos anticâncer não apresenta seletividade exclusiva para as células tumorais, acometendo também as células normais, principalmente, as de rápido desenvolvimento como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imune (BRANDÃO et al., 2010).

Além disso, a resistência tumoral à quimioterapia classificada em intrínseca e adquirida também se apresenta como um dos principais fatores que comprometem a eficácia do tratamento (HOLOHAN et al., 2013; RUMJANEK et al., 2013). Atualmente, sabe-se que a resistência a múltiplas drogas (MDR) pode ser desencadeada por diferentes mecanismos, dentre os quais: efluxo de droga, alteração na enzima-alvo, alteração no metabolismo da droga, aumento na reparação do DNA e incapacidade para sofrer apoptose (UGHACHUKWU & UNEKWE, 2012; HOLOHAN et al., 2013; RUMJANEK et al., 2013; HOUSMAN et al., 2014). No entanto, mesmo diante dessa problemática a quimioterapia é considerada um tratamento benéfico e o seu sucesso está associado, na maioria dos casos, ao descobrimento precoce do câncer (URRUTICOECHEA et al., 2010).

3.6 Classificação de agentes antineoplásicos

Os agentes antineoplásicos utilizados para o tratamento do câncer são classificados em: fármacos ciclo-cellular específico (CCS) e fármacos ciclo-cellular não específico (CCNS). Dentre

os medicamentos CCS e CCNS são conhecidos: os agentes naturais, os alquilantes, os antimetabólitos, os hormonais e os antibióticos naturais (NUNES, 2012).

3.6.1 Agentes naturais

Os produtos naturais compõem o grupo dos antineoplásicos ciclo-celular específico utilizados na terapia do câncer. Dentre os mais variados agentes naturais, podemos citar os alcaloides vegetais, tais como: os alcaloides da vinca (vinblastina e vincristina), que agem através da inibição do fuso mitótico, ligando-se às proteínas microtubulares; os taxanos (paclitaxel e docetaxel), que também atuam na inibição do fuso mitótico, bem como na dimerização da tubulina e na estabilização dos túbulos (Tabela 1) (BRANDÃO et al., 2010; COSTA-LOTUFO et al., 2010).

3.6.2 Agentes alquilantes

Os agentes alquilantes são os fármacos ciclo celular não específicos mais ativos e mais utilizados no tratamento do câncer, provocando a morte celular através da interação com o ácido desoxirribonucleico. A alquilação resulta em ligações cruzadas com os filamentos de DNA. Os antineoplásicos alquilantes atuam no ciclo celular inespecificamente, e geralmente apresentam uma melhor atividade quando associado com outros agentes ciclo-celular específicos. Dentre os principais agentes alquilantes, encontram-se: a cisplatina e seus análogos: carboplatina e ifosfamida (Tabela 1) (SCHMITT; FREZZA; DOU, 2013; BOWDEN, 2014).

3.6.3 Antimetabólitos

Os antimetabólitos são conhecidos como falsos substratos, pois utilizam os substratos naturais de algumas enzimas, e ao se ligar a estas promovem o bloqueio do substrato, ou alteram o funcionamento normal de vias metabólicas essenciais da célula. Seu mecanismo de ação está relacionado geralmente ao bloqueio de vias biossintéticas específicas, em especial às relacionadas a biossíntese de nucleotídeos e de DNA. Dessa forma, impedem a multiplicação e função normais da célula, resultando na morte celular. São exemplos de antimetabólitos: os análogos do ácido fólico (metotrexato) (MOURA et al., 2011; WOOD; WU, 2015).

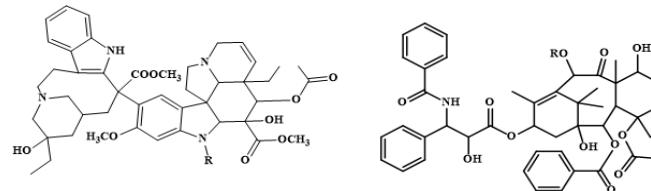
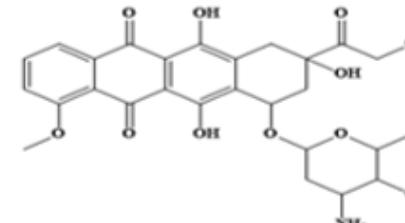
3.6.4 Agentes hormonais

A atuação dos fármacos hormonais é baseada na ligação entre o hormônio e o seu receptor citoplasmático específico. Esta ligação é responsável por desencadear a síntese do RNAm que conduz a formação de novas proteínas importantes para o desenvolvimento celular. Dessa forma, os tumores que são considerados hormônio-dependentes podem ter o seu crescimento inibido por hormônios antagonistas, por hormônios de ações opostas ou por fármacos inibidores de hormônios. Entre os agentes hormonais encontram-se: os hormônios sexuais, tais como estrogênios e androgênios; e os inibidores da ação hipotalâmica e hipófisária (LEITE et al., 2011; SCHORR; PEDRINI, REGINATTO, 2015).

3.6.5 Antibióticos naturais

Os antibióticos naturais constituem o grupo de fármacos ciclo-celular não específico. Essas moléculas, embora apresentem diferentes estruturas químicas, têm em comum a presença de anéis insaturados que possibilitam a incorporação de excesso de elétrons, resultando na produção de radicais livres reativos. Os antibióticos naturais podem ainda inibir a função do DNA através de intercalação com a molécula (doxorrubicina) (Tabela 1) (LEI; WANGA; WU, 2012; OCTAVIA et al., 2012).

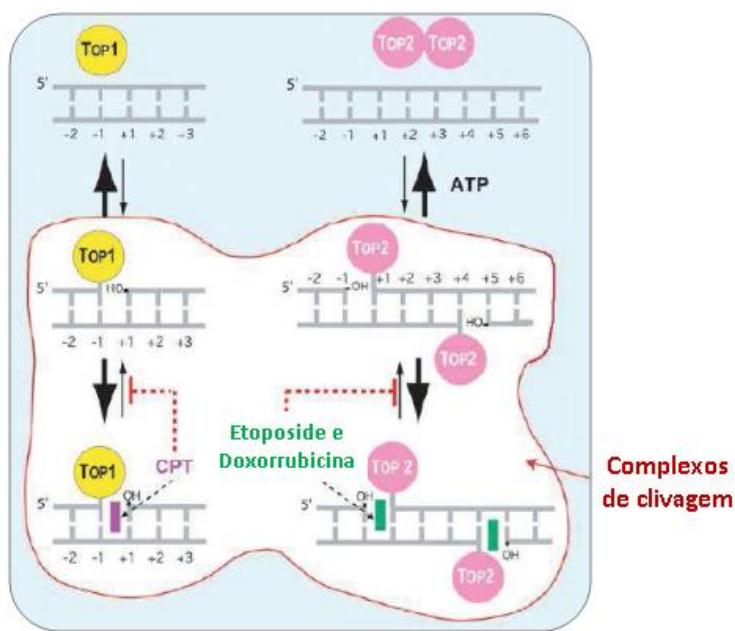
Tabela 1. Classificação, estrutura química e atividades de agentes antineoplásicos ciclo celular específico (CCS) e ciclo celular não específico (CCNS), utilizados na terapêutica do câncer.

Classe de quimioterápicos	Estrutura química	Atividades
Agentes naturais (Vimblastina e Vincristina; Plactaxel e Docetaxel)	 The first structure on the left is a Vinca alkaloid derivative, featuring a complex polycyclic system with nitrogen atoms, hydroxyl groups, and ester linkages. The second structure on the right is a Taxane derivative, showing a tricyclic diterpenoid core with multiple hydroxyl groups and ester side chains.	Vimblastina e Vincristina: (linfoma de Hodgkin, câncer de ovário, testículo e leucemia linfoblástica aguda infantil). Plactaxel e Docetaxel: (câncer de mama e ovário).
Agentes alquilantes (Cisplatina e Carboplatina)	 The first structure on the left is Cisplatin, showing a platinum atom coordinated to two chloride ions and two diamine molecules (e.g., ethylenediamine). The second structure on the right is Carboplatin, showing a platinum atom coordinated to two amine groups and two carboxylate groups from a cyclobutanone ring.	Cisplastina: (câncer de testículo, ovário, bexiga, útero e pulmão). Carboplatina: (câncer de ovário, cabeça e pescoço, pulmão, testículo, leucemia aguda e linfoma não Hodgkin).
Antibióticos naturais (Doxorrubicina)	 The structure of Doxorubicin is a complex polycyclic aromatic compound. It features a central tricyclic core with multiple hydroxyl groups, carbonyl groups, and a terminal amine group.	Doxorrubicina: (LLA, câncer de bexiga, gástrico, sarcoma, mama).

3.7 Inibidores de topoisomerases

As topoisomerases (topo) são enzimas nucleares, classificadas em dois subtipos: topo I e topo II conforme o seu mecanismo de clivagem e arquitetura. Estas enzimas são fundamentais para o controle da condensação e relaxamento dos cromossomos durante a transcrição e replicação. De modo geral, o mecanismo catalítico das topoisomerases versa na quebra de ligações fosfodiésteres da molécula de DNA, assim a topo I quebra uma única fita, enquanto a topo II quebra as duas fitas, como observado na Figura 4 (POMMIER, 2009).

Figura 4. Esquema do mecanismo catalítico das topoismerases I e II.



É possível observar que após a ligação da topo I ao DNA dupla-fita ocorre a formação do complexo covalente na extremidade 3' da quebra, o qual é estabilizado pelo alcaloide camptotecina (CPT). A topo II apresenta duas isoformas α e β , que formam o complexo de clivagem após ligação a dupla fita de DNA. O complexo constituído é estabilizado pelos inibidores etoposídeo e doxorrubicina. Fonte: Adaptado de Pommier (2009).

Por formarem ligações com o DNA, as topoisomerases tornaram-se moléculas alvo para o desenvolvimento de fármacos, dentre estes os inibidores de topo, que ao interagir com estas enzimas podem inibir suas atividades mediante a formação de complexos. Esses compostos podem ser classificados em dois grupos: os “venenos” e os inibidores catalíticos. Os venenos de topoisomerases (inibidores de topo II) são as moléculas mais ativas clinicamente, pois aumentam a ocorrência do complexo DNA-topo, o que proporciona a estabilização do complexo formado e o aumento de quebras no DNA. Dessa forma, esses inibidores são denominados de “venenos” endógenos, visto que rapidamente levam a formação de danos na

molécula de DNA. Dentre os venenos de topoisomerases, destacam-se a doxorrubicina (DOX), fármaco amplamente utilizado no tratamento do câncer (POMMIER, 2013). Em contrapartida, os inibidores catalíticos (inibidores de topo I) apresentam pouca atividade antitumoral e seu mecanismo de ação é impedir a formação do complexo DNA-enzima, através da inibição da ligação da topo com a molécula de DNA ou por evitar que a topo clive o DNA (POMMIER, 2009; POMMIER, 2013).

As topoisomerases são expressas em diferentes níveis nos mais variados tipos celulares, com expressão de 60% da topo II em células de câncer de mama (YANG et al., 2012). Alguns estudos apontam ação das topoisomerases no ciclo celular, tão logo inibidores como ICRF - 187 e 193 atuam sobre a topo II provocando retardo no ciclo celular, visto que essa enzima participa do monitoramento desse evento através da interação com proteínas do ponto de checagem (BOWER et al., 2010). Dessa maneira, estudos têm sido realizados com o objetivo de identificar novas moléculas inibidoras de topoisomerases, com atividade anticâncer.

3.8 Importância dos testes de citotoxicidade *in vitro*

Os testes de toxicidade *in vitro* são considerados um bioensaio preliminar essencial para o estudo de novos agentes com potencial biológico. Normalmente, esses testes têm por finalidade avaliar o potencial tóxico de uma molécula, indicar a relação dose-resposta e estabelecer as condições seguras para a exposição dessa substância (FARIAS; IMADA; KATAYAMA, 2010).

Segundo Bednarczuk et al. (2010), os testes *in vitro* em comparação aos ensaios *in vivo*, são melhor recomendados por serem mais facilmente controlados, financeiramente mais acessíveis e por demonstrarem melhor reprodutibilidade. Além disso, possibilitam predizer o efeito citotóxico de determinado composto através da utilização de cultura celulares de tecidos, bem como permitem o conhecimento do efeito citotóxico das substâncias teste sobre as membranas celulares, por meio da avaliação do potencial hemolítico (BATISTA, 2013).

Geralmente, os ensaios *in vitro* são realizados através de métodos colorimétricos quantitativos, dentre os quais destaca-se o MTT, desenvolvido por Tim Mosmann em 1983. Este teste se baseia na conversão do sal de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2H tetrazolio (MTT) em azul de formazan, a partir da atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase. De modo geral, a conversão da cor amarela (sal) para a cor púrpura indica a

presença de células viáveis, as quais são quantificadas de acordo com a quantidade de cristais formados e a intensidade da coloração púrpura (DUARTE, 2015).

Dessa forma, por apresentarem facilidade de aplicação e confiabilidade, os testes *in vitro* tornaram-se ensaios indispensáveis para a análise da citotoxicidade de substâncias, o que colabora para o desenvolvimento das pesquisas pré-clínica, que devem ser norteadas de acordo com as boas práticas de laboratório (BPL) (ANVISA, 2013).

3.9 Docagem molecular

A docagem molecular é uma das principais ferramentas utilizadas para o planejamento de moléculas baseado na estrutura do receptor (SBDD - *Structure-based drug design*). A aplicação dessa técnica envolve a predição de como os candidatos a fármacos interagem a nível molecular no sítio de ligação da proteína (receptor) alvo. Dessa forma, de acordo com as energias de interação e as conformações do ligante-receptor, é possível verificar a afinidade entre eles, bem como observar quais resíduos do alvo atuam na interação do complexo formado (EFFERTH; KOCH, 2011; DIAS et al., 2014).

No docking molecular as conformações e acoplamentos (poses) dos ligantes são determinados por algoritmos de busca, que no final do processo geram uma classificação para os ligantes baseada na energia de interação entre eles, as quais geralmente são distribuídas em quatro classes: forças eletrostáticas (dipolo-dipolo e dipolo-carga), força eletrodinâmica (interação de Van der Waals), forças estéricas (causadas pela entropia) e forças relacionadas a solventes (ligação de hidrogênio e ligações hidrofóbicas) (FERREIRA; GLAUCIUS; ANDRICOPULO, 2011; CHAUDHARY; MISHRA, 2016).

Comumente, o valor da energia livre de ligação (FEB - *Free Energy of Binding*) é obtido pelo módulo AutoGrid e analisado através do Autodock, um *software* gratuito usado para predizer a energia de ligação de uma conformação entre o ligante e o receptor. Em geral, as energias calculadas refletem a afinidade para a formação do complexo ligante-receptor, portanto quanto menor o valor de energia de ligação mais estável é essa interação (WINCK, 2012).

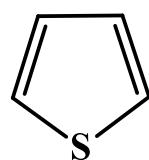
3.10 Compostos com potencial anticâncer

3.10.1 Nitro-heterociclos e anel tiofeno

Os compostos heterocíclicos constituem um grupo importante para o planejamento e o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. A utilização desses compostos está associada principalmente a facilidade de síntese, a possibilidade de adição de inúmeros heteroátomos e a introdução de variados radicais substituintes, o que lhes atribui diferentes atividades e propriedades químicas e biológicas (SIVADAS; SUBBAYA, 2011; ARORA, et al., 2013). Entre os grupos possíveis de serem associados à estrutura do anel heterocíclico, destacam-se o grupo nitro, amplamente empregado na obtenção de pró-fármacos. Os nitro-heterociclos assim formados apresentam inúmeras bioatividades, dentre estas: antineoplásica, antiparasitária e antibacteriana, sendo a redução do grupo nitro fundamental para as atividades biológicas (SIVADAS; SUBBAYA, 2011; ARORA, et al., 2013).

Dessa forma, por apresentar estrutura molecular simples (C_4H_4S) como observado na Figura 5, o anel tiofeno está comumente associado ao grupo nitro através do uso de estratégias clássicas de planejamento molecular, como simplificação e homologia. Essa classe de composto é um heterocíclico de cinco membros, naturalmente encontrado em raízes de *Pterocaulom virgatum*, na estrutura de carvão, em metabólitos de fungos e plantas, e em determinados membros da família *Asteraceae*, tais como *Tagetes minuta* e *Tagetes pátula* L, (CHAUDHARY; JHA; KUMAR, 2012; SAHA et al., 2012; AL-MUSAYEIB et al., 2014).

Figura 5. Estrutura do anel tiofeno.



Fonte: Próprio autor.

O composto tiofeno foi descoberto por Meyer em 1882, e pode se formar através das rotas de Paal-Knorr, de Fielsselmann, de Hinsberg, e mais frequentemente a de Gewald, principal via de obtenção de derivados tiofénicos 2-aminados (ABU-HASHEM; SHEHRY; BADRIA, 2010; MENDONÇA JUNIOR et al., 2011; RODRIGUES et al., 2012). A síntese desse composto despertou o interesse da química medicinal a partir do momento que diversas atividades biológicas foram identificadas, dentre as quais: antitumoral, antiviral, antibacteriana,

antifúngica, antioxidante, inseticida e nematocida (SRIVASTAVA; DAS, 2011; SAHA et al., 2012; KUPADHYAY, MISHRA; 2015).

A atividade antitumoral de derivados tiofênicos foi relatada por Venkataramireddy et al. (2016), na avaliação do novo composto 3-aryl-tiofeno-2-carbaldeído e seus derivados Chalcone Aril/heteroaril em linhagem de cólon humano (HTC-15). Entre as moléculas testadas quatro (5g, 5h, 5i e 5j) foram ativas em células HTC-15, com valores de IC_{50} entre 21 e 23, 8 $\mu\text{g/mL}$. Outros estudos apontaram a elevada atividade antiproliferativa dos derivados ciclohepta[*b*]tiofeno (14 a - 14 f) contra as linhagens de adenocarcinoma de mama (MCF-7), carcinoma de pulmão de não pequenas células (NCIH-460) e células de glioblastoma (SF-268) com valores de IC_{50} variando de 1.0 a 0.01 μM (EL-SHARKAWY; SAID; DARDAS, 2014).

Pesquisa realizada por Souza e colaboradores (2012) revelou a atividade antiproliferativa dos derivados cicloalquil[*b*]tiofeno, nas linhagens neoplásicas HEp-2, HT-29 e NCIH-292, com evidência para o derivado 2-[(arilideno)amino]cycloalquil[*b*]tiofeno-3-carbonitrila (2r), que apresentou potencial inibitório de 97,5 a 100% nas células tumorais supracitadas.

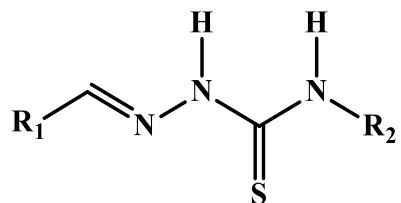
Além desses, estudos realizados por A-Shaabab et al. (2010), apontaram que os novos derivados tiofênicos iminoaminotieno[2,3-*d*]pirimidinas, triazolitieno[2,3-*d*]pirimidinas e pirazoli-triazinotieno[2,3-*d*]pirimidinas, apresentaram uma maior atividade citotóxica em células das linhagens neoplásicas HEpG-2 e MCF-7, quando comparado com o fármaco controle doxorrubícina.

3.10.2 Tiossemicarbazonas

As tiossemicarbazonas (TSC) são compostos orgânicos nitrogenados pertencentes à família das iminas, também denominadas como bases de Schiff. Essas moléculas são amplamente empregadas na química medicinal por apresentam diversas atividades biológicas, dentre as quais: antitumoral (ALMEIDA et al., 2015), antifúngica (EL-SHARIEF et al., 2013), antibacteriana (SOUZA et al., 2013) e antimarial (LIESEN et al., 2010). As tiossemicarbazonas possuem estrutura C=N-NH-CS-NH₂, aproximadamente planar, com a presença do átomo de enxofre na posição *anti* em relação ao átomo de hidrogênio da função imina (Figura 6). Além disso, as TSC são compostos que apresentam versatilidade de obtenção, ampla aplicação como

intermediários de núcleos importantes, não necessitam de armazenagem especial e não são sensíveis à luz (SARNIGUET et al., 2014).

Figura 6. Estrutura química básica das tiossemicarbazonas.



R₁ = Alquil

R₂ = H; Alquil

Fonte: Próprio autor.

De modo geral, as tiossemicarbazonas atuam como inibidores de enzimas por meio da complexação de metais endógenos ou através de reações de redox, mediante interações ou inibição do DNA, contudo o amplo espectro de atividades biológicas das TSC está relacionado ao seu potencial em inibir a enzima ribonucleotídeo redutase (RR) (TENÓRIO; GÓES, 2005; AYE et al., 2012).

A RR é uma enzima citoplasmática com função de catalisar a síntese de desoxirribonucleotídeos tri-fosfatos (d-NTPs), importantes para a síntese e reparo do DNA (YU et al., 2009). O mecanismo de ação da RR é um alvo atrativo para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos voltados para o tratamento de doenças, cuja a proliferação celular descontrolada tem papel importante para a patogênese da doença, como caracterizado no câncer (AIRD; ZHANG, 2014).

A ribonucleotídeo redutase está presente em todas as células vivas e é formada por duas subunidades R₁ e R₂. Na subunidade R₂ encontra-se um radical livre tirosila e um centro de ferro não-heme, constituído de dois íons Fe³⁺ ligados entre si através da ponte μ-oxo, tornando-se assim, essencial para a atividade catalítica da enzima, visto a capacidade da RR em catalisar a biossíntese DNA (CERQUEIRA, 2007). Dentre as moléculas que se ligam a essa região, inclui-se a triapina ou 3-aminopiridina-2-carboxaldeído tiossemicarbazona (3-AP), que atua como quelante de ferro intracelular (TENÓRIO; GÓES, 2005; CERQUEIRA, 2007).

A atividade inibitória das tiossemicarbazonas sobre a RR está relacionada ao complexo formado entre elas e o átomo de ferro presente no sítio catalítico da subunidade R₂, resultando na inibição da biossíntese do ácido desoxirribonucleico (TENÓRIO; GÓES, 2005). Além disso, avaliações com novos derivados tiossemicabazonas têm mostrado a habilidade dessas moléculas em se ligar ao DNA (ALI, et al., 2014).

Estudos realizados por Soares e colaboradores (2012), revelaram a atividade citotóxica de novos derivados 2-acetilpiridina N4-Fenil-substituído frente às linhagens tumorais de adenocarcinoma de mama (MCF-7), e duas linhagens de glioblastoma (U87 e T98G). Os resultados obtidos indicaram um maior potencial dos compostos em induzir a apoptose nas células tratadas, em relação ao etoposídeo, um inibidor de topo II.

Yu et al. (2011) avaliaram a atividade inibitória da proliferação celular de Dp44mt e (Bp44mT) em carcinoma de pulmão (DMS-53) e neuroepitelioma (SK-N-MC), os quais apresentaram IC₅₀ de 5,8 e 9,5 µM (YU et. al., 2011). Além disso, Yuan et al. (2004) evidenciaram a atividade antitumoral de sete análogos da molécula 2-piridilo-tiossemicabaçona em neuroepitelioma (SK-N-MC), melanoma (SK-Mel-28) e adenocarcinoma de mama (MCF-7), com destaque para os derivados Dp44mt, Dp4eT, Dp4aT e Dp4pT que mostraram elevada atividade antiproliferativa na linhagem de neuroepitelioma, com IC₅₀ de 0,03 a 0,06 µM.

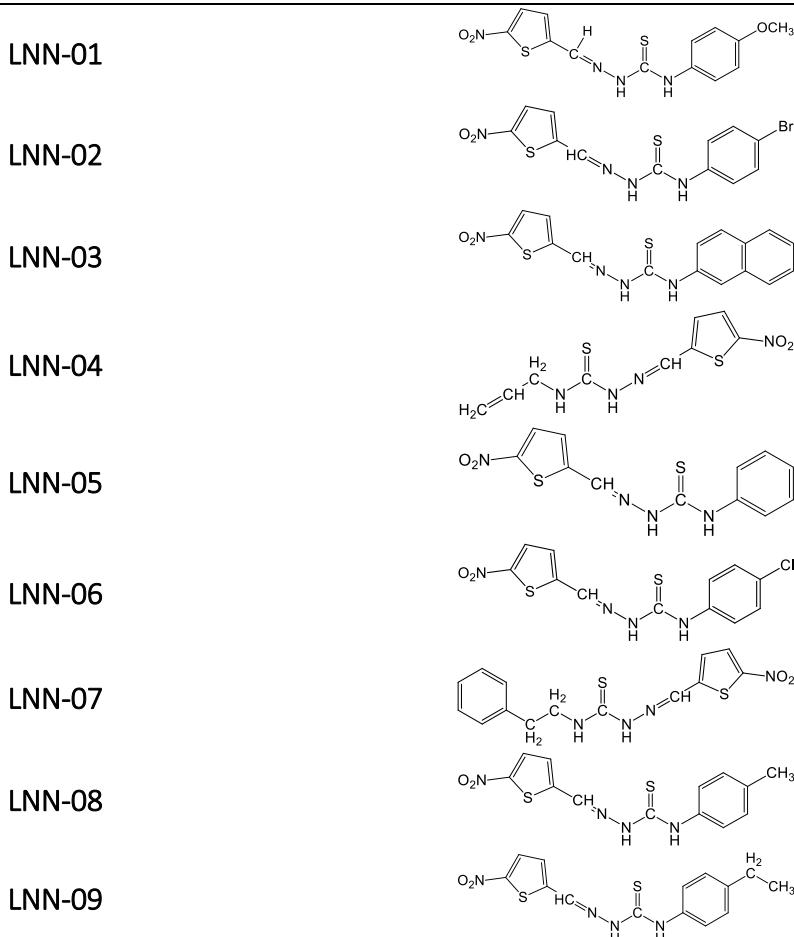
Neste contexto, considerando a problemática do câncer e a necessidade do desenvolvimento de novos agentes antitumorais, associado ao potencial antiproliferativo dos derivados tiofeno e tiossemicarbazonas, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial anticâncer de novos derivados 5-nitrotiofeno-tiossemicarbazônicos, sintetizados no Laboratório de Química em Inovação Terapêutica.

4. METODOLOGIA

4.1 Compostos

Os derivados 5-nitrotiofeno-tiossemicarbazônicos LNN-01, LNN-02, LNN-03, LNN-04, LNN-05, LNN-06, LNN-07, LNN-08 e LNN-09 (Tabela 2) foram sintetizados no Laboratório de Química em Inovação Terapêutica LQIT/UFPE e o fármaco controle doxorrubicina foi adquirido da Sigma-Aldrich. As soluções estoques (5 mg/mL) foram dissolvidas em DMSO P.A. estéril.

Tabela 2. Estruturas químicas dos derivados 5-nitrotiofeno-tiossemicarbazônicos.



Fonte: Neto, 2016. (Responsável pela síntese).

4.2 Cultura de células

Para os testes *in vitro* foram utilizadas sete linhagens de células neoplásicas obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) (Tabela 3) e mantidas no Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Antibióticos - UFPE. As linhagens tumorais HEp-2 (carcinoma epidermóide de laringe), HL-60 (leucemia promielocítica aguda), HT-29 (câncer de cólon humano), K-562 (leucemia mielocítica crônica humana), MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano), MOLT-4 (leucemia linfoblástica aguda) e NCIH-292 (carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano) foram cultivadas em garrafas de cultura (75 cm^2), mantidas em estufa a $37\text{ }^\circ\text{C}$ contendo 5% de CO₂, em meios específicos RPMI 1640 (Gibco) e DMEM (Gibco), com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 10 mM de HEPES (ácido(4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfônico) (Gibco) e 1% de Penicilina/Estreptomicina (Gibco). O repique das células aderidas foi realizado com o uso de tripsina/EDTA (0,25%).

Tabela 3. Linhagens de células tumorais humanas utilizadas no teste de citotoxicidade *in vitro*, através do método MTT.

Linhagem celular	Tecido de origem	DP* (Células/mL)
HEp-2	Carcinoma epidermóide de laringe	$2,0 \times 10^5$
HL-60	Leucemia promielocítica aguda	$0,3 \times 10^6$
HT-29	Adenocarcinoma de cólon humano	$2,0 \times 10^5$
K-562	Leucemia mielóide crônica	$0,3 \times 10^6$
MCF-7	Adenocarcinoma de mama humano	$2,0 \times 10^5$
MOLT-4	Leucemia linfoblástica aguda	$0,3 \times 10^6$
NCIH-292	Carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano	$2,0 \times 10^5$

*Densidade de plaqueamento.

4.3 Obtenção de células mononucleares de sangue periférico humano (CMSPH)

Para a obtenção de células mononucleares, 10 mL de sangue venoso de doadores sadios foram obtidos assepticamente, em tubos contendo ACD (Becton Dickson). As células foram centrifugadas por 45 minutos a 2000 rpm, e na sequência, o plasma foi descartado e o anel celular (constituído de linfócitos e monócitos) foi transferido para tubos Falcon de 15 mL, nos quais foram adicionados 9 mL de solução salina tamponada (PBS).

Em seguida, as células foram isoladas por gradiente de concentração utilizando-se Ficoll-Hypaque®. Posteriormente, foram realizadas duas lavagens com PBS (10' a 2000 rpm) para remoção de plasma, plaquetas e a solução de ficoll. Após o isolamento, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuspêndido em meio completo (RPMI 1640 acrescido

de 20% de soro fetal bovino, 1% de antibiótico (penicilina-estreptomicina) e 4% de fitohemaglutinina) para posterior plaqueamento. A influência dos compostos sobre a proliferação de linfócitos humanos foi investigada por meio de curvas de crescimento celular determinadas após 72 horas de incubação. O ensaio de seletividade foi realizado pelo método do Alamar Blue (O'Brien et al., 2000).

A realização desta etapa ocorreu mediante a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), com número CAAE (61757416.5.0000.5208). Todos os participantes incluídos no estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.4 Teste de citotoxicidade em células neoplásicas

O efeito citotóxico foi avaliado pelo método colorimétrico MTT, baseado na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium (MTT) em cristais de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes em células metabolicamente ativas (MOSMANN, 1983).

As células foram distribuídas em uma densidade de $0,3 \times 10^6$ ou $2,0 \times 10^5$ por poço em placas de 96 poços. Após 24 horas as linhagens neoplásicas foram tratadas com os novos derivados 5-nitrotiofeno-tiosemicarbazônicos e com a doxorrubicina em concentração única de 25 µg/mL (potencial de inibição), e em concentrações seriadas (0,00019 - 25 µg/mL) e, em seguida incubadas por 72 horas. Após este período, 25 µL de MTT (5 mg/mL) foi adicionado e as células foram reincubadas por 3 horas. A absorbância foi lida, após a retirada do sobrenadante e dissolução do precipitado com 100 µL de DMSO, em espectrofotômetro de placa a 560 nm.

Para o *screening* inicial, a porcentagem de inibição do crescimento celular (IC%), foi determinada levando-se em consideração a média do controle negativo como 100% de proliferação. Para a avaliação do potencial citotóxico dos compostos foi utilizada uma escala de intensidade, a qual considera alta atividade tóxica quando inibido de 95% a 100% o crescimento celular, atividade moderada quando 70% a 90% e sem efeitos, quando menor que 50% (FOUCHE et al., 2008).

Após a triagem inicial, os derivados que apresentaram inibição do crescimento celular superior a 75%, foram testados em várias concentrações para a determinação da concentração que inibe 50% da proliferação celular (IC_{50}). A porcentagem de inibição, o IC_{50} e os intervalos

de confiança (IC95%) foram calculados no programa *GraphPadPrism* 5.0. Os experimentos foram realizados em triplicata em três ensaios independentes.

4.5 Ensaio de citotoxicidade em CMSPH

O teste de alamar blue (resazurina), também utilizado por O'Brien et al. (2000), Pettit et al. (2005), Rolón et al. (2006) e Bénéré et al. (2007) é um indicador colorimétrico que através de suas propriedades redox, permite avaliar a proliferação e viabilidade celular. A forma oxidada da resazurina reconhecida pela cor azul (não fluorescente/célula inviável) é reduzida a resofurin, de cor rosa (fluorescente/célula viável) que não precipita após ser reduzida. Inicialmente, as CMSPH foram distribuídas em microplacas de 96 poços (10^6 células/mL) e após 24 horas de incubação, foram tratadas com os novos derivados 5-nitrotiofenotiossemicarbazônicos (0,00019 - 25 µg/mL) e com a doxorrubicina (0,009 - 5 µg/mL), e posteriormente incubadas por 72 horas. Vinte e quatro horas antes do término deste período, foi adicionado 10 µL/poço da solução estoque de resazurina (0,312 mg/mL). As absorbâncias foram lidas nos comprimentos de onda de 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado), em espectrofotômetro de placa (AHMED; GOGAL JR; WALSH, 1994). Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.6 Avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos humanos

O ensaio de atividade hemolítica permite analisar o potencial das substâncias em provocar danos à membrana plasmática celular, através da formação de poros ou pelo rompimento da mesma (COSTA-LOTUFO et al, 2002).

Os eritrócitos foram obtidos do sangue de doadores saudáveis entre 25 e 30 anos, coletados em tubos contendo ACD (Becton Dickinson - EUA). Após a coleta, o sangue foi diluído em 150 mL de solução salina (NaCl 0,85% + CaCl₂ 10 mM). As hemácias foram lavadas duas vezes em solução salina e centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, foram ressuspensas em solução salina para a obtenção de uma suspensão de eritrócitos (2%). O ensaio foi realizado em placas de 96 poços. Para cada poço da primeira coluna foi adicionado 100 µL da solução salina, e nos poços da segunda coluna foi adicionado 80 µL e 20 µL de DMSO 50% (veículo de diluição dos compostos). Em seguida, os poços da 12^a fileira receberam 80 µL de solução salina e 20 µL de Triton X-100 a 1% (controle positivo). Nos poços da 11^a coluna

foram adicionados 190 µL de solução salina e 10 µL da substância em uma densidade de 5mg/mL. Posteriormente, cada poço da 10º fileira até 3º fileira receberam 100 µL de solução salina.

As diluições realizaram-se da 11º até a 3º coluna, retirando-se 100 µL da solução e transferindo para o poço posterior, de modo que as concentrações variaram de 250 até 0,97 µg/mL. Em seguida, foi adicionado em todos os poços 100 µL da solução de eritrócitos a 2%. Em sequência, a placa foi incubada sob agitação constante por 1 hora em temperatura ambiente (25 ± 2 º C). Após este período a placa foi centrifugada a 2000 rpm durante 10 minutos, com a retirada e transferência do sobrenadante para outra placa para posterior leitura da absorbância em espectrofotômetro de placa a 450 nm.

4.7 Docagem molecular

O docking molecular foi realizado no Laboratório de Síntese e Votorização de Moléculas (LSVM) da Universidade Estadual da Paraíba.

Os derivados 5-nitrotiofeno-tiosemicarbazônicos (LNN-01, LNN-02, LNN-03, LNN-04, LNN-05, LNN-06, LNN-07, LNN-08 e LNN-09) tiveram suas estruturas tridimensionais determinadas e posteriormente suas energias foram minimizadas através de cálculos de mecânica molecular, usando o campo de força MM+ (ALLINGER, 1977), e o método semi-empírico AM1 (*Austin Model 1*) (DEWAR; ZOEBISCH; HEALY; STEWART, 1985). Esses procedimentos foram realizados no *software* HyperChem versão 8.0.7 para Windows (HYPERCUBE, 2009)

A enzima Ribonucleotídeo Redutase (RR) teve sua estrutura obtida diretamente do *Protein Data Bank*, sob o código PDB: 4X3V. O *software* PyMOL versão 1.8.X para Linux foi utilizado para realização do pré-tratamento do arquivo PDB, avaliando a presença de moléculas de água e átomos não ligados. Foi mantida apenas cadeia A e foram removidos os dois ligantes que estavam co-cristalizados com a enzima: timidina-trifosfato (TTP) e o ligante N'-6'-{N-[(1,3-Dioxo-1,3-dihidro-2H-isoindol-2-il)acetil]-2-metil-D-alanil}-D-lisina (3X4) , estando este último, localizado na região catalítica da RR.

A docagem molecular foi realizada com o auxílio do software AutoDock Suite versão 4.2.6 via terminal Linux. Inicialmente, foi determinada a área tridimensional, Grid Box, conforme Tabela 4 que foi utilizado pelo algoritmo de busca de conformações e poses, no

software AutoDock Tools versão 1.5.6. O centro do Grid Box foi determinado com base no ligante 3X4 que estava cristalizado no sítio ativo da enzima.

Tabela 4. Configurações do Grid Box para os compostos LNNs.

Configurações	Energias (Kcal/mol)
Nº de pontos na dimensão x	50
Nº de pontos na dimensão y	50
Nº de pontos na dimensão z	50
Espaçamento (Angstrom)	0,375
Centro do Grid Box dimensão x	-20,65
Centro do Grid Box dimensão y	46,034
Centro do Grid Box dimensão z	17,667

Para realização da docagem as conformações e poses dos ligantes foram determinadas através do uso do algorítimo de busca Lamarckiano, com os parâmetros *default*, exceto para os parâmetros “número máximo de avaliações” e “número de runs” que tiveram os valores modificados para 1.750.000 e 20, respectivamente. Em seguida foi utilizado a função *score* empírica de energia livre para identificação da conformação do ligante energeticamente favorável a formação do complexo ligante-receptor.

Para observar as interações (energias de interação) que ocorreram no complexo ligante-receptor, bem como os resíduos da enzima envolvidos, foi utilizado o *software LigPlot+* versão 1.4.5 (LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011).

4.8 Ensaio de topoisomerase

O teste de inibição de topoisomerase II foi realizado de acordo com Lafayette et al. (2013). Em linhas gerais, 100 ng de DNA plasmidal superenovelado (pUC19) foram incubados com 4 unidades de topoisomerase IIα (Sigma-Aldrich) a 37º graus por 30 minutos em tampão de relaxamento (Tris-HCl 50mM, pH 8,0, KCl 120 mM, MgCl₂ 10 mM, ATP 0,5 mM e ditiotreitol 0,5 mM) na presença de 50 e 100 μM do derivado LNN-05. A amsacriana foi utilizada como controle positivo. As reações foram paradas com SDS 1% e proteinase K. Posteriormente, as amostras foram aplicadas em gel de agarose (0,8%) em tampão (NaOH + ácido bórico), e a corrida eletrostática foi realizada durante 2 horas. A revelação do gel foi feita com brometo de etídio e, imediatamente fotografado sob luz ultravioleta.

4.9 Análise morfológica - Coloração por hematoxilina/eosina

Para este experimento, células K-562 foram semeadas em microplacas de 12 poços ($0,3 \times 10^6$) e mantidas em estufa com o derivado LNN-05 por 72 horas, nas concentrações de 0,7, 1,4 e 2,8 $\mu\text{g/mL}$. Para analisar a morfologia, 50 μL da suspensão celular foram acrescentados à centrífuga de lâmina (Cytospin) para favorecer sua adesão. Posteriormente, as células foram fixadas com etanol 96% durante 5 minutos, seguida da coloração com hematoxilina/eosina (BAUER, 2014).

4.10 Avaliação do potencial transmembrânico ($\Delta\psi m$)

Para a realização deste ensaio, as células K-562 foram incubadas com o derivado LNN-05 (0,7, 1,4 e 2,8 $\mu\text{g/mL}$), durante 72 horas. Após o tratamento, 500 μL da suspensão celular foi transferido para um eppendorf e centrifugado a 1200 rpm por 5 minutos. Posteriormente, foi descartado o sobrenadante e adicionado 250 μL de rodamina 123, incubado por 30 minutos na ausência de luz. Após este período, as células foram centrifugadas novamente a 1200 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi removido e ressuspendido em 300 μL de PBS e incubado por 15 minutos no escuro. Em seguida, as células foram centrifugadas e acrescidas de 200 μL de PBS para posterior análise no citômetro de fluxo (GuavaEasyCyt). Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento (n=3). (ANDRADE, 2011).

4.11 Análise do efeito citostático

Para avaliar a progressão do ciclo celular, as células K-562 foram incubadas com o composto LNN-05 (0,7, 1,4 e 2,8 $\mu\text{g/mL}$), durante 72 horas. Após este período, foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos, e posteriormente fixadas com etanol 70% por 1 hora. Em seguida, foram centrifugadas e lavadas com 500 μL de PBS gelado. Em seguida, as células foram novamente centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado foi ressuspendedido em 200 μL da solução de lise (citrato de sódio 10 mg, triton-X 10 μL e iodeto de propídeo), incubados por 30 minutos na ausência de luz. Posteriormente, foi realizada a leitura no citômetro de fluxo (GuavaEasyCyt). Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento (n=3). (OLIVEIRA et al., 2015).

4.12 Análise estatística

As análises dos dados dos testes de citotoxicidade foram obtidas por regressão não linear, através do software *GraphPadPrism* versão 5.0. Para a avaliação da atividade hemolítica foi considerado o valor dos controles positivo e negativo, para a determinação da concentração efetiva média capaz de causar 50% do efeito máximo (CE_{50}). Em todos os experimentos as substâncias foram testadas em diluição seriada e em triplicata. Para os testes de mecanismo de ação os dados foram expressos como média \pm erro médio. Os experimentos foram realizados em triplicata ($n=3$) e os dados das diferenças estatísticas entre os grupos foram comparados por ANOVA seguido por teste de Dunnett ($p < 0,05$), por meio do *GraphPadPrism* versão 5.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo da atividade citotóxica e hemolítica dos novos derivados LNNs

Os resultados obtidos mostraram que os novos derivados 5-nitrotiofeno-tiofenotiossemicarbazônicos foram capazes de inibir o crescimento celular acima de 80%, em pelo menos uma linhagem tumoral testada (Figura 7), com destaque para os compostos LNN-01, LNN-05, LNN-06, LNN-08 e LNN-09 que apresentaram melhor atividade inibitória em HT-29, K-562 e MCF-7 quando comparados com a doxorrubicina. Contudo, o composto LNN-05 mostrou efeito citotóxico frente todas as linhagens neoplásicas utilizadas, com IC_{50} de 0,5 µg/mL (HL-60), 1,9 µg/mL (HEp-2 e HT-29), 1,4 µg/mL (K-562), 0,7 µg/mL (MOLT-4), 1,0 µg/mL (MCF-7) e 0,8 µg/mL (NCIH-292) (Figura 8). Em contrapartida, o único derivado inativo frente todas às linhagens testadas foi o LNN-07, que exibiu IC_{50} de > 25 µg/mL.

Também pode ser observado que a presença de radicais alquilaicos no anel fenila (metila em LNN-08 e etila em LLN-09), assim como a substituição do grupo fenila por um grupo maior (naftila em LNN-03) não foi positiva para a atividade antitumoral dessa classe de compostos, resultando na maioria dos casos, em derivados inativos ou com pouca atividade. As únicas exceções foram: linhagem HL-60 em que LNN-03 foi o mais ativo (IC_{50} = 0,3 µg/mL); linhagem K-562 em que LNN-08 apresentou IC_{50} de 1,2 µg/mL; e linhagens NCIH-292, em que LNN-08 e LNN-09 foram respectivamente o segundo e terceiro compostos mais ativos, com valores de IC_{50} = 2,8 e 3,0 µg/mL (Tabela 5).

Além disso, foi notado que a substituição do anel fenila por grupos metoxila (LNN-01) e halogênios (LNN-02 e LNN-06) favorece a atividade citotóxica dos compostos frente a grande maioria das linhagens testadas. Para LNN-01 ressalta-se sua atividade em HEp-2 (IC_{50} = 1,2 µg/mL), sendo o composto mais ativo da série para essa linhagem; HT-29, com IC_{50} = 2,5 µg/mL; e MCF-7 (IC_{50} = 2,0 µg/mL), sendo nessas últimas duas linhagens, o terceiro composto com melhor atividade.

Para LNN-02 ressaltam-se seus valores de inibição frente às linhagens HL-60 (IC_{50} = 0,4 µg/mL) e MCF-7 (IC_{50} = 1,7 µg/mL), onde o composto foi o segundo mais ativo. Para LNN-06 as linhagens mais sensíveis foram: HEp-2 (IC_{50} = 2,1 µg/mL) e K-562 (IC_{50} = 1,3 µg/mL), onde o derivado foi o segundo mais ativo, e MOLT-4 (IC_{50} = 1,0 µg/mL), onde o derivado foi o terceiro composto mais ativo.

Por último, a substituição do grupo fenila por alila em LNN-04, também se mostrou positiva, sendo uma substituição favorável quando analisamos as linhagens HT-29 e MOLT-4, IC_{50} , respectivamente, de 1,0 e 0,5 $\mu\text{g/mL}$, onde o derivado foi o mais ativo da série.

Em células mononucleares de sangue periférico humano (CMSPH), os derivados apresentaram IC_{50} acima de 9,0 $\mu\text{g/mL}$, revelando-se menos tóxicos que o fármaco controle doxorrubicina, o qual demonstrou elevada citotoxicidade em todas as linhagens usadas, com valor de IC_{50} entre 0,01 a 0,8 $\mu\text{g/mL}$.

Na avaliação da atividade hemolítica nenhum dos derivados 5-nitrotiofenotiossemicarbazônicos exibiu capacidade de causar lise em eritrócitos humanos nas concentrações testadas até 250 $\mu\text{g/mL}$. Neste ensaio, consideram-se ativas, substâncias que provocam 50% de hemólise (CE_{50}) em concentração < 250 $\mu\text{g/mL}$.

A partir do *screening* inicial, o derivado LNN-05 por apresentar maior potencial citotóxico, foi selecionado para dar continuidade aos estudos sobre os possíveis mecanismos de ação. Para a realização dos experimentos foi escolhida como modelo a linhagem em suspensão K-562 por ter apresentado sensibilidade aos compostos avaliados. Para prosseguimento do estudo foram utilizadas as concentrações de 0,7 $\mu\text{g/mL}$, 1,4 $\mu\text{g/mL}$ e 2,8 $\mu\text{g/mL}$ escolhidas com base no IC_{50} identificada para K-562 após 72 horas de tratamento.

Figura 7. Potencial de inibição do crescimento celular dos derivados LNNs em concentração única de 25 µg/mL em linhagens de células neoplásicas.

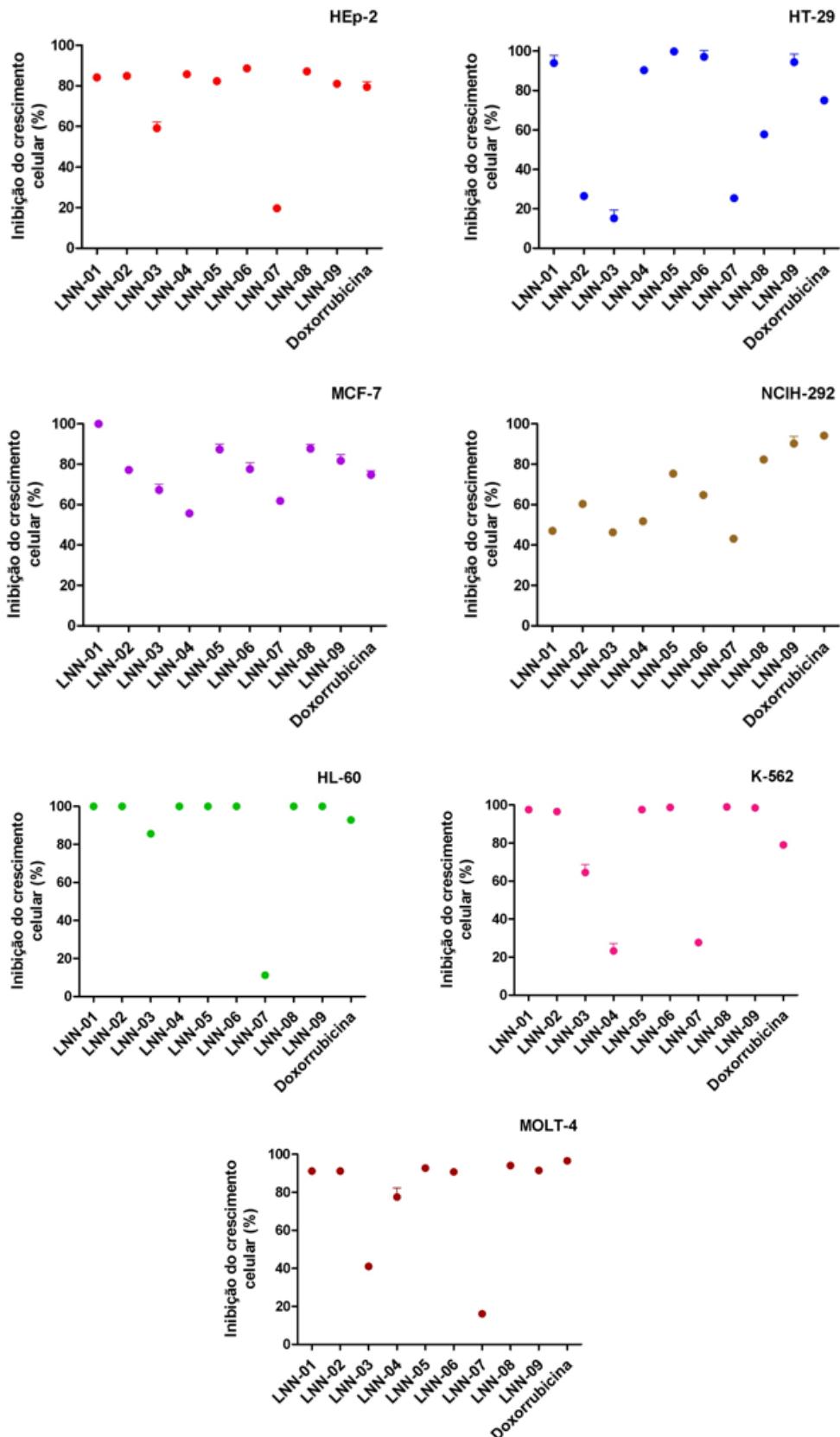
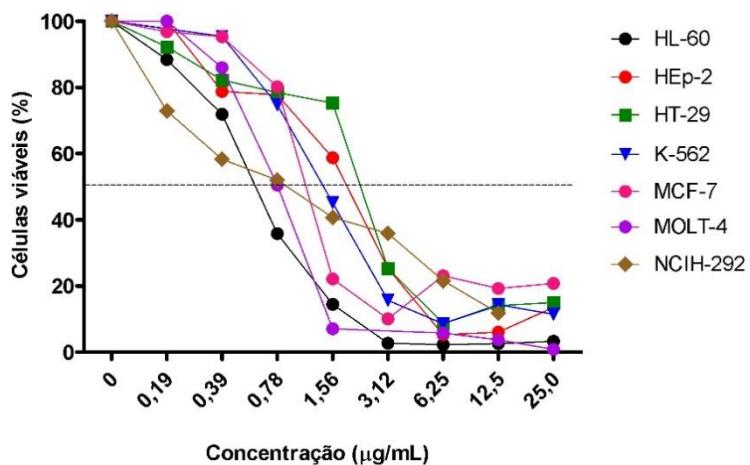


Tabela 5. IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) dos compostos 5-nitrotiofeno-tiosemicarbazônicos (LNN-01 a LNN-09) e doxorrubicina (controle positivo) em células neoplásicas e em células mononucleares de sangue periférico humano (CMSPH), através do ensaio colorimétrico MTT e alamar blue, após 72 horas de tratamento.

Compostos	Concentração inibitória média (IC_{50} - $\mu\text{g/mL}$)							
	Intervalo de confiança (IC95%)							
	HEp-2	HL-60	HT-29	K-562	MCF-7	MOLT-4	NCIH-292	CMSPH
LNN-01	1,2 (1,0-1,5)	0,7 (0,6-0,7)	2,5 (2,3-2,8)	1,5 (1,2-1,9)	2,0 (1,7-2,4)	1,2 (1,0-1,5)	> 25	4,4 (1,5-12,9)
LNN-02	5,5 (4,5-6,8)	0,4 (0,4-0,5)	> 25	3,8	1,7 (1,5-2,0)	2,0 (1,8-2,4)	> 25	10,4 (6,5-16,7)
LNN-03	> 25	0,3 (0,2-0,4)	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25
LNN-04	15,8 (12,2-20,5)	0,8 (0,7-0,9)	1,0 (0,8-1,2)	> 25	> 25	0,5 (0,4-0,6)	> 25	4,5 (3,0-6,6)
LNN-05	1,9 (1,5-2,3)	0,5 (0,5-0,5)	1,9 (1,5-2,5)	1,4 (1,2-1,6)	1,0 (0,8-1,3)	0,7 (0,6-0,8)	0,8 (0,7-1,0)	5,6 (0,6-0,8)
LNN-06	2,1 (1,6-2,6)	0,7 (0,6-0,9)	4,2 (3,2-5,6)	1,3 (1,1-1,5)	5,7 (4,2-7,8)	1,0 (0,9-1,2)	> 25	4,5 (3,0-6,8)
LNN-07	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	5,9 (4,3-7,9)
LNN-08	5,4 (4,2-7,1)	1,2 (1,1-1,3)	3,3 (2,4-4,5)	1,2 (0,9-1,4)	7,8 (6,2-9,8)	0,5 (0,3-0,7)	2,8 (2,1-3,6)	14,4 (11,8-17,5)
LNN-09	21,2 (11,5-39,1)	1,2 (1,1-1,3)	3,8 (3,2-4,7)	1,9 (1,6-2,3)	7,7 (5,8-10,2)	1,7 (1,4-2,1)	3,0 (2,7-3,4)	9,4 (8,1-10,8)
Doxorrubicina	0,7 (0,3-1,4)	0,06 (0,05-0,08)	0,4 (0,3-0,5)	0,14 (0,009-0,23)	0,11 (0,08-0,15)	0,04 (0,04-0,05)	0,01 (0,004-0,3)	0,38 (0,35-0,43)

Figura 8. Concentração inibitória média (IC_{50}) do derivado LNN-05 em diferentes linhagens de células neoplásicas humanas.



Como pode ser notado o composto LNN-05 apresentou perfil citotóxico semelhante em todas as linhagens utilizadas, exibindo IC_{50} para a linhagem neoplásica HL-60 de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Os efeitos citotóxicos indicados pelos derivados 5-nitrotifeno-tiosemicarbazônicos, revelam a importância dos testes de citotoxicidade para o estudo e o desenvolvimento de novas moléculas, com possíveis atividades biológicas. Estes ensaios, ao permitirem a análise dessas substâncias, possibilitam a identificação da concentração eficaz em provocar 50% de morte celular (IC_{50}), informação que se torna fundamental para a determinação do composto a ser utilizado no transcorrer das pesquisas.

Segundo os parâmetros definidos pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI), uma substância é considerada citotóxica quando apresenta $IC_{50} \leq 4,0 \mu\text{g}/\text{mL}$ (ITHARAT et al., 2004). Tais critérios reforçam que os derivados LNNs avaliados, apresentam considerável potencial citotóxico em células tumorais humanas.

De acordo com a literatura, a toxicidade dos nitrocompostos está relacionada, principalmente, ao fato do grupo nitro ter potencial para ser reduzido a grupo amino, com a consequente interação das espécies reativas de oxigênio com os componentes intracelulares (PAULA; SERRANO; TAVARES, 2009). Entretanto, o potencial antiproliferativo dos derivados 5-nitrotifeno-tiosemicarbazônicos poderá também ser atribuído a presença dos diferentes substituintes no anel fenila, assim como a porção tiosemicarbazônica (OLIVEIRA et al., 2015).

Recentemente, Oliveira e colaboradores (2015) avaliaram a atividade antitumoral de novos derivados 2-(tifeno-2-il-metileno)-tiosemicarbazona-*N*-substituída, frente a nove

linhagens de células tumorais humanas, com destaque para os derivados 6 (*p*-clorofenil) e 7 (*p*-bromofenil), que apresentaram respectivamente IC_{50} de 8,3 μM e 4,2 μM para MCF-7, e de 7,4 μM e 4,5 μM para a linhagem de células de adenocarcinoma renal (786-0). Os resultados também indicaram que a introdução do grupo etil como espaçador na estrutura do composto 11 (2-feniletil), não colaborou para ação citotóxica desse derivado. Dessa forma, a inatividade do composto LNN-07 para todas as linhagens testadas pode ser atribuída à característica única desse derivado que possui um espaçador (-CH₂-CH₂-) entre a tiossemicarbazida e o anel fenila. Esse fato indica que a ligação direta entre o anel fenila e a tiossemicarbazida é essencial para a atividade antitumoral dessas moléculas.

No entanto, vale ressaltar que todos os derivados demonstraram-se menos tóxicos para as células normais quando comparados com o fármaco controle (doxorrubicina). A doxorrubicina embora utilizado na terapia anticâncer pelo seu amplo espectro de atividades, tem a sua administração limitada, principalmente por causar cardiotoxicidade e alterações renais decorrente da sua ação mediada por radicais livres (GRANADOS-PRINCIPAL, 2010). Dessa maneira, os resultados indicam que os derivados 5-nitrotifeno-tiossemicarbazônicos podem apresentar-se como moléculas promissoras para o desenvolvimento de novos agentes antineoplásicos, visto o perfil citotóxico dos LNNs frente às células mononucleares de sangue periférico humano. Além disso, estes derivados demonstraram não provocar hemólise em eritrócitos humanos, o que sugere que seus efeitos citotóxicos estejam associados a um mecanismo de morte mais específico e não diretamente a algum dano causado na membrana plasmática da célula (COSTA-LOTUFO et al., 2002; COSTA et al., 2008).

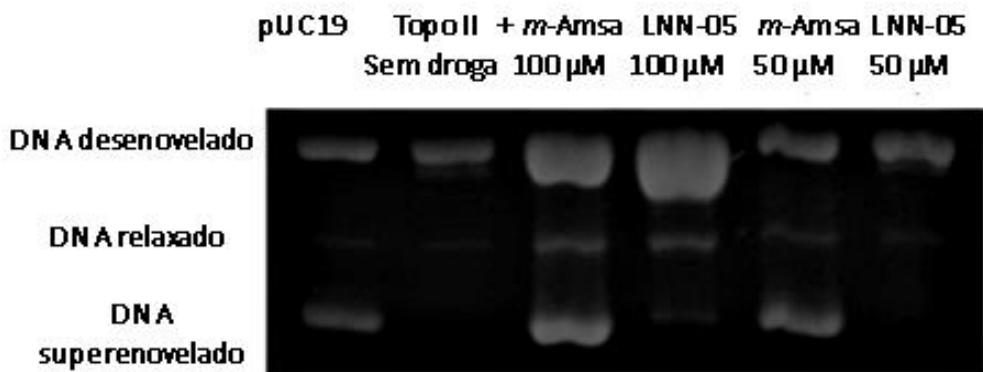
5.2 Análise da inibição de topoisomerase II

Os ensaios realizados nesta etapa tiveram como objetivo analisar um possível efeito inibitório do derivado LNN-05 sobre a atividade da topoisomerase II. Os testes indicaram que o composto avaliado na concentração de 50 μM não apresenta atividade inibidora sobre topo II, visto que o DNA superenovelado foi completamente relaxado pela enzima, comprovando com isso a sua atividade. Contudo, foi possível observar uma leve inibição da topoisomerase II quando a concentração do derivado foi aumentada para 100 μM (Figura 9).

Estes dados apontam que o derivado LNN-05, não exibe potencial em inibir a topoisomerase II, embora este composto apresente em sua estrutura a molécula tiossemicarbazona, a qual tem sido atribuída a habilidade de interação com o DNA (ALI et al.,

2014). Segundo estudos realizados por Geng e colaboradores (2013), o derivado (*E*)-2-((1,4-diidroxi-9,10-antraquinona-2-il)metileno)-*N*-(4-fluorofenil) hidrazanacarbotioamida (DAFPT), mostrou propriedade de ligação com DNA, sendo evidenciado através de espectroscopia de absorbância, fluorescência e modelagem molecular. No entanto, os nossos resultados propõem que os derivados LNNs atuam através de outros mecanismos de ação, fazendo-se assim necessário a investigação de possíveis vias de morte celular.

Figura 9. Análise da inibição de topoisomerase II pelo LNN-05.



Linha 1: DNA (plasmídeo) pUC19 superenovelado. Linha 2: pUC19 e topo II na ausência do LNN-05. Linhas 3 e 4: pUC19, topo II e amsacrina (fármaco controle); pUC19, topo II e LNN-05 na concentração de 100 μ M. Linhas 5 e 6: pUC19, topo II e amsacrina; pUC19, topo II e LNN-05 na concentração de 50 μ M.

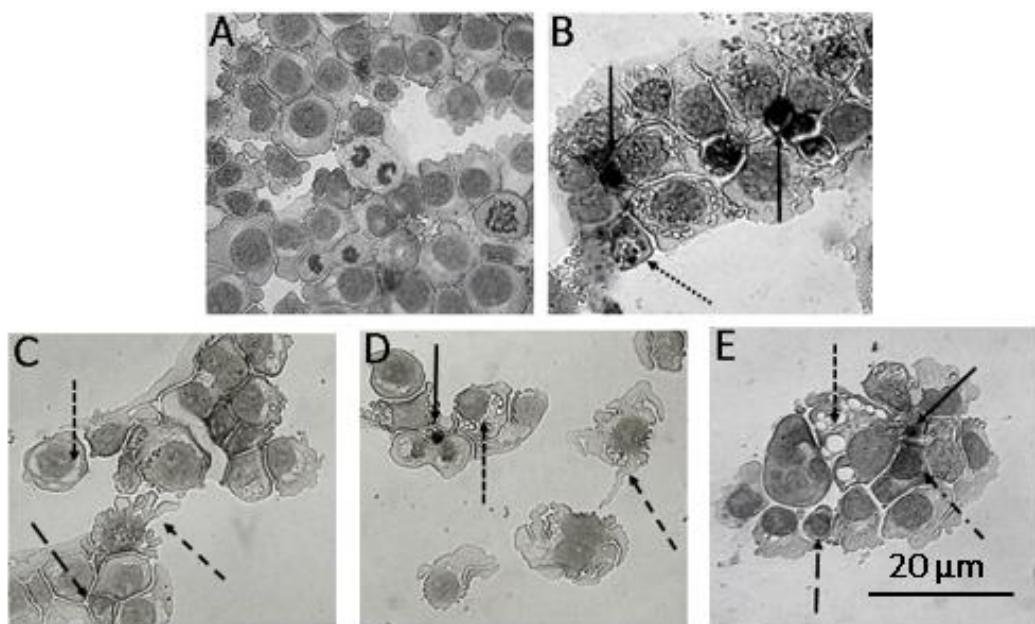
5.3 Análise morfológica - Coloração por hematoxilina/eosina

A análise morfológica, realizada através de microscopia óptica, revelou que as células K-562 tratadas com o derivado LNN-05 nas concentrações de (0,7; 1,4 e 2,8 μ g/mL) apresentaram características morfológicas de morte por apoptose (Figura 10). Dentre estas alterações, destacam-se: núcleos picnóticos, corpos apoptóticos, vacuolização, redução do volume celular, núcleos condensados e formação de prolongamentos da membrana plasmática (*blebs*). As células do grupo controle negativo (não tratadas) demonstraram membrana íntegra, citoplasma homogêneo, células em divisão e nítida visualização das membranas plasmática e nuclear (Figura 12A).

Morfologicamente, as células K-562 exibem características típicas de leucemia mielóide crônica, com a presença de células imaturas com citoplasma basófilo, núcleo central ocupando dois terços do volume celular, superfície celular irregular e uma região perinuclear clara (CARVALHO, 2013). Segundo Santos (2016) alterações morfológicas, como condensação da

cromatina, degeneração celular e formação de *blebbing* indicam apoptose em células K-562 quando tratadas com o composto LQFM166. Além disso, pesquisa realizada por Alves (2011) demonstrou prolongamentos da membrana plasmática e aumento de vacuolização em K-562 quando expostas ao fármaco Imatinib. Ademais, Bigolin (2016) evidenciou que células K-562 tratadas com o composto sulfonamida DFS16 apresentaram características morfológicas típicas de apoptose, com formação de corpos apoptóticos e perda de integridade da membrana. Desta forma, tais características contribuem com os resultados obtidos neste estudo, que sugerem a apoptose como possível tipo de morte celular induzida pelo derivado LNN-05.

Figura 10. Fotomicrografias de células K-562, após 72 horas de tratamento com o derivado LNN-05.



5.4 Análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi m$)

A avaliação do potencial transmembrânico ($\Delta\psi m$) foi realizada por citometria de fluxo, utilizando rodamina 123 como agente fluorogênico, após 72 horas de tratamento.

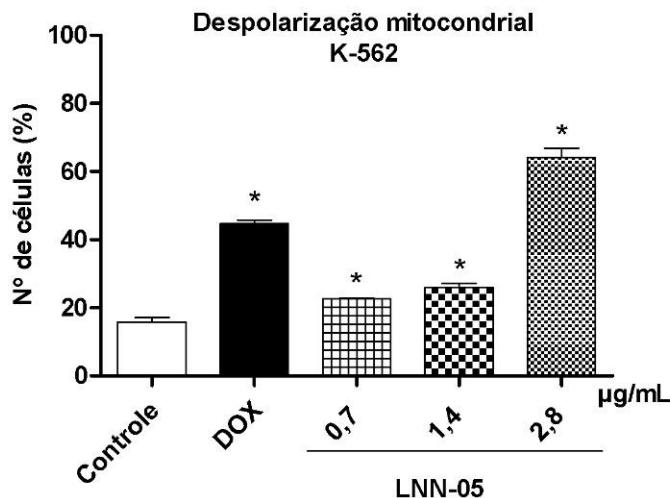
A Figura 11 mostra um aumento significativo ($p < 0,05$) da despolarização mitocondrial, provocado pelo derivado LNN-05 nas concentrações de 1,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 2,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sendo esta mais ativa que a doxorrubicina (controle positivo). Em todas as doses, o que inclui 0,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$, o

composto estudado promoveu $\Delta\psi m$ em $22,6 \pm 0,2\%$; $26,0 \pm 1,1\%$ e $64,2 \pm 2,5\%$, respectivamente.

Com esses dados foi possível notar que o composto LNN-05, provocou despolarização da membrana mitocondrial de forma dose-dependente nas células K-562, a partir de $0,7 \mu\text{g/mL}$. Esses resultados levam a indícios que o LNN-05 induz a apoptose, visto que o envolvimento da mitocôndria é uma característica importante para o surgimento desse tipo de morte celular. Segundo estudo realizado por Altintop e colaboradores (2016), o derivado 4-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-[(1,10-bifenil]-4-ilmetíleno)tiosemicarbazida aumentou a apoptose precoce e tardia, bem como o potencial de perturbação da membrana mitocondrial em 63,7 % e 57,9% quando analisado, respectivamente em células de glioma de rato (C6) e adenocarcinoma de pulmão humano (A549).

Pessoto e colaboradores (2015) ao sintetizarem uma série de derivados tiosemicarbazona *p*-substituído acetofenona (TSC-H, TSC-F, TSC-Cl, TSC-Me e TSC-NO₂), observaram o efeito destes produtos na despolarização mitocondrial em células K-562. Os resultados demonstraram perda significativa do $\Delta\psi m$ após 3 horas de incubação nas concentrações de 0,01 e 0,1 mM, com completa perda da $\Delta\psi m$ na dose de 1 mM, após 1 hora de tratamento.

Figura 11. Potencial transmembrânico do composto LNN-05 em células K-562, após 72 horas de tratamento.



Controle negativo: Controle; Controle positivo: Dox - 0,15 $\mu\text{g/mL}$; Composto LNN-05: 0,7, 1,4 e 2,8 $\mu\text{g/mL}$. Os experimentos foram expressos pela média \pm erro médio de dois experimentos independentes. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento. Valores de * $p<0,05$ foram considerados significativos comparado com o controle negativo por ANOVA seguido por Dunnett.

5.5 Avaliação da progressão do ciclo celular realizado por citometria de fluxo

A análise do efeito citostático do composto LNN-05 em células K-562 após 72 horas de incubação, revelou um aumento significativo ($p < 0,05$) de células na fase G1 quando tratadas com 1,4 $\mu\text{g/mL}$, e redução na fase G2/M quando tratadas nesta concentração e com 2,8 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 12). A Tabela 6 demonstra que o tratamento com as diferentes concentrações do derivado LNN-05 (0,7, 1,4 e 2,8 $\mu\text{g/mL}$) provocou aumento de células em G1 de $66,0 \pm 2,3\%$; $86,1 \pm 0,3\%$ e $70,3 \pm 7,0\%$, enquanto o controle negativo e positivo, apresentaram respectivamente $65,5 \pm 1,0\%$ e $59,5 \pm 2,5\%$.

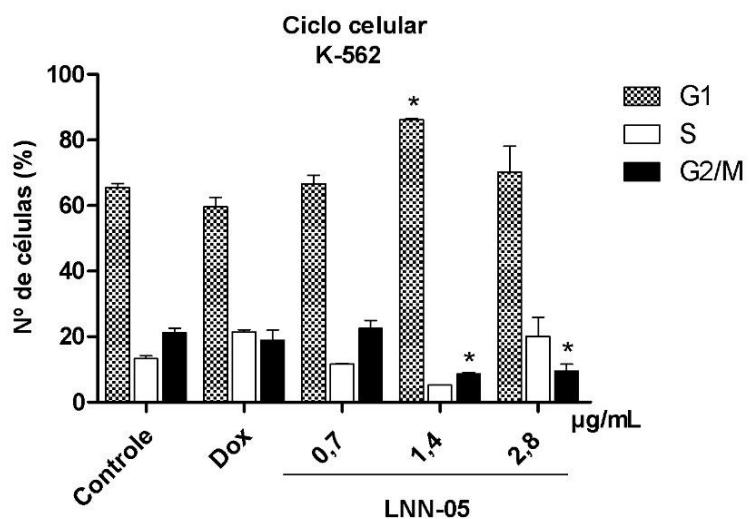
Os dados obtidos nesta avaliação indicam que o composto LNN-05 promove arrasto do ciclo celular na fase G1, o que corrobora com os achados da pesquisa de Oliveira e colaboradores (2015) que demonstraram o efeito do derivado tiofeno-tiosemicarbazona (7: *p*-bromofenil), em aumentar a população celular de adenocarcinoma renal (786-0) na fase G1 em $44,9 \pm 1,8\%$. Além disso, Liu et al. (2014) evidenciaram que o tratamento com o novo composto S115 (heteroaromático tiosemicarbazona) na concentração de 1,5 μM , bloqueou as células de câncer de pulmão (A549) na subfase G0/G1 em 72,5%, após 48 horas de incubação.

Segundo Jianyong et al. (2010) e Kamal et al. (2010), o aumento significativo de células na subfase G1 está associado a apoptose, contribuindo assim com os resultados do LNN-05 que

indicam esse tipo de morte celular em células K-562, visto que o ponto de checagem G1 é dependente da ativação de p53, o qual não possibilitando o reparo de danos ao DNA via pRb, induz às células a morte celular (LACERDA, 2012; DONEHOWER, 2014).

Dessa maneira, o aumento da proteína p53 mediante presença de dano ao DNA estimula a expressão de CDK p21, de tal forma que essa superexpressão, bloqueia determinadas ativações dos complexos CiclinaD-CDK-4; CiclinaD-CDK-6; CiclinaE-CDK-2 e CiclinaA-CDK-2, provocando o término do ciclo celular nas fases G1 ou S (PASTERNAK, 2002). Ademais, a depleção de células em G2/M provocada pelo derivado LNN-05, pode ser relacionado a redução dos níveis de Ciclina B1, que em condições normais participa do complexo p34-Ciclina-B1, principal regulador do ciclo celular no ponto de verificação G2/M (MEDINA; TURNER; GORDAN, 2016).

Figura 12. Efeito do composto LNN-05 nas fases do ciclo celular em células K-562, após 72 horas de incubação.



Controle negativo: Controle; Controle positivo: Dox - 0,15 µg/mL; Composto LNN-05: 0,7, 1,4 e 2,8 µg/mL. Os experimentos foram expressos pela média ± erro médio de dois experimentos independentes. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento. Valores de *p<0,05 foram considerados significativos comparado com o controle negativo por ANOVA seguido por Dunnett.

Tabela 6. Progressão do ciclo celular de K-562 tratadas com LNN-05 (0,7, 1,4 e 2,8 µg/mL) e doxorrubicina (0,15 µg/mL), após 72 horas de tratamento.

Tratamento	G1	S	G2/M
Controle	65,5 ± 1,0	13,3 ± 0,7	21,1 ± 1,2
Doxorrubicina	59,9 ± 2,5	21,4 ± 0,5	18,9 ± 2,7
LNN-05 (0,7 µg/mL)	66,0 ± 2,3	11,6 ± 0,1	22,5 ± 2,2
LNN-05 (1,4 µg/mL)	86,1 ± 0,3	5,1 ± 0,03	8,6 ± 0,3
LNN-05 (2,8 µg/mL)	70,3 ± 7,0	20,1 ± 5,2	9,5 ± 1,8

Os resultados expressos em porcentagem estão representados por média ± erro médio. No total foram obtidos 5000 por experimentos, de dois experimentos independentes, com valores de *p<0,05 comparado ao grupo controle negativo por ANOVA seguido de Dunnett.

5.6 Estudo de docagem molecular

Neste estudo, os compostos foram analisados quanto às afinidades de ligação com a enzima ribonucleotídeo redutase (RR), principal alvo das tiossemicarbazonas. A energia obtida pela docagem molecular revelou que os derivados LNN-02, LNN-03, LNN-06 e LNN-07 apresentam uma maior afinidade para a formação do complexo ligante-receptor (Tabela 7). Além disso, foi observado que todos os compostos em suas conformações e poses de menor energia interagiram no sítio alvo da RR (Figura 13), sendo evidenciado o envolvimento dos resíduos Glicina50, Valina51, Treonina52, Metionina14 e principalmente, a Arginina21 que formou interações com todas as moléculas no grupamento nitro, mostrando que esse radical é muito importante para estabilização do complexo. Na Figura 14, está representada a visualização tridimensional e bidimensional da interação entre o derivado de maior afinidade (LNN-03) com a ribonucleotídeo redutase.

Tabela 7. Energias de afinidade finais (E_F) dos derivados 5-nitrotiofeno-tiossemicarbazônicos com a enzima ribonucleotídeo redutase.

Compostos LNNs	Energias (Kcal/mol)
LNN-01	-6.2600
LNN-02	-6.8600
LNN-03	-7.8400
LNN-04	-5.8400
LNN-05	-6.3900
LNN-06	-6.9800
LNN-07	-6.8200
LNN-08	-6.4600
LNN-09	-6.3000

Figura 13. Interação 3D dos derivados LNNs com a enzima ribonucleotídeo redutase (RR).

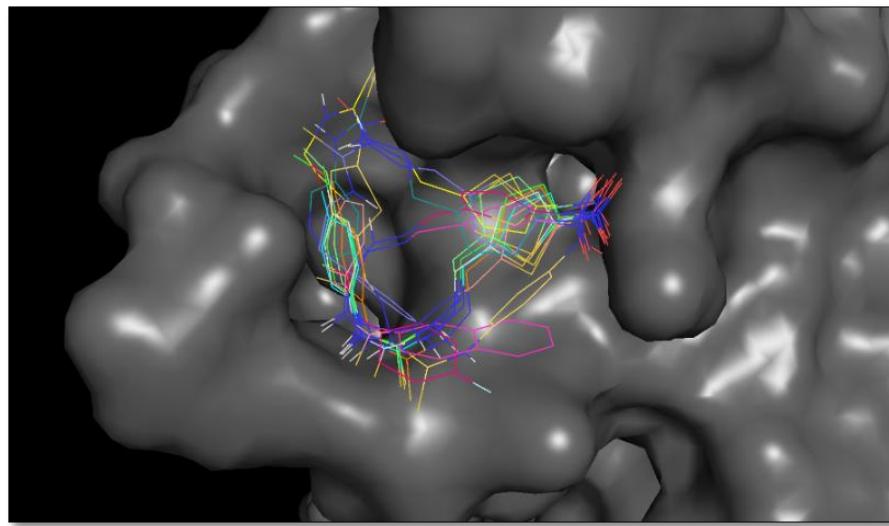
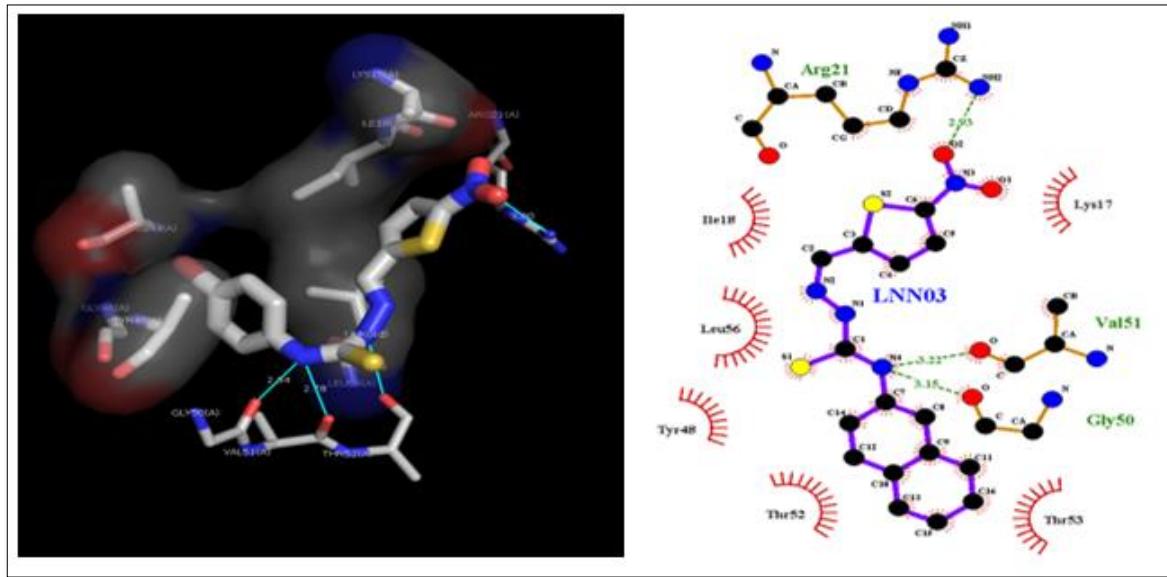


Figura 14. Interação do melhor ligante (menor energia de afinidade) com a RR.



O ligante está representado pelas linhas mais espessas, as linhas mais finas são os resíduos que exerceram influência na formação do complexo; as linhas azul-claros representam as ligações de hidrogênio entre o resíduo e o ligante, enquanto que os demais resíduos atuam no contato hidrofóbico.

A análise deste estudo evidenciou que o derivado LNN-05 escolhido para o prosseguimento dos testes de mecanismo de ação, não apresenta grande afinidade com a ribonucleotídeo redutase, o que sugere ausência de potencial inibitório enzimático. Entretanto, dentre as moléculas, destaca-se o LNN-03 que exibiu maior afinidade com o receptor, corroborando com os achados da pesquisa realizada por Popovic et al (2011), a qual demonstrou a interação dos derivados aril/heteroaril-tiosemicarbazona com a forma oxidada

de ferro da subunidade R2 da proteína RR. Além disso, a análise realizada através da relação de atividade de estrutura quantitativa (QSAR) revelou que as propriedades da área de superfície da triapina e de outros compostos tiossemicarbazona, são importantes para a inibição da ribonucleotídeo redutase (MOORTHY et al., 2013).

6. CONCLUSÃO

- Os novos derivados 5-nitrotifeno-tiosemicarbazônicos (LNN-01, LNN-02, LNN-03, LNN-04, LNN-05, LNN-06, LNN-08 e LNN-09) foram citotóxicos para todas as linhagens de células tumorais humanas;
- O composto LNN-05 (fenil não substituído) exibiu melhor atividade citotóxica;
- Todos os derivados analisados mostraram eficácia em não causar hemólise em eritrócitos humanos, bem como menor citotoxicidade em CMSPH quando comparados a doxorrubicina;
- O derivado LNN-03 apresentou maior afinidade com a enzima ribonucleotídeo redutase no estudo de docagem molecular;
- O tratamento com LNN-05 não induziu a inibição da enzima topoisomerase II, porém provocou alterações morfológicas e despolarização mitocondrial em células K-562, o que sugere a apoptose como possível mecanismo de morte celular;
- Além disto, o composto LNN-05 apresentou efeito citostático em células K-562, com parada do ciclo celular em G1.

REFERÊNCIAS

- ABU-HASHEM, A.A.; SHEHRY, M. F.; BADRIA, F. A. E. Design and synthesis of novel thiophenecarbohydrazide, thienopyrazole and thienopyrimidine derivatives as antioxidant and antitumor agents. *Acta Pharmaceutica*, v. 60, p. 311-323, 2010.
- AIRD, K.M. e ZHANG, R. Nucleotide metabolism, oncogene-induced senescence and cancer. *Cancer Letters*, *in press*, 2014.
- ALI, A. Q.; TEOH, S. G.; ELTAYEB, N.E.; AHAMED, M. B. K.; MAJID A. M. S. A. Synthesis of copper (II) complexes of isatin thiosemicarbazone derivatives: In vitro anti-cancer, DNA binding, and cleavage activities. *Polyhedron*, v.74, p. 6–15, 2014.
- ALLINGER, N. L. Conformational analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms. *Journal of the American Chemical Society*, n. 99, v. 25, p. 8127-8134, 1977.
- ALEKSANDRUSHKINA, N. I.; VANYUSHIN, B. F. Endonucleases and apoptosis in animals. *Biochemistry*, v. 77, n. 13, p. 1436-1451, 2012.
- AL-MUSAYEIB. N. M.; MOHAMED, G. A.; IBRAHIM, S. R. M.; ROSS, S. A. New Thiophene and flavonoid from Tagetes minuta leaves growing in Saudi Arabia. *Molecules*, v. 19, p. 2819-2828, 2014.
- ALVES, R. F. S. Avaliação dos mecanismos envolvidos na sensibilidade e resistência ao Imatinib independente do *BCR-ABL* em Leucemia Mieloide Crônica. (Dissertação), Universidade de Coimbra, 2011.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos, v. 2, p. 1-48, Brasília, 2013.
- AHMED, S. A.; GOGAL JR, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple none-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. *Journal Immunolgy Methods*, v. 170, n. 2, p. 211-224, 1994.
- ALTINTOP, M. D.; TEMEL, H. E.; SEVER, B.; ÇIFTÇI, G. A.; KAPLANCIKLI, Z.. A. Synthesis and evalution of new benzodioxole-based thiosemicarbazone derivates as potential antitumor agents. *Molecules*, v.21, n.11, p. 1-19, 2016.
- ALMEIDA, S. M.; LAFAYETTE, E. A.; SILVA, L. P.; AMORIM, C. A.; OLIVEIRA, T. B.; RUIZ, A. L.; CARVALHO, J. E.; MOURA, R. O.; BELTRÃO, E. I.; LIMA, M. C.; JÚNIOR, L. B. Synthesis, DNA binding, and antiproliferative activity of novel acridine–thiosemicarbazone derivatives. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, n. 6, p. 13023-13042, 2015.

AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). History of cancer (2014). Disponível em:<www.cancer.org/cancer>. Acesso em: 04 Out. 2015.

ANDRADE, WANESSA MACHADO. *Investigação antitumoral in vitro e in vivo da Eugenia dysenterica DC. (MYRTACEAE)*. (Dissertação), Universidade Federal de Goiás, 2011.

ARORA, M.; SARAVANAN, S.; MOHAN, S.; BHATTACHARJEE, S. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of some schiff bases Of 2-amino-n-(p-acetamidophenyl carboxamido)-4,5,6,7-tetramethyleneThiophenes. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 5, n. 1, p. 315-319, 2013.

A-SHAABAN, M.; GHORAB, M. M.; HEIBA, H. I.; KAMEL, M. M.; ZAHER, N. H.; MOSTAFA, M. Novel Thiophenes, thienopyrimidines, and triazolothienopyrimidines for the evaluation of anticancer and augmentation effects of γ -radiation. *Arch Pharm Chemistry in Life Sciences*, v. 343, p. 404-410, 2010.

AYE, Y.; LONG, M. J. C.; STUBBE, J. Mechanistic Studies of Semicarbazone Triapine Targeting Human Ribonucleotide Reductase in Vitro and in Mammalian Cells Tyrosyl radical quenching not involving reactive oxygen species. *The Journal of Biological Chemistry*, v.287, n. 42, p. 35768–35778, 2012.

BAO, Q.; SHI, Y. Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death and Differentiation*, v. 14, n. 1, p. 56-65, 2007.

BARROS, A. L. S. Avaliação da inibição do crescimento tumoral pelo tratamento com ácido valpróico, atorvastatina e pioglitazona isoladamente e em associação. (Dissertação), Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, 2010.

BATISTA, T. M. *Avaliação da toxicidade in vitro e in vivo do extrato hidro alcóolico das oartes aéreas de Zornia brasiliensis Vog. (Fabaceae)*. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Farmácia. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, p. 14, 2013.

BAUER, N. Cytological collection techniques and sample preparation. In: Manual of Diagnostic Cytology of the Dog and Cat. *Dunn, J*, p. 1-15, 2014.

BEDNARCZUK, V. O.; VERDAM, M. C. S.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Testes in vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. Visão Acadêmica, Curitiba, v.11, n.2, 2010.

BÉNÉRÉ, E.; da LUZ, R. A. I.; VERMEERSCH, M.; COS, P.; MAES, L. A.; A new quantitative in vitro microculture method of *Giardia duodenalis* trophozoites. *Journal of Microbiological Methods*, v. 71, n. 2, p. 101-106, 2007.

BIGOLIN, A. *Investigação do mecanismo de morte celular induzido por compostos em células de linhagens de neoplásicas hematológicas*. (Dissertação). Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, 2016.

BOWDEN, N. A. Nucleotide excision repair: why is it not used to predict response to platinum-based chemotherapy? *Cancer Letters*, v. 346, p. 163-171, 2014.

BOWER J. J.; KARAKA, G.; ZHOU, Y.; SIMPSON, D. A.; MARILA, CORDEIRO-STONE, M.; KAUFMANN, W. Topoisomerase II α maintains genomic stability through decatenation G2 checkponit signaling. *Oncongene*, v. 29, n. 34, p. 4787-4799, 2010.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Química Nova*, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRUIN, E. C.; MEDEMA, J. P. Apoptosis and non-apoptotic deathsin cancer development and treatment response. *Cancer Treatment Reviews*, v. 34, n. 8, p. 737-749, 2008.

CALA, A. E. P.; CEPENA, E. G.; ARIAS, O. D. R. E. Cáncer como respuesta adaptativa. *Medisan*, v. 16, n. 2, p. 236-247, 2012.

CALABRETTA, B.; PEROTTI, D. The biology of CML blast crisis. *Blood*, v. 103, n. 11, p. 4010, 2004.

CARVALHO, N. C. Avaliação da atividade antineoplásica do extrato etanólico de própolis G6 baiana. (Dissertação), Fundação Oswaldo Cruz, 2013.

CERQUEIRA, N. M. F. S. A.; FERNANDES, P. A.; RAMOS, M. J. Ribonucleotide Reductase: a Critical Enzyme for Cancer Chemotherapy and Antiviral Agents. *Recent Patents on Anti- Cancer Drug Discovery*, v. 2, p.11-29, 2007.

CHAUDHARY, A.; JHA, K. K.; KUMAR, S. Biological diversity of thiophene. *Journal of Advanced Scientific Research*, vol. 3; n. 3; p. 3-10, 2012.

CHAUDHARY, K. K; MISHRA, N. A review on molecular docking: novel tool for drug Discovery. *JSM Chemistry*, n. 4, v. 3, 2016.

CHOWDHURY, I.; THARAKAN, B.; BHAT, G.K. Caspases - an update. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B*, v. 151, p. 10-27, 2008.

CHAMAS, R. Biologia do cancer: uma breve introdução. Tratado de Oncologia, São Paulo, p. 1-5, 2013.

COSTA, P. M.; FERREIRA, P. M.; BOLZANI, V. D.; FURLAN, M.; SANTOS, V. A.; CORSINO, J.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; PESSOA, C. Antiproliferative activity of pristimerin isolated from Mayneus ilicifolia (Celastraceae) in human HL-60 cells. *Toxicology in Vitro*, v. 22, n. 4, p. 854-863, 2008.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos

fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade do Ceará. *Revista Virtual Química*, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

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

COSTA-SOUZA, F. Generation and characterization of isogenic cell lines harborin p53 mutants: A model for the evaluation of p53 and p16INK4A replacement in the presence of p53R175H and p53R248Q. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2011.

COULIDIATI, H. T. **Avaliação dos efeitos anticancerígenos dos 1,2,3-triazóis derivados do núcleo 1,4-naftoquinona em linhagens leucêmicas humanas.** (Tese). Universidade Federal da Paraíba, UFPB, 2014.

DANTAS, B.B. **Avaliação do efeito anticâncer de compostos sintéticos derivados do núcleo tetraidropirano.** (Dissertação). Universidade Federal da Paraíba, UFPB, 2014.

DEWAR, M. J.S.; ZOEBISCH, E. G.; HEALY, E. F.; STEWART, J. J. P. Development and use of quantum mechanical models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. *Journal of the American Chemical Society*, n. 107, v. 13, p. 3902-3909, 1985.

DIAS, K.S.; VIEGAS, C. Jr. Multi-target directed drugs: a modern approach for design of new drugs for the treatment of alzheimer's disease. *Current Neuropharmacology*, n. 12, p. 239-55, 2014.

DONEOWER, L. Phosphatases reverse p-53-mediated cell cycle checkponits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 111, n. 20, p. 7172-71-73, 2014.

DUARTE, C. R. A. **Avaliação da citotoxicidade in vitro de composições de fosfato de cálcio para uso em reparação óssea.** (Dissertação), Universidade do Estado de Santa Catarina, UDESC, 2015.

EFFERTH, T.; KOCH, E. Complex interactions between phytochemicals. The multi-target therapeutic concept of phytotherapy. *Current Drug Targets*, v. 12, n. 1, p. 122-132, 2011.

EL-SHARKAWY, K. A.; SAID, M. M.; DARDAS, G. Synthesis and antitumor activity of some fused heterocyclic compounds based on cyclohepta[b]thiophene derivate. *Bulgarian Chemical Communications*, v. 46, n. 4, p. 691-699, 2014.

EL-SHARIEF, M. A. M. S.; ABBAS, S. Y.; EL-BAYOUKI, K. A. M.; EL-GAMMAL, E. W. Synthesis of thiosemicarbazones derived from N-(4-hippuric acid) thiosemicarbazide and different carbonyl compounds as antimicrobial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 67, p. 263-268, 2013.

FARIAS, D. C. O; IMADA, L. F.Y; KATAYAMA, L. ANÁLISE DO EFEITO DE TOXICIDADE DO CHORUME UTILIZANDO ARTEMIA SALINA. **Revista Ciências do ambiente Online**, Brasil, v. 6, n. 1, p. 83-85, 2010.

FERREIRA, C. G.; RICHA, J. C. **Oncologia Molecular**. 2 ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2010.

FERREIRA, R. S.; GLAUCIUS, O.; ANDRICOPULO, A. D. Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios em P&D de fármacos. **Química Nova**, v. 34, p. 17770-1778, 2011.

FOUCHE, G.; CRAGG, G. M.; PILLAY, P.; KOLESNIKOVA, N.; MAHARAJ, V. J.; SENABE, J. *In vitro* anticancer screening of South African plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 3, p. 455-461, 2008.

FRANCISCHETTI, I.; MORENO, J. B.; SCHOLZ, M.; YOSHIDA, W. B. Os leucócitos e a resposta inflamatória na lesão de isquemia-reperfusão. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 25, n. 4, p. 575-584, 2010.

GALLUZZI, L.; PEDRO, J. M. B. S.; KROEMER, G. Organelle-specific initiation of cell death. **Nature Cell Biology**, v. 16, n. 8, 2014.

GARCÍA, A.; HAZA, A.; MORALES, P. N-nitrosopiperidina y N-nitrosodibutilamina (II):relevancia en la carcinogénesis química y genotoxicidad. **Revista Complutense de Ciencias Veterinarias**, v. 5, n. 1, p. 48-68, 2011.

GENG, S.; WU, Q.; SHI, L.; CUI, F. Spectroscopic study one thiosemicarbazone derivative with ctDNA using ethidium bromide as a fluorescence probe. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 60, p. 288– 294, 2013.

GRANADOS-PRINCIPAL, S.; QUILES, J. L.; RAMIREZ-TORTOSA, C. L.; SANCHEZ-ROVIRA, P., RAMIREZ-TORTOSA, M. New advances in molecular mechanisms and the prevention of adriamycin toxicity by antioxidant nutrients. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1425-1438, 2010.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 4, p. 646-674, 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.

HONG, J. R. Betanavirus: mitochondrial disruption and necrotic cell death. **World Journal of Virology**, v. 2, n. 1, p. 1-5, 2013.

HOLOHAN, C.; VAN SCHAEYBROECK, S.; LONGLEY, D. B.; JOHSTON, P. G. Cancer drug resistance: an evolvingparadigma. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, p. 714-726, 2013.

HOUSMAN, G.; BYLER, S.; HEEBOTH, S.; LAPINSKA, K.; LONGACRE, M.; SNYDER, N, et al. Drug resistance in cancer: an overview. **Cancers (Basel)**, v. 6, p. 1769-1792, 2014.

HYBERCUBE. Hyperchem, release 8.0. 7 for Windows. Gainesville, FL, USA, 2009.

INDRAN, I. R.; TUFO, G.; PERVAIZ, S.; BRENNER, C. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1807, p. 735-745, 2011.

ITHARAT, A.; HOUGHTON, P. J.; ENO-AMOOQUAVE, E.; BURKE, P. J.; SAMPSON, J. H.; RAMAN, A. In vitro cytotoxic activity of thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 90, p. 33-38, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estatísticas do câncer, programa de epidemiologia e vigilância do câncer e seus fatores de risco, Secretaria de atenção à saúde, Coordenação de prevenção e vigilância. Rio de Janeiro, 2015. Disponível em:<<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016>>. Acesso em: 20 Out 2015.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Câncer. Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <<http://www.2.inca.gov.br>

Acesso em: 15 Mar 2016.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). ABC do câncer: Abordagens básicas para o controle do câncer. Rio de Janeiro, 2012.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Câncer: um problema de saúde pública. Rio de Janeiro, 2007. Disponível em:<<http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos>>. Acesso em: 21 Out 2015.

JAFARNEJAD, S. M.; LI, G. Regulation of p53 by ING family members in suppression of tumor initiation and progression. *Cancer and Metastasis Reviews*, p. 1-19, 2011.

JEMAL, A.; CENTER, M. M.; DESANTIS, C.; WARD, E. M. Global Patterns of cancer Incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, v. 19, p. 1893-1907, 2010.

JEONG, S. Y.; SEOL, D. W. The role of mitochondria in apoptosis. *BMB Reports*, v. 41, n. 1, p. 11-22, 2008.

JIANYONG, L.; ZHIJUN, X.; MENGYAO, T.; WEIKE, S.; XING-GUO, G. 3-(4-(Benzo[d]thiazol-2-yl)-1-phenyl-1H-pyrazol-3-yl) phenyl acetate induced Hep G2 cell apoptosis through a ROS mediated pathway. *Chemical Biology, Interactions*, v. 183, p. 341-348, 2010.

JOHNSON, A.; SKOTHEIN, J. M. Startand the restriction point. *Journal Current Opinion in Cell Biology*, v. 25, n. 6, p. 717-723, 2013.

KAMAL, A.; REDDY, K.S.; KHAN, M.N.A.; SHETTI, R.V.C.R.N.C.; RAMAIAH, M.J.; PUSHPAVALLI, S.N.C.V.L.; SRINIVAS, C.; PAL-BHADRA, M.; CHOURASIA, M.; SASTRY, G.N.; JUVEKAR, A.; ZINGDE, S.; BARKUME, M. Synthesis, DNA-binding ability and anticancer activity of Benzothiazole/benzoxazole-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine conjugates. *Bioorg. Med. Chem*, v. 18, p. 4747-4761, 2010.

KREUZALER, P.; WATSON, C. J. Killing a cancer: what are the alternatives? *Nature Reviews Cancer*, v. 12, p. 411-424, 2012.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; NOMENCLATURE COMMITTEE ON CELL DEATH 2009 et al. Classification of cell death: recommendations of the nomenclature e committee on cell death 2009. *Cell Death & Differentiation*, v. 6, n. 1, p. 3-11, 2009.

KUPADHYAY. P; MISHRA. P. Design, synthesis and antifungal evaluation of novel substituted 1, 3, 4-oxadiazoles, and 1, 3, 4-thiadiazoles. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 7, n. 9, p. 466-470, 2015.

LACERDA, A. S. **Caracterização do potencial anticancer do composto A398, um derivado inédito da podofilotoxina.** (Tese) Universidade Federal da Paraíba, UFPB, 2012.

LAFAYETTE, E. A.; ALMEIDA, S. M. V.; PITTA, M. G. R.; BELTRÃO, E. I. C.; SILVA, T. G.; MOURA, R. O.; PITTA, I. R.; JÚNIOR CARVALHO, L. B.; LIMA, M. C. A. Synthesis: DNA binding and topoisomerase I inhibition activity of thiazacridine and imidazacridine derivatives, *Molecules*, n. 18, p. 15035-15050, 2013.

LASKOWSKI, R. A.; SWINDELLS, M. B. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drugs discovery. *Journal of Chemical Information and Modeling*, n. 51, p. 2778-2786, 2011.

LEI, H.; WANGA, X.; WU, C. Early stage intercalation of doxorubicin to DNA fragments observed in molecular dynamics binding simulations. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, v. 38, p. 279-289, 2012.

LEITE, F. M. C; BUBACH, S; AMORIM, M. H. C.; CASTRO, D. S; PRIMO, C. C. Mulheres com diagnóstico de câncer de mama em tratamento com tamoxifeno: Perfil sociodemográfico e clínico. *Revista Brasileira de Cancerologia*, n. 57, v. 1, p. 15-21, 2011.

LIESEN, A. P.; AQUINO, T. M.; CARVALHO, C. S.; LIMA, V. T.; ARAÚJO, J. M.; LIMA, J. G.; FARIA, A. R.; MELO, E. J. T.; ALVES, A. J.; ALVES, E. W.; ALVES, A. Q.; GÓES, A. J. S. Synthesis and evaluation of anti-Toxoplasma gondii and antimicrobial activities of thiosemicarbazides, 4-thiazolidinones and 1,3,4-thiadiazoles. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, p. 3685-3691, 2010.

LIU, M. Y.; XIĀO, L.; DONG, Y.; LIU, Y.; CAI, L.; XIONG, W.; YAO, Y.; YIN, M.; LIU, Q. Characterization of the anticancer effects of S115, a novel heteroaromatic thiosemicarbazone compound, in vitro and in vivo. *Acta Phamacologica Sinica*, v. 35, p. 1302-1310, 2014.

LUO, J.; SOLIMINI, N.L.; ELLEDGE, S.J. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell*, v. 6, p. 823-837, 2009.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer*, v. 9, p. 153-166, 2009.

MEDINA, E. M.; TURNER, J. J.; GORDAN, R et al. Punctuated evolution and transitional hybrid network in na ancestral cell cyle off ungi, *eLife*, v. 5, 2016.

MENDES, H. M. F.; FALEIROS, R. R.; VASCONCELOS, A. C.; ALVES, G. E. S.; MOORE, R. M. Apoptose no cólon menor eqüino submetido à isquemia e reperfusão experimentais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 29, n. 3, p. 198-204, 2009.

MENDONÇA JUNIOR F. J. B; NETO-LIMA, R. G.; OLIVEIRA, T. B.; LIMA, M, C. A.; PITTA, I, R.; GALDINO, S. L.; CRUZ, R. M. D.; ARAÚJO, R. S. A.; NEVES, R. P. Synthesis and evaluation of the antifungal activity of 2-(substituted-amino)-4,5-dialkyl-thiophene-3-carbonitrile derivatives. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 30, p. 1492-1499, 2011.

MORAES, A. C. R.; LICÍNIO, M. A.; PAGNUSSAT, L.; MORAL, J. A. G. D.; SILVA, M.C. S. Síndromes mielodisplásicas: Aspectos moleculares, laboratoriais e a classificação OMS 2008. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 31, n. 6, p. 463-470, 2009.

MOURA J. A, VALDUGA C. J, TAVARES E. R, KRETZER I. F, MARIA D.A, MARANHÃO R. C. Novel formulation of a methotrexate derivative with a lipid nanoemulsion. *International Journal Nanomedicine*, n. 6, p.2285-2295, 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOORTHY, N. S. H. N.; CERQUEIRA, N. M. F. S. A.; RAMOS, M. J.; FERNANDES, P. A. Aryl- and Heteroaryl-thiosemicarbazone derivatives and their metal complexes: a pharmacological template. *Recent Patents on Anti-cancer Drug Discovery*, v. 8, p. 1-15, 2013.

NIKOLETOPOULOU, V.; MARKAKI, M.; PALIKARAS, K.; TAVERNARAKIS, N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica Biophysica Acta*, v. 1833, n. 12, p. 3448-3459, 2013.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from1981 to 2010. *Journal Natural Products*, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

NUNES, P. R. *Estudo da atividade citotóxica, genotóxica e apoptótica de novos complexos de ouro (III) de fluorquinolonas frente às células B16-F10, K562 e A20.* (Dissertação). Faculdade de Farmácia Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the alamaar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, v. 267, p. 5421-5426, 2000.

OCTAVIA Y, TOCCHETTI C.G, GABRIELSON K.L, JANSSENS S, CRIJNS H.J, MOENS A.L. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v. 52, v. 6, p. 1213-1225, 2012.

OLIVEIRA, J. F.; SILVA, A. L.; VENDRAMINI-COSTA, D. B.; AMORIM, C. A. C.; CAMPOS, J. F.; RIBEIRO, A. G.; MOURA, R. O.; NEVES, J. L.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E. C. Synthesis of thiophene-thiosemicarbazone derivates and evalution of their *in vitro* and *in vivo* antitumor activities. *European Journal of Medicine Chemistry*, v. 104, p. 148-156, 2015.

PASTERNAK, J. J. *Genética molecular humana*. Manole, ed. 1, p. 512, 2002.

PAULA, F. R.; SERRANO, S. H. P.; TAVARES, L. C. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. *Química Nova*, v. 32, n. 4, p. 1013-1020, 2009.

PETTIT, R. K.; WEBER, C. A.; KEAN, M. J.; HOFFMANN, H.; PETTIT, G. R.; TAN, R.; FRANKS, K. S.; HORTON, M. L. Microplate alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 49, n. 7, p. 2612-2617, 2005.

PESSOTO, F. S.; YOKOMIZO, C. H.; PIETRO, T.; FERNANDES, C.S.; SILVA, A. P.; KAISER, C. R.; BASSO, E. A.; NANTES, I. L. Thiosemicarbazone p-substituted acetophenone derivates promote the loss of mitochondrial $\Delta\psi m$, GSH depletion, and death in K562. *Journal Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2015, p. 1-15, 2015.

PITOT, H. C. Pathway of progression in hepatocarcinogenesis. *Lancet*, v. 358, p. 859-860, 2011.

POMMIER, Y. Drugging topoisomerase: Lessons and challenges. *ACS Chemical Biology*, v. 8, p. 82-95, 2013.

POMMIER, Y. DNA topoisomerase I inhibitors: Chemistry, biology and interfacial inhibition. *Chemical Biology*, v. 109, p. 2894-2902, 2009.

POPOVIC-BIJELIC, A.; KOWOL, C. R.; LIND, M. E.S.; LUO, J.; HIMO, F.; ENYEDY, E.A et al. Ribonucleotide reductase inhibition by metal complexes of triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone): a combined experimental and theoretical study. *Journal Inorganic Chemistry*, n. 104, p. 1422-1431, 2011.

RIBEIRO, R.; SOUZA, D. W. N.; OLIVEIRA, T. S.; FERNANDES, K. P. S.; JUNIOR, J. A. S. Atividade física intensa: papel do óxido nítrico na apoptose. *Terapia Manual*, v.10, n. 48, p. 1-5, 2012.

RODRIGUES, J.; CHARRIS, J.; CAMACHO, J.; BARAZARTE, A.; GAMBOA, N.; NITZSCHE, B.; HOPFNER, M.; LEIN, M.; JUNG, K.; ABRAMJUK, C. N-Formyl-2-(5-nitrothiophen-2-yl)benzothiazole-6-carbohydrazide as a potential anti-tumour agent forprostate cancer in experimental studies. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 65, p. 411-422, 2012.

ROLÓN, M.; VEGA, C.; ESCARIO, J. A.; GÓMEZ-BARRIO, A. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanossoma cruzi* epimastigotes. *Parasitology Research*, v. 99, n. 2, p. 103-107, 2006.

RUMJANEK, V.M.; VIDAL, R. S.; MAIA, R. C. Multidrug resistance in chronic myeloid leukaemia: how much can we learn from MDR-CML cell lines? *Bioscience Reports*, v. 33, n. 6, p. 875-878, 2013.

- SAK, K. Chemotherapy and dietary phytochemical agents. *Chemotherapy Research and Practice*, v. 2012, p. 1-11, 2012.
- SARETZKI, G. Cellular senescence in the development and treatment of cancer. *Current Pharmaceutical Design*, v. 16, p. 79-100, 2010.
- SAHA, S.; WALIA, S.; KUNDU, A.; KUMAR, B.; JOSHI, D. Antifungal acetylinic thiophenes from Tagetes minuta: potential biopesticide. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, v. 85, p. 207-211, 2012.
- SANKARI, S. L.; MASTHAN, K. M.; BABU, N. A.; BHATTACHARJEE, T.; ELUMALAI, M. Apoptosis in cancer - an update. *Asian Pacifique Journal of Cancer Prevention*, v. 13, n. 10, p. 4873-4878, 2012.
- SANTOS, T. R. M. Avaliação da atividade antitumoral de compostos n-fenil-piperazínicos em linhagem tumoral K562. (Dissertação). Universidade Federal de Goiás, UFG, 2016.
- SARNIGUET, C.; TOLOZA, J.; CIPRIANI, M.; LAPIER, M.; VIEITES, M.; TOLEDANO-MAGANA, Y.; GARCÍA-RAMOS, J.C.; RUIZ-AZUARA, L.; MORENO, V.; MAYA, J.D.; AZAR, C.O.; GAMBINO, D.; OTERO, L. Walter-soluble ruthenium complexes bearing acitivity against protozoan parasites. *Biological Trace Element Research*, v. 159, p. 372-394, 2014.
- SILVA, A. P.; MARTINI, M. V.; OLIVEIRA, C. M. A.; CUNHA, S.; CARVALHO, J. E.; RUIZ, A. L. T. G.; SILVA, C.C. Antitumor activity of (-)-a-bisabolol-based thiosemicarbazones against human tumor cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, p. 2987-2993, 2010.
- SCHMITT, S. M.; FREZZA, M.; DOU, Q. P. New applications of old metal-binding drugs in the treatment of human cancer. *Frontiers in Bioscience*, v. 4, p. 375-391, 2013.
- SHIRAHAMA, H.; YAMAMOTO, K.; NAMBA, M. Human hepatocyte carcinogenesis (review). *International journal of oncology*, v. 42, n. 4, p. 1133-1138, 2013.
- SCHORR, M. C; PEDRINI, J. L; RAGINATTO, A. G. Uma nova terapêutica para o câncer de mama: a evolução do tratamento sistêmico neoadjuvante. *Revista Brasileira de Mastologia*, n. 25, v. 1, p, 20-25, 2015.
- SINGH, R.; GEORGE, J.; SHUKLA, Y. Role of senescence and mitotic catastrophe in cancer thrapy. *Cell Division*, v. 5, n. 4, p. 1-12, 2010.
- SIVADAS, A; SUBBARAYA, N. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of Novel thiophene acrylate derivatives. *International Journal of Pharmaceutical Scineces and Research*, vol. 2, n.4, p. 1007-1014, 2011.
- SRIVASTAVA. S; DAS. B. Synthesis and evaluation of some novel thiophenes as potential antibacterial and mycolytic Agents. *Der Pharma Chemica*, v. 3, n. 6, p. 103-111, 2011.

SOUZA, B. C. C.; OLIVEIRA, T. B.; AQUINO, T. M.; LIMA, M. C. A.; PITTA, I. R.; GALDINO, S. L.; LIMA, E. O.; SILVA, T. G.; MILITÃO, G. C. G.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; MENDONÇA JÚNIOR, F. J. B. Preliminary antifungal and cytotoxic evaluation of synthetic cycloalkyl[b]thiophene derivatives with PLS-DA analysis. *Acta Pharmaceutica*, v. 62, p. 221-236, 2012.

SOARES, M. A.; LESSA, J. A.; MENDES, I. C.; SILVA, J. G.; SANTOS, R. G.; SALUM, L. B.; DAGHESTANI, H.; ANDRICOPULO, A. D.; DAY, B. W.; VOGT, A.; PESQUERO, J. L.; ROCHA, W. R.; BERALDO, H. N4-Phenyl-substituted 2-acetylpyridine thiosemicarbazones: Cytotoxicity against human tumor cells, structure–activity relationship studies and investigation on the mechanism of action. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 20, p.3396–3409, 2012.

SOUZA, M. A.; JOHANN, S.; ALVES, L.; LIMA, R. S.; CAMPOS, F. F.; MENDES, I. C.; BERALDO, H.; SOUZA-FAGUNDES, E. M.; CISALPINO, P. S.; ROSA, C. A.; ALVES, T. M. A.; SÁ, N. P.; ZANI, C. L. The antimicrobial activity of lapachol and its thiosemicarbazone and semicarbazone derivatives. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, n. 3, p. 342-351, 2013.

TENÓRIO, R. P.; GÓES, J. S. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicação sintética e importância biológica. *Química Nova*, v. 28, n. 6, p. 1030-1037, 2005. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.

UGHACHUKWU, P. O & UNEKWE P.C Eflux pump-mediated resistance in chemotherapy. *Annals of medical and health sciences research*, v. 2, p. 191-198, 2012.

URRUTICOECHEA, A.; ALEMANY, R.; BALART, J.; VILLANUEVA, A.; VIÑALS, F.; CAPELLÁ, G.; Recent advances in cancer therapy: an overview. *Current Pharmaceutical Design*, v. 16, n. 1, p. 3-10, 2010.

VENKATARAMIREDDY, V.; SHANKARAIAH, M.; TEJESWARA RAO, A.; KALYANI, Ch.; LAKSHMI, M.N.; VARALA, R.; JAYASHREE, A. Sythesis and anti-cancer activity of novel 3-aryl thiophene-2-carbaldehydes and their aryl/heteroaryl chalcone derivates. *Rasayan Journal of Chemistry*, v. 9, n, 1, p. 31-39, 2016.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation*, v. 36, n. 3, p. 131-149, 2003.

WINCK, A. T. 3D-Tri: um algoritmo de árvore de regressão para propriedades tridimensionais - um estudo sobre dados de docagem molecular considerando a flexibilidade do receptor. (Tese), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, 2012.

WORLD HEATH ORGANIZATION (WHO). World health statistics 2010. Disponível em:http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2012/en. Acesso em: 25 Out 2015.

WORLD HEATH ORGANIZATION (WHO). World health statistics 2008. Disponível em:<<http://www.who.int/whosis/whostat/2008/en/>>. Acesso em: 25 Out 2015.

WOOD, G. S.; WU J. Methotrexate and pralatrexate. *Clinics in Dermatology*, v. 33, n. 4, p. 747-755, 2015.

WONG, R. S.; Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, v. 30, p. 87-101, 2011.

YANG, S.X.; LOO, W.T.; CHOW, L.W.; YANG, X.H.; ZHAN, Y.; FAN, L.J.; ZHANG, F.; CHEN, L.; WANG, G.L.; XIAO, H.L.; WU, J.L.; BIAN, XW.; JIANG, J. Decreasead expression of C-erB-2 and CXCR4 in breast cancer after primary chemotherapy. *Journal of Translation Medicine*, v. 10, 2012.

YOSHIDA, K.; MIKI, Y. The cell death machinery governed by the p53 tumor suppressor in response to DNA damage. *Cancer Science*. v.101, n. 4, p. 831-835, 2010.

YU, Y.; KALINOWSKI, D. S.; KOVACEVICT, A.; SIAFAKAST, A. R.; JANSSONT, P. J.; STEFANI, C.; LOVEJOY. D. B.; SHARPES, P. S.; BERNHARDT, P. V.; RICHARDSON, D. R. Thiosemicarbazones from the old to new: iron chelators that are more than just ribonucleotide reductase inhibitors. *Journal of Medicine Chemistry*, v. 52, n. 17, p. 5271-5294, 2009.

YUAN, J., LOVEJOY, D. B. & RICHARDSON, D.R. Novel di-2-pyridyl-derived iron chelators with marked and selective antitumor activity: in vitro and in vivo assessment. *Blood*, v. 104, p. 1450-1458, 2004.

YU, Y.; RAHMANTO, Y.S.; CLARE L.H.; RICHARDSON, D.R. The Potent and NovelThiosemicarbazone chelators, Dp44mT and Bp44mT, Affect Crucial Thiol Systems Required for Ribonucleotide Reductase Activity. *Molecular pharmacology*, v. 79, n. 6, p. 921-931, 2011.