

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DE DERIVADOS
QUÍMICOS DE FTALIMIDAS GLICOCONJUGADAS.**

JOSÉ GUEDES DA SILVA JÚNIOR

ORIENTADOR(a): Prof^a. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima

CO-ORIENTADORA: Prof^a. Dra. Shalom Pôrto de Oliveira Assis

Recife

2015

JOSÉ GUEDES DA SILVA JÚNIOR

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DE DERIVADOS
QUÍMICOS DE FTALIMIDAS GLICOCONJUGADAS.**

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para a obtenção do título de Mestre
em Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de
Pernambuco

Recife

2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva Júnior, José Guedes da

Estudo do potencial antitumoral de derivados químicos de ftalimidas glicoconjugadas. / José Guedes da Silva Júnior- Recife: O Autor, 2015.

75 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Vera Lúcia de Menezes Lima

Coorientadora: Shalom Pôrto de Oliveira Assis

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Bioquímica e Fisiologia, 2015.

Inclui referências

1. Agentes antineoplásicos 2. Imidas 3. Câncer I. Lima, Vera Lúcia de Menezes (orient.) II. Assis, Shalom Pôrto de Oliveira (coorient.) III. Título

615.58

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017- 446

JOSÉ GUEDES DA SILVA JÚNIOR

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DE DERIVADOS
QUÍMICOS DE FTALIMIDAS GLICOCONJUGADAS**

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para a obtenção do título de Mestre
em Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de
Pernambuco

Aprovada em: 09/02/2015

Profª Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima- Presidente (UFPE)

Profª Dra. Shalom Pôrto de Oliveira Assis (UNICAP)

Profª Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho (UFPE)

Prof. Dr Emerson Petter Falcão (UFPE)

A toda a minha família. A minha querida mãe por todo o amor, ao meu pai e minhas irmãs e sobrinha amada e ao grande amor da minha vida Talyta Valéria.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo bem mais preciso que ele me deu: minha vida;

Agradeço imensamente a Professora Vera Menezes, minha querida orientadora, que me recebeu em seu laboratório e acreditou em meu trabalho. Obrigado por ser para mim um exemplo de pesquisador, mas principalmente de humanidade e de pessoa honrada. Agradeço por todas as oportunidades, por todas as oportunidades, os conselhos e os abraços, levarei todos durante a minha vida;

Não poderia deixar de agradecer a esta mulher que foi fundamental em toda a minha jornada nestes últimos dois anos de mestrado. Com seu apoio, amor e companheirismo, Talyta sempre foi um porto seguro para mim e uma grande parceira nesta caminhada, por isso quero agradecê-la por sempre estar ao meu lado e por todo o trabalho realizado. Seguiremos juntos sempre, sejam quais forem os próximos passos e desafios;

A minha família que mesmo distante sempre se faz presente em meu coração. Agradeço a minha mãe, Lucimar Guedes, por cada passo dado, por cada lágrima e luta travada por mim. Ao meu Pai José Guedes pelo carinho e por me ajudar a sempre trilhar pelos melhores caminhos da vida. As minhas amadas irmãs Jéssica Guedes e Maria Juliana por alegrarem a minha vida e pela força diária, amo vocês. A Maria Carolina, minha amada sobrinha que torna nossas vidas mais felizes a cada dia e recarrega as nossas energias. Agradeço a Elizabete e Dona Izabel por todo carinho dedicado a mim;

A Professora Dra Shalom Pôrto por todo o apoio e encorajamento nos trabalhos de síntese e em todo apoio durante esses dois anos. Agradeço também a Moara Targino pela força e paciência, ajuda fundamental no desenvolvimento das atividades de síntese, o meu muito obrigado, a minha eterna gratidão;

Ao Professor Dr Ronaldo Nascimento que me recebeu em seu laboratório me dando todas as oportunidades. A minha eterna gratidão;

Aos queridos professores do Departamento de Bioquímica pelos conhecimentos compartilhados durante esses dois anos;

Aos meus queridos amigos e companheiros de laboratório: Weber, Tiago, Thaise, Janaína, Biana, Hassan, Pâmela, João, Albérico, Profª Vera Cristina, Ana Paula, Irailton, Douglas, Ilton, Adenor, Myza, Tatiana e ao meu amigo Caíque, que me ensinou muitas coisas, o meu muito obrigado;

Ao nosso querido secretário Djalma, pela presteza, colaboração, disponibilidade e amizade, muito obrigado;

A seu João, grande amigo, sempre com conselhos amigos e disposição para ajudar;

Aos melhores amigos: Ingrid, Romão, Larissa, Alex, Cigu e Ancy. Todo mundo deveria ter amigos iguais a vocês.

Ao meu avô Joaquim Guedes Crizant (*in memoriam*) que me ensinou que a simplicidade é o comportamento de quem começa a ser sábio.

Agradeço a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia-FACEPE pelo apoio financeiro durante o período do mestrado.

A todos que contribuíram direto ou indiretamente nessa minha jornada o meu mais sincero abraço de agradecimento, que Deus dê em dobro o que vocês me deram.

“Até parece que foi ontem minha mocidade, com diploma de sofrer de outra Universidade, minha fala nordestina, quero esquecer o francês... e vou viver as coisas novas que também são boas, o amor, humor das praças cheias de pessoas, agora eu quero tudo, tudo outra vez...”

Belchior

“Se choro, quando choro, e minha lágrima cai, é pra regar o capim que alimenta a vida, chorando eu refaço as nascentes que você secou. Se desejo, o meu desejo faz subir marés de sal e sortilégio. Vivo de cara pra o vento, na chuva, e quero me molhar. O terço de Fátima e o cordão de Gandhi, cruzam o meu peito. Sou como a haste fina, que qualquer brisa verga, mas nenhuma espada corta.”

Maria Bethânia

Resumo

Segundo a Organização Mundial de Saúde as neoplasias estão entre as doenças com maior índice de mortalidade, acometendo aproximadamente 17 milhões de pessoas em todo o mundo. Desta maneira, a pesquisa de novos compostos contra o câncer é fundamental, para que novos medicamentos antineoplásicos com maior eficácia e mais segurança sejam desenvolvidos. Nesse contexto, esse projeto propôs a síntese e avaliação antitumoral de ftalimidas glicoconjugadas sobre tumores sólidos experimentais em camundongos albinos suíços machos. A síntese química das ftalimidas glicoconjugadas com triazóis (1A, 1B e 1C) foi obtida através da reação de cicloadição 1,3-dipolar. A citotoxicidade *in vitro* foi realizada em linhagens de células MCF-7, HL 60 e NCL H292 utilizando o método colorimétrico de MTT (3- [4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) de acordo com o protocolo do *National Cancer Institute (NCI)*. A atividade anti-tumoral *in vivo* foi avaliada em 5 grupos de camundongos: controle negativo que recebeu Carboximetilcelulose 1%, grupo controle positivo 5-Fluoruracil e os grupos tratados com as ftalimidas 1A, 1B e 1C durante sete dias. A dose utilizada foi de 20mg/kg/dia e os animais tiveram acesso livre a água e alimentação. No oitavo dia os animais foram sacrificados e obtidas amostras de sangue para análise do hemograma e os tumores para avaliação histológica. As avaliações foram feitas frente ao Carcinoma de Ehrlich e ao Sarcoma 180. A avaliação da inibição tumoral (TWI%) foi realizada através do cálculo: $TWI = C - T / C \times 100$, onde C: é a medida do peso dos tumores do grupo controle negativo e T: é a média dos pesos dos tumores dos animais tratados. Foi realizado o ensaio antiinflamatório por peritonite também na dose 20mg/Kg e o Ácido Acetilsalicílico como controle positivo. Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, com um intervalo de confiança de 95%, as diferenças estatísticas foram acessados por ANOVA. Os resultados obtidos na citotoxicidade *In vitro* demonstraram que compostos sintetizados apresentaram baixa percentagem de inibição do crescimento das células NCIH 292, HL60 e MCF-7 (>20). Já na atividade antitumoral *In vivo* com o tumor Ehrlich os animais tratados com o composto 1A tiveram uma inibição de 63,8% do tumor, enquanto os tratados com o composto 1B tiveram 62,8% de inibição tumoral e com o composto 1C 62%. O grupo controle positivo tratado com 5-Fluorouracil apresentou inibição de 76,6%. Frente ao Sarcoma 180 o composto 1A inibiu em 70,6% o crescimento tumoral, o composto 1B em 62,% e o composto 1C 64,3%, já o grupo tratado com o 5-Fluoracil inibiu o crescimento do tumor em 76,8%. Não foram encontradas alterações hematológicas em nenhum dos grupos experimentais. Os compostos 1A, 1B e 1C mostraram-se também capazes de reduzir o número de leucócitos do líquido peritoneal formado na cavidade dos animais, apresentando boa atividade Anti-inflamatória. Os resultados obtidos demonstraram boa atividade antitumoral das ftalimidas glicoconjugadas frente ao Carcinoma de Ehrlich e ao Sarcoma 180 *In vivo*, além de excelente atividade Anti-inflamatória, colocando esses compostos como grupos farmacofóricos promissores para tratamento do câncer.

Palavras Chaves: Ftalimidas. Glicoconjugados. Atividade antitumoral. Atividade Anti-inflamatória.

Abstract

Cancer is a group of diseases characterized by loss of control of cell differentiation and proliferation. According to the World Health Organization (WHO) neoplasms are among the diseases with the highest mortality rate, affecting approximately 17 million people worldwide. Thus, the search for new compounds against cancer is critical for developing new anticancer drugs with greater efficacy and safety. In this context, this project proposes the synthesis and antitumor evaluation of phthalimides glycoconjugate on experimental solid tumors in Swiss albino male mice. Chemical synthesis of glycoconjugate with triazoles phthalimides (1A, 1B, and 1C) was obtained by 1,3-dipolar cycloaddition reaction. The *in vitro* cytotoxicity evaluation was performed on MCF-7, HL60 and NCL H292 cell lines by colorimetric method using the MTT (3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium), according to the protocol of the National Cancer Institute (NCI). The *in vivo* anti-tumor activity was assessed in 5 groups of mice, each with eight animals: a negative control group that received carboxymethylcellulose 1%, a positive control group treated with 5-fluorouracil and the other groups treated with the phthalimides 1A, 1B and 1C, for seven days. The dose was 20 mg/kg/day and the animals had free access to food and water. On the eighth day the animals were sacrificed and blood samples collected for complete blood count and examination of the tumors for histological evaluation. The evaluations were made against Ehrlich carcinoma and sarcoma 180. Assessment of tumor inhibition (TWI%) was performed by calculating: $TWI = TC / CX100$, where C: is the measure of the weight of tumors of the negative control group and T: is the average weight of the tumors of treated animals. It was conducted the anti-inflammatory peritonitis assay also at 20 mg/kg using acetylsalicylic acid as positive control. Values were expressed as mean $\pm$ standard deviation, with a 95% confidence interval, and the statistical differences were assessed by ANOVA. Results from the *in vitro* cytotoxicity showed that the synthesized compounds showed a low percentage of growth inhibition of cells NCIH 292, HL-60 and MCF-7 (> 20). While *in vivo* antitumor activity with Ehrlich tumor, animals treated with compound 1A had a 63.8% inhibition of tumor, ones treated with the compound 1B had 62.8% tumor inhibition and compound 1C had 62%. The positive control group treated with 5-fluorouracil showed 76.6% inhibition. Front Sarcoma 180, the 1A compound inhibited in 70.6% tumor growth, compound 1B in 62% and compound 1C in 64.3%, whereas the group treated with 5-Fluoracil inhibited tumor growth by 76.8%. No hematological changes were found in any of the experimental groups. Compounds 1A, 1B and 1C also show up able to reduce the number of leukocytes in the peritoneal fluid formed in the cavity of the animals, demonstrating good anti-inflammatory activity. The results showed good antitumor activity of phthalimides glycoconjugate against Ehrlich carcinoma and sarcoma 180 *in vivo* as well as excellent anti-inflammatory activity, placing these compounds as promising pharmacophore groups for cancer treatment.

Key Words: Phthalimides. Glycoconjugates. antitumor activity. anti-inflammatory activity.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma (numeros arredondados para 10 ou múltiplos de 10).

Figura 2: Características das células tumorais.

Figura 3: Demonstração do crescimento e vascularização do tumor sólido através do sistema VEGF. Sistema VEGF, um alvo multiterapêutico.

Figura 4: Processos de desenvolvimento da carcinogênese.

Figura 5: Impacto da incorporação de novas drogas na sobrevida do câncer de mama metastático.

Figura 6: Mecanismo de ação do 5-FU.

Figura 7: Mecanismo de relação entre o câncer e processo inflamatório por meio do metabolismo do ácido araquidônico.

Figura 8: Síntese de Ftalimidas com Aminas.

Figura 9: Síntese de Ftalimidas por meio de microondas

Figura 10: Ftalimida com grupamento Fenil na sua estrutura química.

Figura 11: Estrutura química da Talidomida.

Figura 12: Talidomida e seus derivados: Polalidomida e Lenalidomida.

Figura 13: Estrutura química dos Triazóis e da Ribavarina.

Figura 14: Estrutura química da Vancomicina

Figura 15: Estrutura da Ciclamicina

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1: Estimativa Estimativas para o ano de 2014 das taxas brutas de incidência por 100 habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária (numeros arredondados para 10 ou multiplos de 10).

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO

Figura 1: Estrutura química dos glicoconjugados de ftalimidas (1A, 1B e 1C).

Figura 2: Citotoxicidade celular dos glicoconjugados de ftalimida (1A, 1B e 1C) frente as linhagens de células cancerigenas NCIH 292, HL-60 e MCF-7 na concentração 25µg/mL. Os dados representam a média $\pm$ o desvio padrão. As diferenças estatísticas do controle foram determinadas por one-way ANOVA seguido de teste de Tukey, *P<0,05 para os grupos em comparação com a Doxorubicina.

Figura 3: Citotoxicidade celular dos glicoconjugados de ftalimida (1A, 1B e 1C) frente as linhagens de células cancerigenas NCIH 292, HL-60 e MCF-7 na concentração 50µg/mL. Os dados representam a média $\pm$ o desvio padrão. As diferenças estatísticas do controle foram determinadas por one-way ANOVA seguido de teste de Tukey, *P<0,05 para os grupos em comparação com a Doxorubicina.

Figura 4: Média do Peso dos animais com carcinoma de Ehrlich, antes e após 7 dias de tratamento. Os dados representam a média $\pm$ o desvio padrão. As diferenças estatísticas do controle foram determinadas por one-way ANOVA seguido de teste de Tukey, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos.

Figura 5: Média do Peso dos animais com Sarcoma 180 antes e após 7 dias de tratamento. Os dados representam a média $\pm$ o desvio padrão. As diferenças estatísticas do controle foram determinadas por one-way ANOVA seguido de teste de Tukey, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos.

Figura 6: Peso dos tumores (carcinoma de Ehrlich) dos grupos tratados com os compostos 1A, 1B e 1C (20mg/Kg). Os dados representam a média $\pm$ o desvio padrão. As diferenças estatísticas do controle foram determinadas por one-way ANOVA seguido de teste de Tukey, *P<0,05 para os grupos em comparação com CMC 1%.

Figura 7: Peso dos tumores (Sarcoma 180) dos grupos tratados com os compostos 1A, 1B e 1C (20mg/Kg). Os dados representam a média $\pm$ o desvio padrão. As diferenças estatísticas do controle foram determinadas por one-way ANOVA seguido de teste de Tukey, *P<0,05 para os grupos em comparação com CMC 1%.

Figura 8: Avaliação da inibição tumoral do Carcinoma de Ehrlich e do Sarcoma 180 a partir do tratamento com 5-FU e os glicoconjugados de ftalimida (1A, 1B e 1C). O controle (CMC 1%) está normatizado para 100%. Os dados representam a média $\pm$ o desvio padrão. As diferenças estatísticas do controle foram determinadas por one-way ANOVA seguido de teste de Tukey, $*P<0,05$ para os grupos em comparação 5-FU.

Figura 9: Avaliação da atividade Anti-inflamatória dos composto 1A, 1B e 1C sobre a migração leucocitária induzida pela peritonite aguda tendo como agente flogístico a carragenina. $*P<0,05$; As diferenças estatísticas do controle foram determinadas por one-way ANOVA seguido de teste de Tukey, $*P<0,05$ para os grupos em comparação com CMC 1%.

Figura 10: Fotomicrografia de camundongos com Carcinoma de Ehrlich tratados com CMC 1% e 5-FU. A) Células pleomórficas; Presença de necrose coagulativa. B) Célula exibindo atipia celular; Infiltração de tecido adiposo. HE 400x.

Figura 11: Fotomicrografia de camundongos com Carcinoma de Ehrlich tratados com 1A, 1B e 1C. A) Células com núcleo pgnótico com características de apoptose. B) Células leucocitárias; Infiltração de tecido adiposo; Vaso sanguíneo em provável retração. C) Vaso sanguíneo; Células pleomórficas; Pouca infiltração leucocitária. HE 400x.

Figura 12: Fotomicrografia de camundongos com Sarcoma180 tratados com CMC 1% e 5-FU. A) Vasos sanguíneos proeminentes; Intenso infiltrado leucocitário. B) Atipia celular; Infiltração de tecido adiposo. HE 400x.

Figura 13: Figura 10: Fotomicrografia de camundongos com Sarcoma 180 tratados com 1A, 1B e 1C. A) Presença de leucócitos; Vasos Sanguíneos; Células pleomórficas. B) Células em picnose em provável processo de apoptose. C) Presença de anisocariose (acentuada diferença entre os tamanhos dos núcleos); Infiltração de tecido muscular. HE 400.

LISTA DE TABELAS ARTIGO

Tabela 1: Determinação da DL₅₀ dos compostos (1A, 1B e 1C).

Tabela 2: Peso dos órgãos dos camundongos submetidos ao carcinoma de Ehrlich tratados com os compostos 1A, 1B e 1C, 5-FU e o controle negativo CMC1%. Os dados representam a média e desvio padrão. As diferenças estatísticas do controle foram determinadas por one-way ANOVA seguido de teste de Tukey, $*P<0,05$ para os grupos em comparação com o grupo controle CMC 1%.

Tabela 3: Peso dos órgãos dos camundongos submetidos ao Sarcoma 180 tratados com os compostos 1A, 1B e 1C, 5-FU e o controle negativo CMC1%. Os dados representam a média e desvio padrão. As diferenças estatísticas do controle foram determinadas por one-way ANOVA seguido de teste de Tukey, $*P<0,05$ para os grupos em comparação com o grupo controle CMC 1%.

LISTA DE ABREVIATURAS

MTT: (3- [4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

CMC 1%: Carboximetilcelulose 1%.

DMF: Dimetilformina

CCD: cromatografia de camada delgada

PBS: Tampão Fosfato Salino

DMSO: Dimetilsufóxido

NCI: National Câncer Institute

D.P: Desvio Padrão

S.C: Subcutânea

TWI: Inibição tumoral

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Aspectos gerais sobre o Câncer	14
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 Epidemiologia do Câncer	16
2.2 Características básicas das células tumorais.....	18
2.3 Fases do desenvolvimento neoplásico.....	20
2.4 Quimioterapia e mecanismos de ação de fármacos antineoplásicos	21
2.5 Modelos Experimentais de Câncer.....	24
2.5.1 Carcinoma de Ehrlich	24
2.5.2 Sarcoma 180	25
2.6 Câncer e o Processo Inflamatório.....	26
2.7 Desenvolvimento de novos fármacos.....	27
2.8 Ftalimidas	28
2.8.1 Aspectos Químicos	28
2.8.2 Aspectos Biológicos das Ftalimidas	30
2.9 Triazóis e Glicoconjugados	32
2.9.1 Triazóis	32
2.9.2 Glicoconjugados	34
3. OBJETIVOS.....	35
3.1 Objetivo Geral.....	35
3.2 Objetivos Específicos	35
5 REFERÊNCIAS.....	36
6 ARTIGO.....	43

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais sobre o Câncer

O câncer é um conjunto de mais de cem doenças em curso, que tem em comum a perda do controle do crescimento, autossuficiência na sinalização de crescimento e da diferenciação celular, ocasionando uma elevada expansão clonal que acabam invadindo os mais diversos órgãos e tecidos (Lemmon; Schlessinger, 2010; Witsch et al., 2010; Hynes; Macdonald, 2009). O termo câncer provavelmente é originário do Latim “*Karkinus*” que quer dizer “Carangueijo”, devido ao câncer se “agarrar de maneira muito firme a uma parte do organismo” (Brasil, 2014).

No desenvolvimento das neoplasias há uma sinalização proliferativa continua, supressão dos inibidores do crescimento, permitindo assim a imortalidade celular, além da indução da angiogenese para nutrição tumoral. Além disso, as células cancerígenas podem apresentar uma estimulação autócrina de fatores de crescimento próprios, expressando receptores que induzem a proliferação continua (Cheng et al., 2008; Bhowmick et al., 2004).

A divisão descontrolada das células cancerígenas as torna muito agressiva, levando a formação de massas tumorais malignas, as quais podem se disseminar para diversas partes do organismo em um processo conhecido como metástase (Baractt et al, 2000). Já os tumores benignos se expandem de forma coesa e não possuem a capacidade infiltrativa e nem metastática como os tumores malignos. A metástase é um termo originado do grego que quer dizer “mudança de posição” e caracteriza-se por ser o desprendimento de partes do tumor primário, sendo um processo característico de tumores malignos. Essa disseminação dos tumores se dá por vãos sanguíneos e linfáticos, além de cavidades corporais. As chances de ocorrer metástase aumentam de acordo com a agressividade, o peso do tumor e o rápido crescimento (Foroni et al, 2012; Voulgari & Pintzas, 2009;).

Muitos fatores estão relacionados com o desenvolvimento dos diversos tipos de neoplasias, como sexo, cor, raça, exposição à carcinógenos e predisposição genética. Muitos fatores ambientais, sejam eles físicos, biológicos ou químicos, como

hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, radiações ionizantes, que podem em elevadas doses provocar câncer de pulmão, etilismo, que pode provocar câncer no trato gastrointestinal e cirrose hepática que por sua vez pode culminar em neoplasia hepática, fumo, dieta e até mesmo agentes infecciosos como o Vírus do Papiloma Humano (HPV) (Papiloma Vírus) causador de câncer de colo de útero e anus, Vírus Linfotrófico da Célula Humana (HTLV-1 e 2) causador de Leucemia de células T e Linfoma e o vírus Epstein – Barr que pode provocar Linfoma de Burkitt, podem levar ao desenvolvimento de neoplasias. As neoplasias compostas exclusivamente por fatores hereditários são raras. No entanto, algumas etnias apresentam baixa prevalência e incidência de determinados tipos de câncer, como indivíduos negros apresentam baixa incidência de sarcoma de Ewing e orientais raramente apresentam leucemia linfocítica (Brasil, 2013).

O câncer é atualmente uma patologia mundialmente difundida, principalmente em países desenvolvidos. No entanto, tem sido observado um aumento acentuado no número de casos da doença em países em desenvolvimento. As neoplasias estão entre as doenças com maior mortalidade, ocasionando mais de 17 milhões de óbitos mundialmente, ficando atrás apenas das doenças do aparelho circulatório, tornando-se um sério problema de saúde pública, gerando inúmeras perdas para a sociedade (Brasil, 2014).

O tratamento dos cânceres visa à eliminação total das células cancerígenas. Para isso são empregados como terapêuticas a remoção cirúrgica das massas tumorais, a utilização de quimioterápicos e o uso local de radiações, em tratamentos que vão desde a quimioterapia adjuvante, quimioterapia neoadjuvante e radioquimioterapia concomitante (Monteiro, et al, 2013). Na prática clínica pode se utilizar apenas uma dessas terapêuticas, mas também a combinação de dois ou mais desses tratamentos (Fukumasu et al, 2008). A remoção cirúrgica é controle locorregional, consistindo em um procedimento eficaz para remover tumores sólidos, porém não tem a mesma eficácia para neoplasias que apresentam metástase. O tratamento com radiações tem bom efeito em tumores locais, mas não apresenta bons resultados para o tratamento de cânceres de grande volume. Já a quimioterapia apresenta bons resultados em diversos tipos de neoplasias, porém os pacientes submetidos a esse tipo de tratamento desenvolvem inúmeras reações adversas, como náuseas, vômitos e alopecia.

O câncer ainda é um grande desafio para a medicina moderna, causando milhares de mortes e graves complicações de saúde, por isso é de suma importância à busca por novos compostos bioativos com ação farmacológica no controle das neoplasias, que

apresentem elevado potencial terapêutico e baixa toxicidade para as células saudáveis, proporcionar uma maior segurança e qualidade de vida ao paciente.

2. REVISÃO DA LITERATURA

O câncer é um conjunto de doenças caracterizadas pelo desenvolvimento de massa tecidual (tumor) resultante de uma divisão celular exacerbada. No desenvolvimento dessas doenças, o crescimento do tecido neoplásico supera o número de células do tecido sadio (Kirchner, 2014). As neoplasias apresentam-se de duas formas: benignas ou malignas, sendo que o desenvolvimento de uma neoplasia benigna para um câncer maligno está diretamente relacionado a alterações genéticas na célula (Bernstein, 2013). Essas alterações podem ser adquiridas ou hereditárias. As alterações adquiridas estão ligadas diretamente a exposição a agente químicos como compostos hidrocarbonetos policíclicos e dibenziltraceno, físicos como radiações ionizantes e biológicos como os vírus Vírus Linfotrófico da Célula Humana (HTLV-1 e 2) e o Vírus do Papiloma Humano (HPV) (Papiloma Vírus) causador de câncer de colo de útero e anus (Brasil, 2014).

2.1 Epidemiologia do Câncer

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que o número de novos casos de câncer no mundo deve chegar a 22 milhões de casos nas próximas duas décadas. Segundo o relatório da OMS a maior incidência dessa doença deve ocorrer em países em desenvolvimento, como o Brasil que vem sofrendo mudanças demográficas, com aumento da urbanização e industrialização, além de um envelhecimento maior da população (Parking et al, 2001).

Estimativas do câncer no Brasil para o ano de 2014, válidas também para o ano de 2015, registraram cerca de 576 mil novos casos da doença, levando em consideração os casos de neoplasias de pele não melanoma, o que demonstra a gravidade desse conjunto de doenças no Brasil. Entre os cânceres com maior incidência no Brasil, o câncer de pele do tipo não melanoma deve ser o primeiro na lista de novos casos (182 mil casos novos), em seguida os cânceres de próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil) completam a lista dos mais incidentes no Brasil (Brasil, 2014).

Tabela 1: Estimativa Estimativas para o ano de 2014 das taxas brutas de incidência por 100 habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária (numeros arredondados para 10 ou multiplos de 10).

Localização Primária da Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estado		Capitais		Estado		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	68.800	70,42	17.540	82,93	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	57.120	56,09	19.170	80,67
Colo do Útero	-	-	-	-	15.590	15,33	4.530	19,20
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	16,79	4.000	18,93	10.930	10,75	3.080	13,06
Cólon e Reto	15.070	15,44	4.860	22,91	17.530	17,24	5.650	23,82
Estômago	12.870	13,19	2.770	13,07	7.520	7,41	2.010	8,44
Cavidade Oral	11.280	11,54	2.220	10,40	4.010	3,92	1.050	4,32
Laringe	6.870	7,03	1.460	6,99	770	0,75	370	1,26
Bexiga	6.750	6,89	1.910	8,91	2.190	2,15	730	2,97
Esôfago	8.010	8,18	1.460	6,76	2.770	2,70	540	0,00
Ovário	-	-	-	-	5.680	5,58	2.270	9,62
Linfoma de Hodgkin	1.300	1,28	410	5,72	880	0,83	420	8,64
Linfoma não Hodgkin	4.940	5,04	1.490	6,87	4.850	4,77	1.680	7,06
Glândula Tireoide	1.150	1,15	470	1,76	8.050	7,91	2.160	9,08
Sistema Nervoso Central	4.960	5,07	1.240	5,81	4.130	4,05	1.370	5,81
Leucemias	5.050	5,20	1.250	5,78	4.320	4,24	1.250	5,15
Corpo do Útero	-	-	-	-	5.900	5,79	2.690	11,24
Pele Melanoma	2.960	3,03	950	4,33	2.930	2,85	1.150	4,57
Outras Localizações	37.520	38,40	9.070	42,86	35.350	34,73	8.590	36,49
Subtotal	203.930	208,77	51.100	241,30	190.520	187,13	58.710	248,46
Pele não Melanoma	98.420	100,75	19.650	92,72	83.710	82,24	22.540	95,26
Todas as Neoplasias	302.350	309,53	70.750	334,08	274.230	269,35	81.250	343,85

Fonte: Brasil, 2014. INCA 2014.

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer, dos 576 mil novos casos estimados no Brasil, deve se desenvolver em áreas primárias, como pulmão, próstata e cólon em indivíduos do sexo masculino e cólon, útero e mama em mulheres (INCA, 2013). O câncer de mama é atualmente o primeiro tipo de neoplasia mais incidente entre as mulheres, aproximadamente 22% dos novos casos de câncer que surgem em mulheres são de mama. Entre as neoplasias que acometem o sexo masculino, a mais incidente é a de prósta, representando cerca de 10% dos cânceres que acometem homens no mundo inteiro (INCA, 2013).

Figura 1: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma (numeros arredondados para 10 ou múltiplos de 10).

Localização primária	casos	%	Homens	Mulheres	Localização primária	casos	%
Próstata	68.800	22,8%			Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%			Cólon e Reto	17.530	6,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%			Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%			Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%			Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%			Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%			Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%			Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%			Leucemias	4.320	1,6%

Fonte: Instituto Nacional do Câncer-INCA, 2014.

2.2 Características básicas das células tumorais

Embora os agentes causadores do câncer possam ser diversos, as células que se tornam cancerígenas apresentam características comuns, como autossuficiência em fatores de crescimento, desregulação do metabolismo energético, resistência ao processo de apoptose, mutações no genoma da célula e instabilidade gênica, formação de neoangiogênese para manutenção tumoral, proliferação celular sem controle, processo inflamatório e propriedades invasivas e migratórias (Hanahan & Weinberg, 2011; Piana, 2013).

O processo de autossuficiência em fatores de crescimento das células neoplásicas envolve principalmente uma supre-expressão de receptores transmembrana para diversas moléculas, como fatores de crescimento celular, componentes da matrix extracelular e moléculas de adesão. Além disso, as células cancerígenas sintetizam fatores de crescimento que promovem a ativação de cascatas de sinalização de crescimento celular. Essas cascatas em sua maioria são iniciadas por receptores do tipo tirosina quinase, que tornam a célula cancerígena hiperresponsiva a fatores de crescimento mesmo quando os mesmos estão em baixas concentrações (Hanahan & Weinberg, 2000). Além disso, mutações em proteínas RAS (*Rat Sarcoma vírus ou vírus do sarcoma de rato*) aumentam a capacidade de autossuficiência das células cancerígenas. Essas proteínas são fundamentais no processo de transdução das informações celulares para a diferenciação e a multiplicação da célula. Porém quando mutadas tornam-se constitutivamente ativadas, promovendo uma sinalização de crescimento ininterrupta (Olson; Marais, 2000).

Além de autossuficiência em fatores de crescimento as células cancerígenas também possuem um potencial replicativo ilimitado. Nas células normais de mamíferos existem mecanismos intrínsecos que regulam sua multiplicação, independente de interações célula-célula. Os oncogêneses estão diretamente envolvidos com o crescimento celular. Esses genes quando ativados podem transformar células normais em células cancerígenas. Contrabalanceando os efeitos dos oncogenes, a célula de mamíferos possui genes supressores de tumor, que suprimem o comportamento neoplásico de células tumorais. A perda da expressão ou a inativação desses genes pode levar ao desenvolvimento do câncer (Hanahan & Weinberg, 2000).

A imortalidade das células cancerígenas ocorre quando as mesmas não entram mais em processo de senescência e dividem-se continuamente. Nesse processo os telômeros, contadores dos ciclos celulares, são mantidos em tamanhos acima do crítico por enzimas telomerasas, conferindo imortalidade as células cancerígenas (Benitez-Buelga, et al 2014; Kong et al, 2014.).

Figura 2: Características das células tumorais.



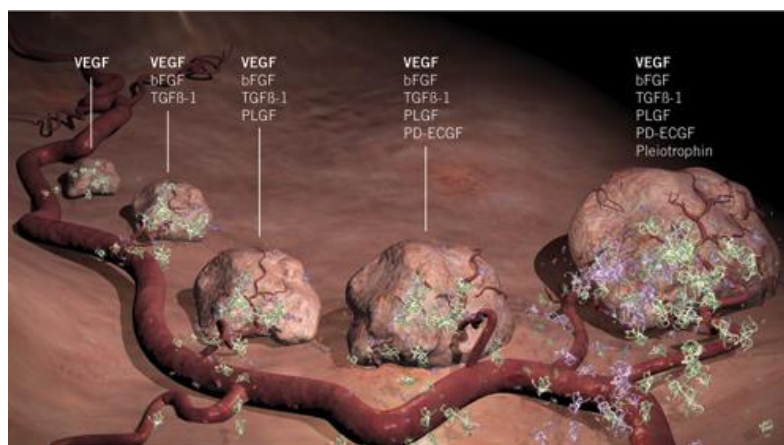
Fonte: Adaptado de Hanahan, D.; Weinberg, 2011.

As células cancerígenas também possuem a capacidade de criar uma nova vascularização, processo denominado Angiogênese, processo caracterizado por desenvolvimento de vasos sanguíneos a partir de uma vascularização pr-e-existente. Essa nova vascularização é imprescindível para o desenvolvimento tumoral, pois essa nova rede de vasos promove um suprimento adequado de nutrientes para as células tumorais,

além de ser fundamental para os processos de divisão celular (Parsons-Wingerter et al, 2000).

A maioria dos tumores sólidos necessita de um suprimento de sangue independente para crescer. Para a obtenção de aporte de sangue o tumor expressa fatores de crescimento que promovem a angiogênese, sendo o VEGF, dímero proteico, que ativa receptores transmembranares que promovem o crescimento de células endoteliais, criando novos vasos. Esse processo é intermediário no desenvolvimento do tumor e perdura até estágios mais avançados da doença, favorecendo inclusive o desenvolvimento de metástase, processo agravante no desenvolvimento do câncer, característico de tumores malignos, responsáveis por cerca de 90% das mortes por câncer (Foroni et al, 2012). O bloqueio do VEGF e outras proteínas promotoras de angiogênese tem sido alvo de inúmeras terapias antitumorais, visto que esse fator de crescimento de angiogenese induz um brotamento de novos vasos em poucos dias, promovendo uma duplicação da densidade microvascular (Ferrara et al, 2003; Komorowski et al, 2006).

Figura3: Demonstração do crescimento e vascularização do tumor sólido através do sistema VEGF. Sistema VEGF, um alvo multiterapêutico.



Fonte: www.biooncology.com

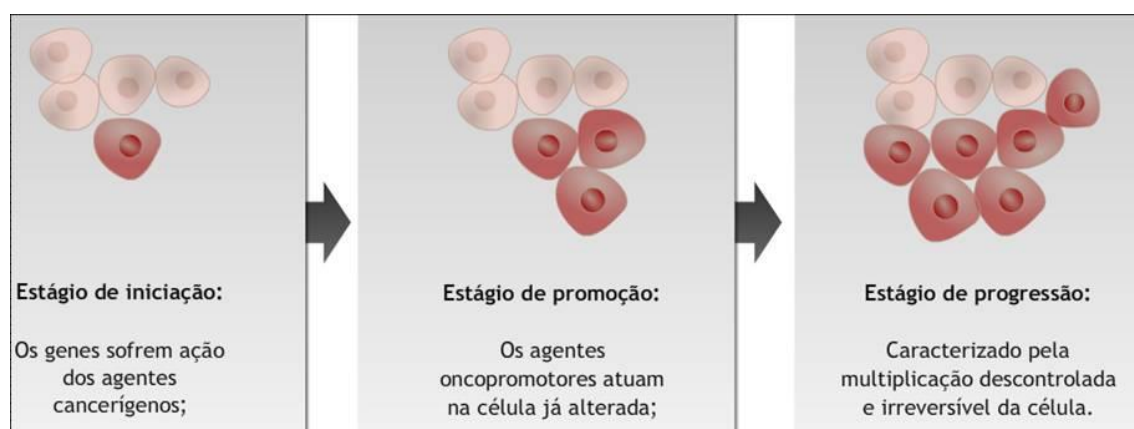
2.3 Fases do desenvolvimento neoplásico

As células cancerígenas passam por etapas no desenvolvimento da carcinogênese. Essas fases podem ser divididas em iniciação, promoção, progressão e metástastização (Hursting et al, 1999). A iniciação é o processo inicial que leva uma célula normal a se transformar em uma célula neoplásica. Nessa fase há a exposição do DNA a um agente

tumorigênico. O DNA exposto sofre mutações e ganhando a capacidade crescimento autônomo e insensibilidade a sinais inibidores de crescimento, processos fundamentais para que ocorram os ciclos de proliferação (Contran et al, 2000). Após a etapa de iniciação as células cancerígenas entram em na fase de promoção, iniciando a expansão clonal, com células apresentando pleomorfismo celular e nuclear e índice mitótico aumentado. Nessa fase começam a se formar pequenos nódulos, pólipos ou papilomas. Nessa fase fatores como tempo de duplicação celular e taxa de morte das células influencia na velocidade de crescimento tumoral e na ação de agente antineoplásicos ao tumor.

Seguido a fase de promoção dar-se início a fase de progressão, caracterizada por evolução do câncer maligno, com características histológicas distintas. Após essa etapa, a neoplasia pode entrar em estado de metastização, processo decorrente do deslocamento de uma parte do tumor primário para outra região e/ou outro tecido do organismo. Essa disseminação pode ocorrer por espaços e cavidades, como a pleura, pericárdio e a cavidade peritoneal (Jakóbisiak et al 2003).

Figura 4: Processos de desenvolvimento da carcinogênese.



Fonte: <http://enfermagem-com.blogspot.com.br/2012/04/tudo-sobre-cancer.html>.

2.4 Quimioterapia e mecanismos de ação de fármacos antineoplásicos

A terapêutica do câncer segue três linhas: tem seguido três linhas: cirurgia para remoção da massa tumoral; o tratamento radioterápico, que busca um controle locorregional da neoplasia, com preservação da estrutura e funcionalidade dos tecidos normais utilizando doses controladas de radiação, além de eliminar rapidamente células em divisão e a mais utilizada atualmente a quimioterapia antineoplásica, que consiste no

uso de fármacos antineoplásicos. Esta última, apesar de ser o principal meio de tratamento das doenças neoplásicas, principalmente na fase metastática, apresenta algumas complicações devido ao seu baixo índice terapêutico, pois a dose terapêutica é similar a dose tóxica, o que provoca muitos efeitos colaterais no paciente (Fukumasu et al, 2008). A quimioterapia antineoplásica é dividida em algumas etapas: a indução da remissão das células neoplásicas, a consolidação da remissão e a quimioterapia de manutenção e a intensificação tardia (Cigogna et al, 2010).

Existem alguns tipos de quimioterapia antineoplásica, como a quimioterapia neoadjuvante, que é realizada antes do tratamento cirúrgico do câncer, diminuindo o tamanho do tumor, tornando o processo cirúrgico menos radical para o paciente. Já a quimioterapia adjuvante é realizada após a remoção cirúrgica do tumor. A quimioterapia paliativa tem como finalidade diminuir sensações dolorosas provocadas pelo crescimento tumoral, prolongando e melhorando a qualidade de vida do paciente.

A integração da quimioterapia antineoplásica com a cirurgia para remoção de tumores e a radioterapia tem sido fundamental para a remissão de muitas neoplasias, principalmente nos estágios iniciais da doença.

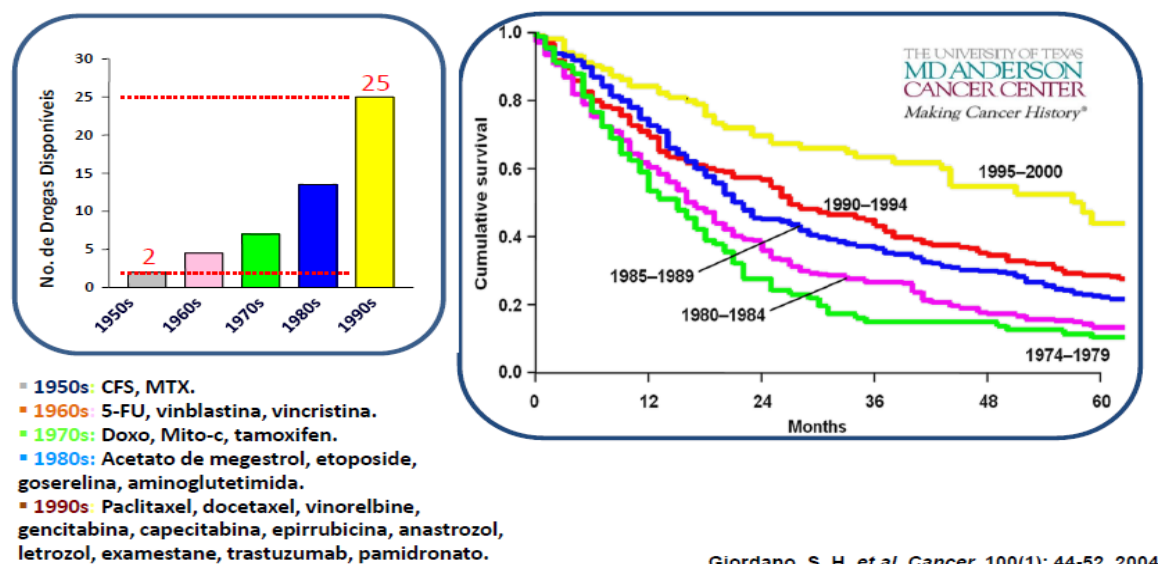
Além da elevada toxicidade dos medicamentos antineoplásicos atualmente utilizados na terapêutica do câncer, outro obstáculo no tratamento dessa doença tem sido o desenvolvimento de resistência celular aos fármacos (MDR= *multidrug resistance* ou resistência multifármaco), caracterizado pela resistência de células cancerígenas a agente antineoplásicos (O'Brien et al, 2008; Fujii et al, 2009). Somado a isso, os cânceres são doenças que apresentam características muito distintas e por tanto requerem tratamentos diferenciados (Gorczyca et al, 1999).

O uso de mais de um fármaco antineoplásico no tratamento das neoplasias também tem sido amplamente utilizado na terapêutica dessas doenças. A poliquimioterapia aumenta a mortalidade das células tumorais e diminui as chances de resistência aos antineoplásicos (Almeida et al, 2005). Além disso, o uso da poliquimioterapia permite a utilização de ciclos para o tratamento geralmente de três a quatro semanas, o que possibilita a ação sincronizada desses medicamentos sobre as células tumorais em divisão, além de permitirem uma recuperação dos tecidos normais afetados (Roque et al, 2006).

Devido ao grande número de mortes e complicações associadas ao câncer, como internações e invalidez, à pesquisa por compostos com atividade antitumoral cresceu

vertiginosamente, possibilitando uma sobrevida maior aos portadores dessas doenças (Giordano et al, 2004).

Figura 5: Impacto da incorporação de novas drogas na sobrevida do câncer de mama metastático.

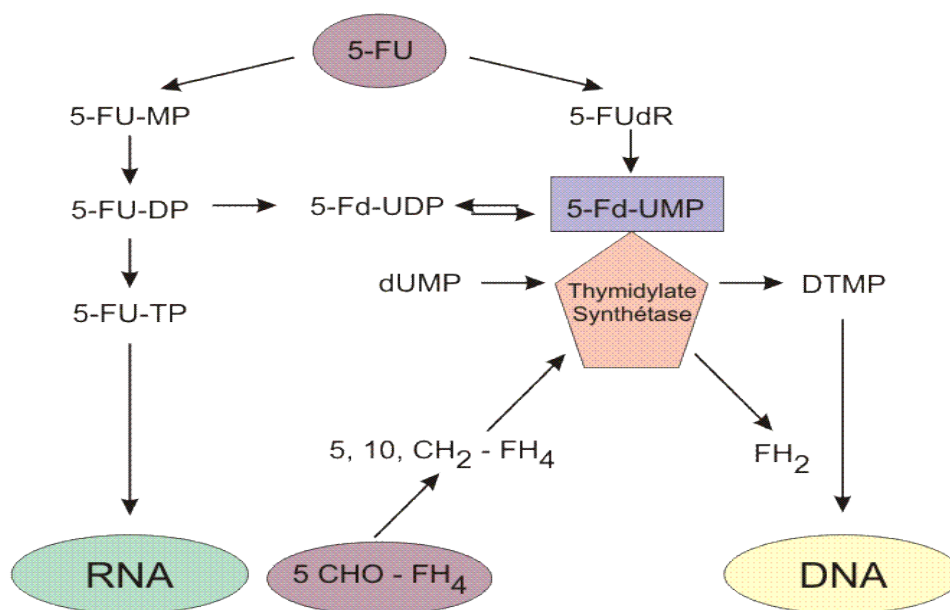


Fonte: Adaptado de Giordano et al, 2004.

As principais drogas utilizadas no tratamento do câncer são divididas em dois grupos principais: os agentes antineoplásicos citotóxicos e hormônios e antagonistas (Rang et al., 2003; Richardson et al., 2000). Entre os principais agentes citotóxicos estão os agentes alquilantes que modificam o DNA por alquilação (cisplatina, Clorambucil e Isofasmida), os alcaloides vegetais, os antibióticos citotóxicos incluindo aqui os membros das famílias da antraciclina, bleomicina, mitomicina e actinomicina (Rocha; Lopes; Schwartzmann, 2001), e os antimetabólitos inibem a síntese de purinas (metotrexato, tioguanina, 5-Fluoruracil).

O 5-Fluoruracil é um agente antineoplásico amplamente utilizado na terapêutica do câncer. Esse medicamento apresenta variabilidade na resposta terapêutica e na toxicidade (Barattè et al, 2010). O mecanismo de ação do 5-fluoruracil (5-FU) é diretamente ligado ao seu metabolismo. O 5-FU é metabolizado em Monofosfato de fluorodeoxiurina (FdUMP), um metabólito ativo que inibe a ação da enzima timidilado sintase, bloqueando assim a biossíntese de DNA, promovendo a apoptose (Malet-Martino et al, 2002)

Figura 6: Mecanismo de ação do 5-FU.



Fonte: <http://www.oncoprof.net/>

2.5 Modelos Experimentais de Câncer

Na pesquisa por novos compostos com atividade antitumoral a cultura de células tem sido uma ferramenta fundamental, pois possibilita uma análise rápida do efeito antineoplásico do composto testado frente às células cancerígenas (Carvalho, 1996). Outra vantagem apresentada pelo cultivo de células é a sua capacidade de fácil multiplicação, gerando assim um grande quantitativo de células uniformes morfolologicamente.

Além do sistema de cultivo celular *in vitro* outros sistemas de pesquisa de atividade antitumoral têm sido utilizados, como por exemplo, a indução de carcinogênese em modelos animais. Esse sistema tem sido de grande utilidade na pesquisa de compostos antineoplásicos, pois permite a avaliação de diversos processos envolvidos no desenvolvimento do câncer, como angiogênese, metástase e inflamação.

2.5.1 Carcinoma de Ehrlich

O Tumor de Ehrlich tem sido um modelo de estudo antitumoral amplamente utilizado na pesquisa de novos compostos antineoplásicos e na elucidação de mecanismos a ação antitumoral. Essa neoplasia foi descrita em 1905 pelo pesquisador Ehrlich, que um ano depois descreveu essa neoplasia como um carcinoma mamário oriundo de camundongos fêmeas (Ehrlich; Apolant, 1905). Só em 1932 que esse tumor adquiri-o a sua forma ascítica, passando a ser inoculado por via peritoneal nos animais (Loewenthal; Jahn, 1932).

Diversas vantagens desse modelo de tumor o tornam amplamente utilizado na pesquisa por compostos bioativos contra o câncer. Entre essas características estão a sua capacidade de crescimento rápido e elevada agressividade para o organismo (Ajith; Janardhanan, 2003).

Em virtude dessas características e do seu fácil manuseio, o Tumor de Ehrlich tem sido utilizado para a pesquisa de diversos estudos relacionados ao câncer, tais como a resposta imunológica do organismo frente às neoplasias (Palermo-Neto; Mossoco; Souza, 2003), na avaliação da angiogênese tumoral (Kumar et al, 2009), o efeito de toxinas sobre o crescimento das neoplasias (Mady, 2002), no estudo de drogas anti-inflamatórias (Pal, et al, 2001) e no efeito do estresse sobre o desenvolvimento tumoral (Palermo-Neto; Mossoco; Favare, 2001).

2.5.2 Sarcoma 180

O sarcoma 180 também é um modelo de estudo para atividade antitumoral bastante utilizado na pesquisa. Esse tumor, também conhecido como Tumor de Croker, por ter sido inicialmente identificado no Croker Laboratory em 1904, é um tumor sólido que pode ser inoculado por via subcutânea, intramuscular ou intraperitoneal, crescendo rapidamente (Shabel, 1977).

Chalotte Friend realizou experimentos com o sarcoma 180 e observou que após três semanas submetidos ao tumor camundongos na sua forma ascítica desenvolveram necrose e a mesma levou os animais a morte devido a desnutrição e septicemia. Esse Sarcoma foi um dos primeiros tumores utilizado em animais para pesquisar o câncer, por propiciar um bom manejo e cultivo, uma inoculação subcutânea de simples realização e um crescimento satisfatório nos animais que recebem a inoculação dessas células (Qi; Xu, 2006).

2.6 Câncer e o Processo Inflamatório

O processo inflamatório é uma reação patofisiológica em resposta a lesões ou agentes danosos, como células com algum tipo de dano. Essa reação se caracteriza por uma resposta vascular, com migração e ativação leucocitária, podendo ser a inflamação aguda ou crônica (Kumar et al, 2005).

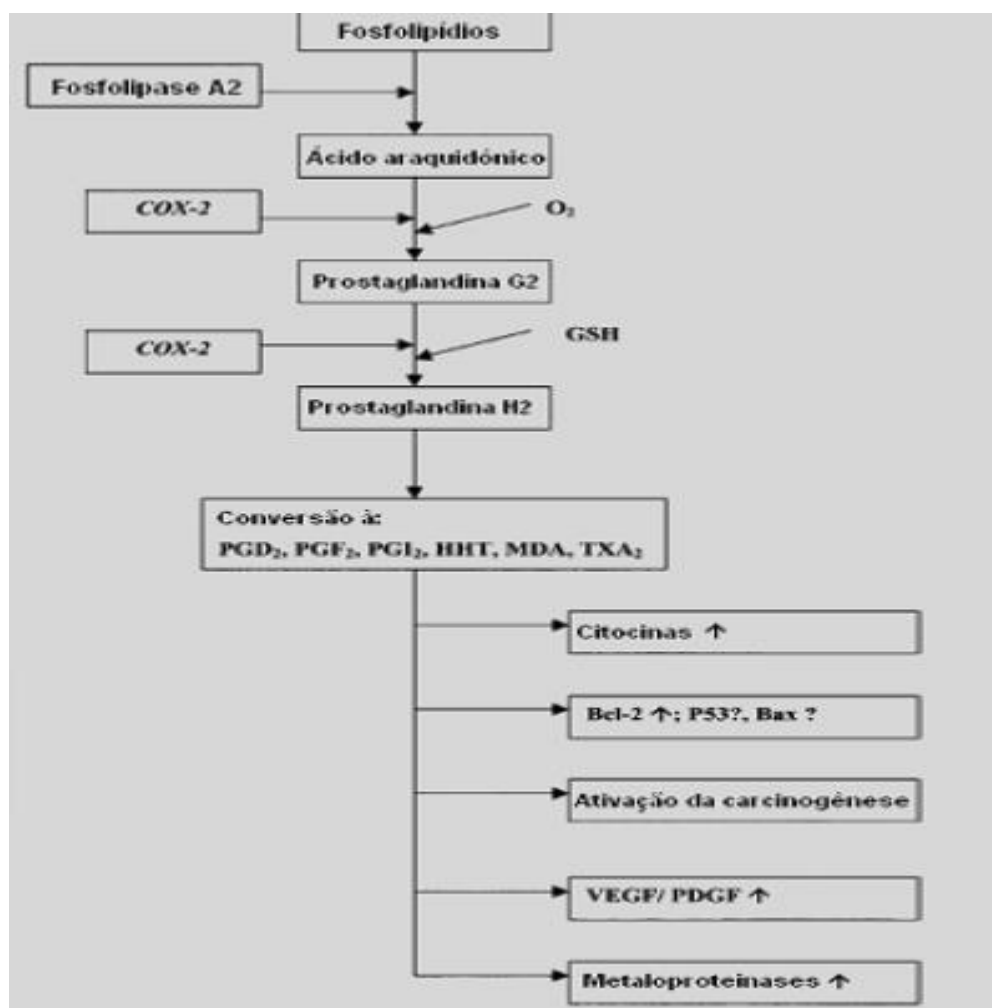
A relação entre as neoplasias e a inflamação vem sendo estudada a bastante tempo. Virchow em 1863 descreveu uma relação entre o desenvolvimento do câncer com processos inflamatórios crônicos. Essa relação pode ser exemplificada pelo maior risco que pacientes com hepatites virais podem desenvolver câncer hepático e que portadores da bactéria *Helicobacter pylori* tem de desenvolver câncer no aparelho gastrointestinal (Kumar, Abbas, Fausto, 2004).

Entre os diversos mediadores da inflamação, os metabólicos do ácido araquidônico, ácidos graxos também denominados de eicosanoides estão entre os principais. Esses mediadores são sintetizados principalmente pelas ciclooxigenases (COX), enzimas que estão superexpressas em locais de processo inflamatório. Entre os eicosanoides mediadores da inflamação os principais são os tromboxanos, os leucotrienos e as prostaglandinas (Borne, 2002).

Subhashini, 2005 demonstrou que a superexpressão da COX-2 promovendo o processo inflamatório está diretamente relacionado com a progressão do câncer, principalmente por promover o desenvolvimento de etapas fundamentais para o crescimento do tumor, como: alterações no Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) o que acaba desencadeando um processo de angiogênese, favorecendo assim um maior aporte de oxigênio e nutrientes para a massa tumoral e resistência à morte celular programada, o que permite a imortalidade dessas células.

A relação entre a carcinogênese e a inflamação se dá primeiramente devido a ação da enzima fosfolipase, que converte lipídeos de membrana em ácido araquidônico. Esse ácido araquidônico por sua vez irá ser convertido nos eicosanoides tromboxanos e prostaglandinas, pela ação da enzima COX-2. Esses mediadores da inflamação irão elevar a expressão de uma proteína antiapoptótica, a Bcl-2 e do no Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), o que promove o crescimento neoplásico (Waris; Siddiqui, 2005; Ghosh et al., 2010; Dempke et al, 2001).

Figura 7: Mecanismo de relação entre o câncer e processo inflamatório por meio do metabolismo do ácido araquidônico.



Fonte: Adaptado de Dempke et al, (2001).

Potenciais inibidores da inflamação, principalmente das Ciclooxygenases, tem sido interesse de diversos estudos que buscam alvos moleculares para terapias contra o câncer. Moléculas que possam atuar inibindo as ciclooxygenases, podem contribuir para o tratamento do câncer, visto que essas enzimas ativam positivamente diversos mecanismos promotores do câncer, que inibidos levam a uma regressão da doença (Lim et al, 2001).

2.7 Desenvolvimento de novos fármacos

O crescimento do número de novos casos de câncer tem impulsionado um aumento nas pesquisas que visam encontrar alternativas de tratamento para esse conjunto

de doenças (Huryn, 2013; Reitz, 2012). Nesse cenário de desenvolvimento de novos fármacos, tem se destacado a química medicinal, que possui interfaces bem estabelecidas com a bioquímica, a farmacologia, toxicologia e a biologia molecular (Montanari; Bolzani, 2001).

Este ramo da pesquisa desperta grande interesse também em virtude da sua capacidade de permitir modificações na estrutura dos compostos, potencializando a sua atividade biológica ou até mesmo incrementando uma nova ação do composto. Essas modificações na estrutura são de suma importância, pois através dessas mudanças é possível chegar a um grupo farmacofórico de elevada potência biológica, também com elevada especificidade, estabilidade e toxicidade controlada (Huryn, 2013).

2.8 Ftalimidas

As ftalimidas pertencem a classe das imidas cíclicas, um grupo de compostos que além das ftalimidas apresenta também as maleimidas, naftalimidas, glutarimidas e as succinimidas e que apresentam como característica comum, duas carbonilas ligadas ao mesmo nitrogênio. Essas imidas cíclicas possuem características comuns, como hidrofobicidade, o que lhes permite atravessar as membranas celulares.

Muitas propriedades biológicas das imidas cíclicas já foram observadas, dentre as principais estão, hipolipidêmica, antimicrobiana, antinoceptiva, anti-inflamatória e antitumoral (Gajare; Mahajan 2012; Jean et al, 2009). As propriedades desses compostos estão diretamente ligadas ao tamanho das moléculas e principalmente aos grupos substituintes adicionados no anel imídico. Esses grupamentos podem alterar a ação biológica ou até mesmo potencializar o efeito do composto (Cechinel Filho et al, 2003).

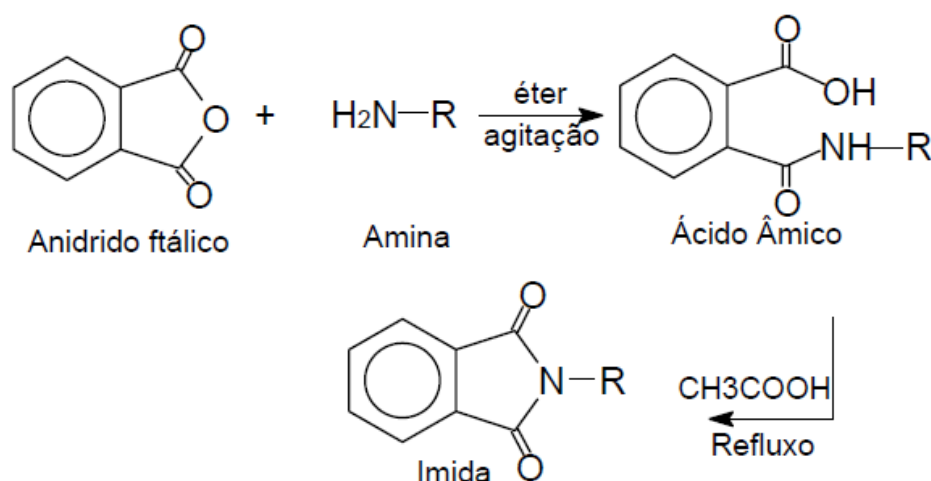
As ftalimidas tem despertado grande interesse na química medicinal em virtude do grande número de atividades biológicas atribuídas a essa classe de compostos (Gajare; Mahajan 2012). Além do grande número de ações biológicas, esses compostos destacam-se por apresentarem uma síntese simples e rápida, além de permitir modificações estruturais planejadas em sua molécula, permitindo assim a obtenção de novos derivados de ftalimidas (Gaikwad et al, 2010).

2.8.1 Aspectos Químicos

As ftalimidas podem ser obtidas através da condensação do Anidrido Ftálico com Aminoácidos específicos como a ureia. Esses dois compostos são misturados na proporção

molar 1:1 em meio etéreo e deixados sob agitação. Quando condensados formam o Ácido Âmico, que recebe ácido acético e a reação é deixada por duas horas e posteriormente refluxada, obtendo-se a ftalimida (Buzzi et al, 2003).

Figura 8: Síntese de Ftalimidas com Aminas.

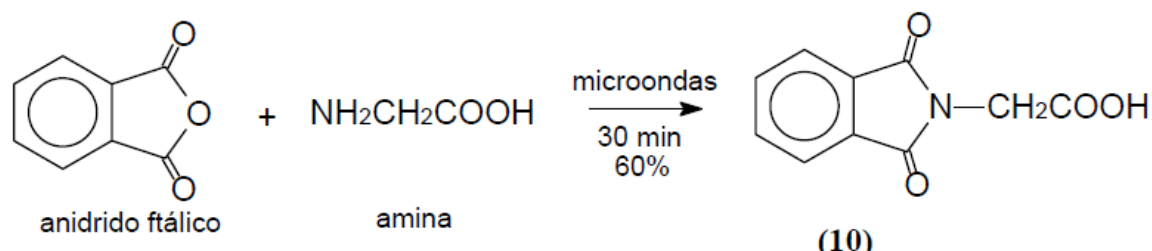


Fonte: Adaptado de Cechinel Filho et al, 2003.

Além da síntese utilizando solventes orgânicos outras metodologias de criação de ftalimidas tem sido desenvolvidas, como por exemplo, a utilização de energia de ultrassom, que tem sido de grande aplicabilidade na síntese de compostos orgânicos devido a características positivas como aumento do rendimento, redução do tempo da reação e principalmente economia de reagentes (Martines et al, 2000).

A utilização de irradiação por microondas também tem sido bastante utilizado na síntese de derivados de ftalimidas. Essa metodologia também dispensa solventes orgânicos e apresenta bom rendimento, em torno de 95% e em um período curto de tempo (10 minutos).

Figura 9: Síntese de Ftalimidas por meio de microondas



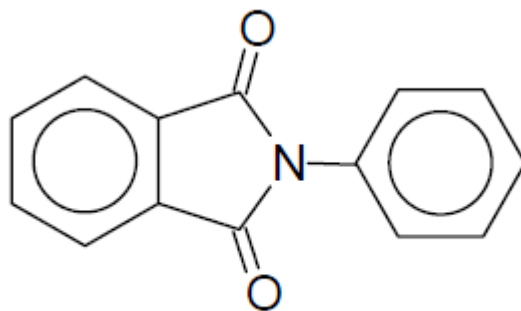
Fonte: Adaptado de Antunes et al, 1998).

2.8.2 Aspectos Biológicos das Ftalimidas

Derivados de Ftalimidas tem apresentado segundo a literatura inúmeras atividades biológicas, que tem despertado grande interesse da química medicinal. Ftalimidas que contendo grupamentos Sulfonas e Tioéster apresentaram excelente atividade hipolipidêmica em ratos tratados com esses compostos (Buzzi et al, 2003).

A Difenimida, um derivado das ftalimidas foi capaz de diminuir os níveis séricos de ácido úrico em camundongos normouricos e hiperuricos, submetidos ao tratamento com esse composto na dose na dose de 20 mg/Kg/dia durante 14 dias. Essa atividade biológica foi atribuída a potente ação desse composto de inibir a enzima xantina oxidase, que possui um papel central na formação do ácido úrico (Hall et al, 1990). Estudos demonstraram que Ftalimidas com grupamento fenil apresentaram atividade anticonvulsivante similar até mesmo a anticonvulsivantes comerciais como a carbamazepina e a fenitoína (Chechinel Filho et al, 2003).

Figura 10: Ftalimida com grupamento Fenil na sua estrutura química.

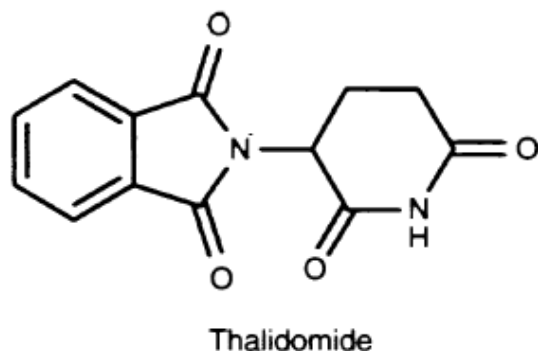


Fonte: Adaptado de Chechinell Filho et al, 2003.

A Talidomida é uma importante ftalimida, amplamente estudada desde a sua síntese primária na Alemanha em 1954, onde era utilizada principalmente pelo seu efeito sedativo. Porém, essa ftalimida apresentou sérios problemas quando utilizado por gestantes, causando má formação dos fetos. Esse composto tem sido reimplantado na clínica médica para tratar principalmente casos de Mieloma Múltiplos refratários a quimioterapia, principalmente junto com seu derivado a Lenalinomida, na prevenção e tratamento da Hanseníase e em Doenças Crônicas Degenerativas como o Lupus Eritematoso Sistêmico (Mitsiades et al, 2002; Dispenzieri et al, 2007).

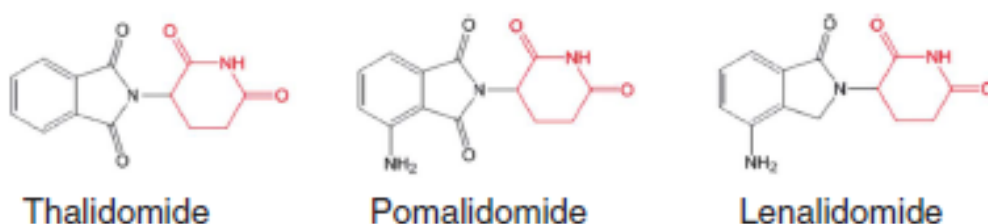
A Talidomida tem seu efeito antitumoral diretamente ligado à capacidade que esse composto possui de inibir a angiogênese tumoral, diminuindo assim, a oferta de substâncias fundamentais para o crescimento do tumor. Além disso, esse composto também promove uma acentuada redução do fator de necrose Tumoral Alfa (TNF- α), fundamental no desenvolvimento e na manutenção do processo inflamatório que se instala na formação da massa tumoral (Noguchi et al 2005).

Figura 11: Estrutura química da Talidomida.



Fonte: Adaptado de Ching et al, 1998.

Figura 12: Talidomida e seu derivados: Polalidomida e Lenalidomida.



Fonte: Adaptado de Lopez-Ginora et al, 2012.

As ftalimidas também tem apresentado atividade antitumoral em diversos estudos e por mecanismos de ação bem distintos. Najda-Bernatowicz e colaboradores sintetizaram e avaliou a ação de inibição da proteína quinase Ck2, uma proteína de grande relevância no controle da proliferação celular. Nesse estudo, esses derivados de ftalimidas apresentaram significativa inibição dessa proteína, demonstrando possível efeito contra diversos tipos de câncer, pois desregulações nessa proteína quinase podem promover o desenvolvimento do câncer.

2.9 Triazóis e Glicoconjugados

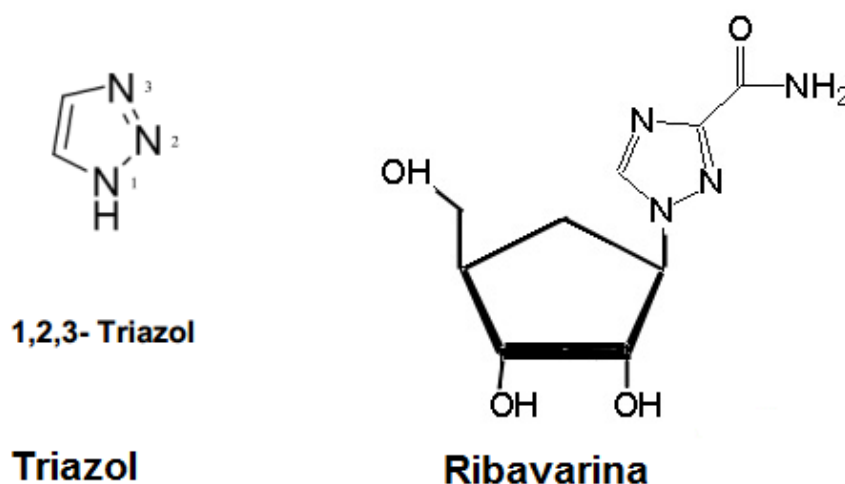
2.9.1 Triazóis

Os triazóis são compostos hetrociclicos de origem sintética, que não ocorrem na natureza (Freitas et al, 2011). Quimicamente esses compostos caracterizam-se por

apresentarem três átomos de nitrogênio ligados no mesmo núcleo cíclico (Freitas et al, 2011). Essa classe de composto tem despertado grande interesse da comunidade científica, por apresentar grande aplicabilidade como fármacos no tratamento do câncer e do HIV e principalmente como pesticidas no combate a pragas prevalentes na atividade agrícola e boa excelente estabilidade térmica (Wang, 2011; Xia, 2007; Stfani et al, 2009).

Entre os principais fármacos desenvolvidos com o núcleo de triazóis está a Ribavirina, utilizado no tratamento da hepatite (Xia 2007). Além de atividade antiviral o núcleo 1,2,3*H*-Triazóis também foi testado frente a bactérias, apresentando bons resultados, inclusive tão eficiente quanto a Penicilina, além de se mostrarem resistentes a β -lactamases, enzimas responsáveis pela resistência de algumas bactérias a antibióticos (Dzhuraev et al, 1992).

Figura 13: Estrutura química dos Triazóis e da Ribavarina.



Fonte: Freitas et al, 2011; www.iqb.es

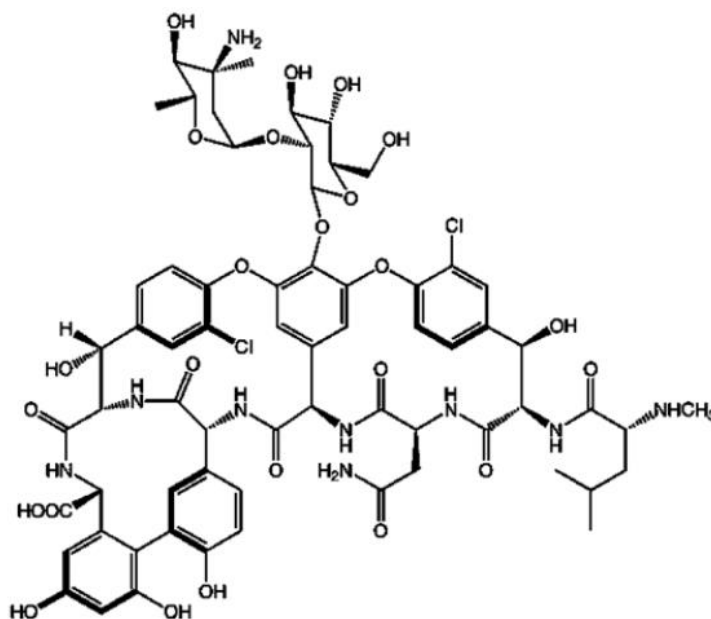
A busca por medicamentos contra o câncer tem impulsionado a síntese de novas moléculas com menor toxicidade e com ação seletiva. Além das atividades biológicas como grupo farmacológico relatadas acima dos triazóis, essa classe de compostos também pode apresenta a capacidade de promover a ligação entre outros grupos químicos com atividades biológicas (Chan; Folkin 2007). Essas moléculas também atuam como bioisósteros de amidas, ou seja, grupos que possuem similaridade química ou físico-química e atividades biológicas similares, devido principalmente ao fato do grupamento triazólico não ser hidrolisado e nem sofrer redução nem oxidação (Aaltonen et al, 2013).

2.9.2 Glicoconjugados

Junto com lipídeos e proteínas os carboidratos constituem as principais biomoléculas. Esses compostos apresentam diversas funções orgânicas que vão desde a constituição de intermediários metabólicos, fontes de energia, constituição de nucleotídeos e da parede celular de bactérias e plantas (Berg et al, 2002).

Os glicoconjugados ligam-se covalentemente a porção não-glicídica e desempenha diversas funções biológicas, principalmente nos processos de interação entre células, como em eventos inflamatórios, resposta imunológica, infecções e metástase tumoral (Holemann; Seeberger, 2004; Rudd et al, 2001; Varski, 1993). Algumas moléculas com atividade antimicrobiana, como a Vancomicina, possuem na sua estrutura glicopeptídeos. Esse antibiótico possui um efeito potente contra cocos Gram-positivos como o *Staphylococcus aureus*, inibindo a síntese de peptideoglicanos da parede celular bacteriana o que leva a lise celular (Silveira et al, 2006).

Figura 14: Estrutura química da Vancomicina

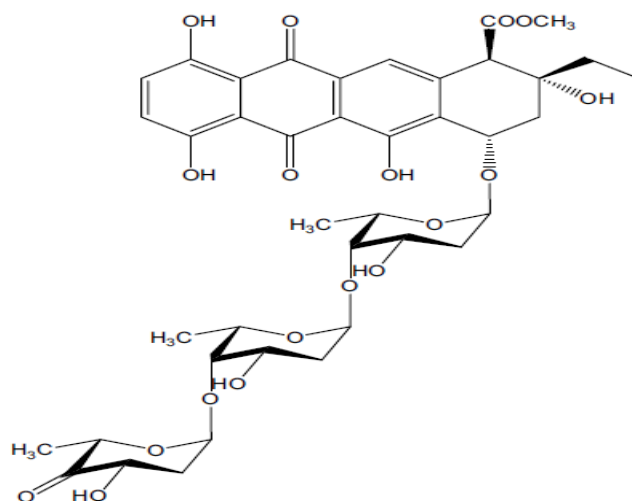


Fonte: Adaptado de Silveira et al, 2006.

Muitos carboidratos apresentam aplicações biológicas como vacinas, fármacos antimicrobianos e antitumorais. O fármaco antitumoral Ciclamina, por exemplo,

necessita da sua porção carboidrato para que o mesmo seja reconhecido e incorporação no DNA da célula neoplásica, impedindo o seu crescimento (Sofia, 1996).

Figura 15: Estrutura da Ciclamicina



Fonte: Adaptado de Sofia, M. J. Drug Disc. Today 1, 27-34, 1996).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Sintetizar e avaliar a atividade antitumoral de glicoconjugados de ftalimidas sobre tumores sólidos experimentais e a atividade Anti-inflamatória em camundongos albinos suíços machos.

3.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar o alcino-açúcar.
- Preparar N-(azidas)alquil]ftalimidas com cadeia alifática $-(CH_2)_n-$ ($n = 2, 3$ e 4).
- Realizar a síntese dos glicoconjugados de ftalimidas com triazóis.

- Analisar a ação antineoplásica dos compostos obtidos sobre tumores experimentais em camundongos.
- Avaliar o efeito do tratamento com os compostos sintetizados sobre a histologia dos tumores de animais experimentais.
- Avaliar o efeito do tratamento com os compostos sintetizados sobre o eritrograma e leucograma de animais submetidos a tumores experimentais.
- Avaliar a atividade anti-inflamatória dos compostos obtidos.

REFERÊNCIAS

Aaltonen, N et al.; Piperazine and Piperidine Triazole Ureas as Ultrapotent and Highly Selective Inhibitors of Monoacylglycerol Lipase. **Chemistry & Biology** v.20, p.379–390, 2013.

Ajith, T. A.; Janardhanan, K. K. Cytotoxic and antitumor activities of a polypore macrofungus, *hellinusrimosus* (Berk) Pilat. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, p. 157-162, 2003.

Almeida, V.L.; Leitão, A.; Reina, L. C. B; Montanari, C. A; Donnnici, C. L; Lopes, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Química Nova**, v.28 n.1, 2005.

Antunes, R.; Batista, H.; Srivastara, R. H.; Thomas, G.; Araújo, C. C. New phthalimide derivatives with potentan algesic activity. **Bioorg. Med. Chem**, v.21(8), p.3071-3076, 1998.

Barattè S. B. M. A review of analytical methods for the determination of 5-fluorouracil in biological matrices. **Anal Bioanal Chem**, v.397(3): p1191-201, 2010.

Berg, J. M.; Tymockzko, J. L.; Stryer, L. **Biochemistry**, 5th Ed.; New York, W. H. Freeman, 2002.

Carvalho, T. U. Cultura de células animais.In: Benchimol, M.; Attias, M.; Cunha-Silva, N. L.; Carvalho, T. U. **Métodos de estudo da célula**. Rio de Janeiro. Editoração Eletrônica Fenorte/Uenf, p.47-58, 1996.

Cheng, N.; Chytil, A.; Shyr, Y.; Joly, A.; Moses, H. L. Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. **Mol. Cancer Res**. 6, 1521–1533, 2008.

Dempke, W.; Rie, C.; Schmoll, A. G. H. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy?. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, n. 127, p 411-417, 2001.

Ehrlich, P.; Apolant, H. Beobachtungen über maligne Mauseumoren. *Berl. Klin Wschr.* v.28, p.871-874, 1905.

Lemmon, M. A.; Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell** 141, 1117–1134, 2010.

Loewenthal, H.; Jahn, G. Übertragungsversuche mit carcinoma toser Mäuse Ascites flüssigkeit und ihr Verhalten gegen physikalische und Chemische Einwirkungen. **Ztschr F Krebsforsch**, v.12, p.37-439, 1932.

Baractt, F. F.; Fernandes Júnior, H. J.; Silva, M. J. *Cancerologia Atual: Um enfoque multidisciplinar*. **São Paulo, Ed. Roca**, 2000.

Benitez-Buelga et al. Impact of chemotherapy on telomere length in sporadic and familial breast cancer patients. **Breast Cancer Res Treat**, 2014.

Bernstein, C. et al. DNA Damage, DNA Repair and Cancer, New Research Directions in DNA Repair, **Prof. Clark Chen (Ed.)**, 2013.

Bhowmick, N. A.; Neilson, E. G.; Moses, H. L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. **Nature** 432, 332–337, 2004.

Borne, R. F. Nosteroidal anti-inflammatory agents. In: Williams, D. A.; Lemke, T. L (Ed.). **Foye's principles of medical chemistry. 5 ed. Baltimore, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins**, 2002.

Brasil. Instituto Nacional do Câncer-INCA. Estatísticas do Câncer. Vigilância do Câncer e de Fatores de Risco. [Acessado em 12 de dezembro de 2014]. **Disponível em:** <http://www.inca.gov.br/vigilancia/>

Brasil. Instituto Nacional do Câncer-INCA. Fisiopatologia do Câncer. [Acessado em 8 de novembro de 2013]. **Disponível em** <http://www.inca.gov.br/enfermagem/docs/cap2.pdf>.

Buzzi, F. C.; Corrêa, R.; Chechin, V. F. In: Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. **Itajaí, Univali**, cap. 2, p.59-105, 2003.

Chechin, V. F.; Corrêa, R.; Campos, F.; Yunes, R. A.; Nunes, R. J. Chemical aspects and therapeutic potential of cyclic imides: A review. **Química Nova**, v.26, p.230-241, 2003.

Ching, L. M.; Browne, W.L.; Tchernegovski, R.; Gregory, T.; Baguley, B. C.; Palmer, B. D. Interaction of thalidomide, phthalimide analogues of thalidomide and pentoxifylline with the anti-tumour agent 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid:

concomitant reduction of serum tumour necrosis factor-alpha and enhancement of anti-tumour activity. **British Journal of Cancer** v.78(3), p.336-34, 1998.

Cicogna, E. C.; Castanheira, L. N.; Garcia de Lima, R. A. Children and Adolescents with Cancer: Experiences with Chemotherapy. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**; v.18(5), 2010.

Contran, R. S.; Kumar, V.; Collins, T. Neoplasia. In: Contran, R. S.; Kumar, V.; Collins, T. (Eds.) Robbins. Patologia estrutural e funcional. Rio de Janeiro: Editora Guanabara koogan S.A.; p233-295, 2000.

Dispenzieri A.; Lacy, M. Q.; Zeldenrust, S. R.; Hayman, S. R.; Kumar, S. K, et al. The activity of lenalidomide with or without dexamethasone in patients with primary systemic amyloidosis. **Blood** 109: 465–470, 2007.

Dzhuraev, A. D.; Maksumov, A. G.; Amanov, N.; Russ. **Pharmacol. Toxicol.** v.3, p.99, 1992.

Chan, T.R.; Fokin, V. V. Polymer-Supported Copper(I) Catalysts for the Experimentally Simplified Azide-Alkyne Cycloaddition. **QSAR Comb Sci.** v.26, p.1274–1279, 2007.

Ferrara, N.; Gerber, H. P.; LeCouter, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nature Medicine**, v.9, p.669-676, 2003.

Faroni, C.; Broggin, M.; Generali, D.; Damia, G. Epithelial–mesenchymal transition and breast cancer: Role, molecular mechanisms and clinical impact. **Cancer Treatment Reviews** 38- 689–697, 2012.

Freitas, L. B. O.; Armini, F. R.; Pereira, G. R.; Brondi, R. A.; Freitas, R. P. The “Click” Reaction In The Synthesis Of 1,2,3-Triazoles: Chemical Aspects And Applications. **Quim. Nova**, v.34, p.1791-1804, 2011.

Fukumasu, H.; Latorre, A. O.; Bracci, N.; Górniak, S. L.; Dagli, M. L. Z. Possible herb-drug interactions in cancer treatment. **Brazilian Journal of Toxicology**, v. 21, n.2, p. 49-59, 2008.

Fujii, H.; Honoki, K.; Tsujiuchi, T.; Kido, A.; Yoshitani, K.; Takakura, Y. Sphereforming stem-like cell populations with drug resistance in human sarcoma cell lines. **Int. J. Oncol.** v.34 p1381–1386, 2009.

Hall, I. H.; Scoville, J. P.; Reynolds, D. J. et al. Substituted cyclic imides as potential anti-gout agents. **Life Sciences**, v. 46, p. 1923-1927, 1990.

Huryn, D. M. Drug Discovery in an Academic Setting: Playing to the Strengths. **ACS Med. Chem. Lett.** v.4, p.313–315, 2013.

Gajare, S. P; Mahajan, S. S. Qsar Studies Of Phthalimide Derivatives For Their Potent Anxiolytic Activity. **Int J Cur Res Rev**, v.04 (22) p.151, 2012.

Gaikwad, K, V.; Gaikwad, S. V.; Jadhav, S. B.; Rathod, S. D. Synthesis of some novel chalcones of phthalimidoester propossessing good antiinflammatory and antimicrobial activity. **India Journal of Chemistry**, v.49, p.131-136, 2010.

Giordano, S. H. et al. **Cancer**. v.100(1): p44-52, 2004.

Gorczyca, W; Gong, J. Ardelt, B. The cell cycle related differences in susceptibility of HL-60 cells to apoptosis induced by various antitumor agents. **Cancer Research**. v.73, p.3192, 1999.

Ghosh, N.; Chaki, R.; Mandal, V.; Mandal, S. C. COX-2 as a target for cancer chemotherapy. **Pharmacological Reports**. v.1, p.233-244, 2010.

Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Elsevier Inc. Cell** 144, March 4, 2011.

Hanahan, D.; Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.

Holemann, A.; Seeberger, P. H. “Carbohydrate diversity: synthesis of glycoconjugates and complex carbohydrates,” **Current Opinion in Biotechnology**, v.15, p.615–622, 2004.

Hursting, S. D. et al. Mechanism-Based Cancer Prevention Approaches: Targets, Exemples, and the Use Of Transgenic Mice. **J. Natl. Cancer Inst.**, v91, p215-225, 1999.

Huryn, M. D. Drug Discovery in an Academic Setting: Playing to the Strengths. **ACS Medicinal Chemistry Letters** , v.4, p.313–315, 2013.

Hynes, N. E.;MacDonald, G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. **Curr. Opin. Cell Biol.** 21, 177–184, 2009.

INCA. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2013.

Jean, S. L.; Paulo, Y. R.; Chung, C. M.; Celio, T. H.; Fernando, P. R.; Clarice, L. Q. Synthesis and in vitro anti mycobacterium tuberculosis activity of a series of phthalimide derivatives. **Bioorg Med Chem** v.17: p.3795–3799, 2012.

Jokobisiak, M.; Lasek, W.; Golab, J. Natural mechanisms protecting against cancer. **Immunology Letters**, v. 90, p 103-122, 2003.

Kirchner, T. et al. Metaplasia, intraepithelial neoplasia and early cancer of the stomach are related to dedifferentiated epithelial cells defined by cytokeratin-7 expression in gastritis. **Virchows Archiv**, v. 439, n. 4, p. 512–522, 2014.

Komorowski, J.; Jerczyn'ska, H.; Siejka, A.; Baran'ska, P.; Lawnicka, H.; Pawaowska, S.; Henryk, S. Effect of thalidomide affecting VEGF secretion, cell migration, adhesion and capillary tube formation of human endothelial EA.hy 926 cells. **Life Sciences** v. 78, p2558–2563, 2006.

Kong, C. M.; Lee, X. W.; Wang, X. Telomere shortening in human diseases. **FEBS J** 280 v.(14), p.3180–3193, 2013.

Kumar, A.; D'Souza, S. S.; Tickoo, S.; Salimath, B. P.; Singh, H. B. Antiangiogenic and proapoptotic activities of allyl isothiocyanate inhibit ascites tumor growth in vivo. **Integr. Cancer Therapy**. v.8, p.75-88, 2009.

Kumar, V.; Abbas, A. K.; Fausto, N. Robbins, S. L., Contran, R.S. Pathology basis of disease. 7ed. **China:WB Saunders**, p.1552, 2004,

Kumar, V.; Abbas, A. K.; Fausto, N. Bases Patológicas das Doenças. 7. **Rio de janeiro: Elsevier** , 2005.

Lim, J. W.; Kim, H.; Kim, K. Hh. Nuclear factor-kappaB regulates cyclooxygenase-2 expression and cell proliferation in human gastric cancer cells. **Lab Invest**; v. 81, p.349-360, 2001.

Lopez-Girona, A.; Mendy, D.; Ito, T.; Miller, K.; Gandhi, A. K.; Kang, J.; Karasawa, S.; Carmel, G.; Jackson, P.; Abbasian, M.; Mahmoudi, A.; Cathers, B.; Rychak, E.; Gaidarova, S.; Chen, R.; Schafer, P. H.; Handa, H.; Daniel, T. O.; Evans, J. F.; Chopra, R. Cereblon is a direct protein target for immunomodulatory and antiproliferative activities of lenalidomide and pomalidomide. **Leukemia**, 26, 2326–2335, 2012.

Martines, M. A. U.; Davolos, M. R.; Júnior, M. J. O efeito do Ultra-som em Reações Químicas. **Química Nova**, 23, 251, 2000.

Mitsiades N.; Mitsiades C. S.; Poulaki V.; Chauhan, D.; Richardson, P.G, et al. Apoptotic signaling induced by immunomodulatory thalidomide analogs in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. **Blood** 99: 4525–4530, 2002.

Montanari, C. A.; Bolzani, V. S. Drug Design Based On Natural Products. **Química Nova**, v.24, p.105-111, 2001.

Monteiro, H. A. V.; Goulart-Citrangulo, S. M. T.; Leite, M. S.; Giacomini, L. C.; Vianna-Jorge, R. Influence of Clinicopathological Variables on the Efficacy of Neoadjuvant Chemotherapy of Breast Cancer. **Revista Brasileira de Cancerologia**; v. 59(3) p369-377, 2013.

Mady, E. A. Antitumor and biochemical effects of Echis coloratus venom on Ehrlich ascite carcinoma cells in vivo. **Journal of Veron animals Toxins**. v.8, p.283-296, 2002.

Malet-Martino M.; Martino, R. Clinical studies of three oral prodrugs of 5-fluorouracil (capecitabine, UFT, S-1): a review. **Oncologist**, v.7(4): p288-323, 2002sical and psycho.

Najda-Bernatowica, A.; Łebka, M.; Orzeszko, A.; Kopanska, K.; Ewa, K.; Grazyna, M.; Bretner, M. Synthesis of new analogs of benzotriazole, benzimidazole and phthalimide—potential inhibitors of human protein kinase CK2. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** v.17, p.1573–1578, 2009.

Pal, S.; Choudhuri, T.; Chattopadhyay, S.; Bhattacharya, A.; Datta, G. K.; Das, T. Mechanisms of curcumin-induced apoptosis of Ehrlich's ascites carcinoma cells. **Biochemistry and Biophysics Research Commom.** v.288, p.658-665, 2001.

Palermo-Neto, J.; Massoco, C. O.; Favare, R. C. Effects of maternal stress on anxiety levels, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Neurotoxicology and terantology.** v.23, p.497-507, 2001.

Palermo-Neto, J.; Massoco, C. O.; Souza, W. R. Effects of physical and psychological stressors on behavior macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Brain Behavior Immunology.** v.17, p.43-54, 2003.

O'Brien, C. S.; Farnie, G.; Howell, S. J.; Clarke, R.B. Are stem-like cells responsible for resistance to therapy in breast cancer. **Breast Dis.** v.29 p83–89, 2008.

Olson, M. F.; Marais, R. Ras protein signalling. **Seminars in Immunology**, v. 12, p. 63-73, 2000.

Parkin, D. M.; Ferlay, J.; Bray F.; Pisane, P. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. **Globocan**, 2001.

Parsons-Wingenter, P.; Elliott, K. E.; Farr, A. G.; Radhakrishnan, K.; Clark, J.I.; Sage, E. H. Generational Analysis Reveals that TGF- β 1 Inhibits the Rate of Angiogenesis *in Vivo* by Selective Decrease in the Number of New Vessels. **Microvascular Research** v.59, p.221–232, 2000.

Piana, S. et al. Papillary thyroid microcarcinoma with fatal outcome: evidence of tumor progression in lymph node metastases: report of 3 cases, with morphological and molecular analysis. **Human Pathology**, v. 44, n. 4, p. 556–65, 2013.

Qi L.; Xu, Z. In vivo antitumor activity of chitosan nanoparticles. **Bioorganic Med. Chem. Leteres.** v.16, p.4243-4245, 2006.

Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M. **Farmacologia.** 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

Reitz, A. B. Future Horizons in Drug Discovery Research. **ACS Med. Chem. Lett.** v.3, p.80–82, 2013.

Richardson, M. A.; Sanders, T.; Palmer, J.L.; Greisinger, A.; Singletary, S.E. Complementary/alternative medicine use in comprehensive cancer center and the implications oncology. **Journal of Clinical Oncology**, v. 18, p. 2505-2514, 2000.

Rocha, B. A.; Lopes, R. M.; Schwartzmann, G. Natural product in anticancer therapy. **Pharmacology**, v. 1, p. 364-369, 2001.

Roque, V. M. N.; Forones, N. M. Avaliação da qualidade de vida e toxicidades em pacientes com câncer colorretal tratados com quimioterapia adjuvante baseada em fluoropirimidinas. **Arq Gastroenterol** v. 43 – no.2, 2006.

Rudd, P. M.; Elliott, T.; Cresswell, P.; Wilson, I. A.; Dwek, R. A.; **Science**, v.291, p.2370-2376, 2001.

Shabel, F. Qualitative evolution of anticancer agent activity in experimental animals. **Pharmacology and Therapeutics**. v.1, p.411-435, 1977.

Silveira, G. P.; Faruk, N.; Gesser.; J. C.; Mandolesi, M. S. Recent Achievements To Combat Bacterial Resistance. **Quimica Nova**, v.29, p.844-855, 2006.

Sofia, M. J. **Drug Disc. Today**, v.1, p.27-34, 1996.

Stefani, H. A.; Ferreira, F.P.; Bakhat, A.; Pimenta, D. C. Synthesis of Functionalized N-Triazolyl Maleimides. **Tetrahedron letters**, 2009.

Subhashini, J; Mahipal, S V K; Reddanna, P. Anti-proliferative and apoptotic effects of celecoxib on human chronic myeloid leukemia *in vitro*. **Cancer Letters**, Europa, p.31-43, 2005.

Varski, A. **Glycobiology**, v.3, p.701-710, 1993.

Voulgari, A.; Pintzas, A. Epithelial–mesenchymal transition in cancer metastasis: Mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. **Biochimica et Biophysica Acta** 75–90, 2009.

Xia, Y.; Li, W.; Qu, F.; Fan, Z.; Liu, X.; Berro, C.; Rauzy, E.; Peng, L. **Organic biomolecular chemistry**., 5, p. 1695, 2007.

Wang, W.; Bi, X.; Xing, S.; Fang, Z.; Ming, X.; Zhang, Q.; Liu, Q.; Ji, Y. One-pot synthesis of pillar[n]arenes catalyzed by a minimum amount of Tf₂O and a solution-phase mechanistic study. **Green Chemistry**, v.13, p.562-565, 2011.

Waris, G.; Siddiqui, A. Hepatitis C virus stimulates the expression of cyclooxygenase-2 via oxidative stress: role of prostaglandin E2 in RNA replication. **Journal of Virology**. v. 79, n. 15, p. 9725-9734, 2005.

Witsch, E.; Sela, M.; Yarden, Y. Roles for growth factors in cancer progression. **Physiology (Bethesda)** 25, 85–101, 2010.

5 ARTIGO

Artigo: Atividade Antitumoral e Anti-Inflamatória de Ftalimidas Glicoconjugadas



Artigo para submissão ao periódico *Anti-Cancer Drugs* no formato *Original Research Article* (FI: 2.232; QUALIS CB II: B1).

**ATIVIDADE ANTITUMORAL E ANTI-INFLAMATÓRIA DE FTALIMIDAS
GLICOCONJUGADAS**

Silva Júnior, J. G¹; Assis, S. P. O²; Silva, M.T³; Oliveira, R.N³; Lima, V.L.M¹

¹ Laboratório de Lipídeos e Biomoléculas e suas Aplicações em Doenças Prevalentes e Negligenciadas, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

² Universidade Católica de Pernambuco-UNICAP, Brasil.

³ Laboratório de Síntese de Compostos Bioativos (LSCB), Departamento de Ciências Moleculares, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil.

*Autor para Correspondência

Laboratório de Lipídeos e Biomoléculas e suas Aplicações em Doenças Prevalentes e Negligenciadas, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. Avenida Professor Moraes Rego, s/n, Bairro:

Cidade Universitária, CEP 50670-420, Recife-Pernambuco, Brasil, 55 8121268540 (218), e-mail: vlml@ufpe.br

Resumo

A síntese química das ftalimidas glicoconjugadas com triazóis (1A, 1B e 1C) foi obtida através da reação de cicloadição 1,3-dipolar. A citotoxicidade *in vitro* utilizando o método colorimétrico de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) segundo o *National Câncer Institute (NCI)*. A atividade anti-tumoral *in vivo* em camundongos foi dividida em 5 grupos. O grupo controle negativo que recebeu Carboximetilcelulose 1%, grupo controle positivo 5-Fluoruracil e os grupos tratados com as ftalimidas 1A, 1B e 1C durante sete dias. A dose utilizada foi de 20mg/kg/dia. No oitavo dia os animais foram sacrificados e obtidos amostras de sangue para análise do hemograma e os tumores para avaliação histológica. As avaliações foram feitas frente ao Carcinoma de Eherlich e ao Sarcoma 180. Foi realizado o ensaio antiinflamatório por peritonite também na dose 20mg/Kg. Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, com um intervalo de confiança de 95%, as diferenças estatísticas foram acessados por ANOVA. Os resultados obtidos na citotoxicidade *In vitro* demonstraram que compostos sintetizados apresentaram baixa percentagem de inibição do crescimento das células NCIH 292, HL60 e MCF-7 (>20). Já na atividade antitumoral *In vivo* com o tumor Ehrlich e Sarcoma 180 os animais tratados com o composto 1A tiveram uma inibição de 63,8% e 70,6% dos tumores, respectivamente, enquanto os tratados com o composto 1B tiveram 62,8% e 62,% e o composto 1C 62% e 64,3% de inibição. Os compostos 1A, 1B e 1C apresentaram boa atividade Anti-inflamatória. Os resultados obtidos demonstraram potente atividade antitumoral e Anti-inflamatória dos glicoconjugados de ftalimidas.

Palavras chaves: Ftalimidas, Gliconjugados, Atividade antitumoral, Atividade anti-inflamatória.

1. Introdução

As neoplasias são um conjunto de mais de 150 doenças decorrentes do crescimento descontrolado de células que possuem capacidade invasiva (metástase) para diversas partes do organismo. O rápido crescimento dessas células aumenta a gravidade dessas doenças, que formam os tumores, massas de células cancerígenas que ocasionam diversos transtornos funcionais [1-2].

Os compostos sintéticos correspondem a uma importante fonte de substâncias utilizadas no tratamento de neoplasias, inclusive tem sido tema de inúmeros estudos para obtenção de compostos farmacologicamente ativos contra o câncer. Na última década, a química medicinal sintética alcançou um crescimento vertiginoso no cenário da terapêutica de várias doenças. Os fármacos sintéticos correspondem a 85% dos medicamentos hoje disponíveis e isso tem intensificado constantemente a busca, identificação e o planejamento por novas moléculas biologicamente ativas [3].

Nos últimos anos a incidência de novos casos de câncer tem se tornado cada vez maior, o que tem promovido um crescimento pujante e urgente pelo desenvolvimento de compostos antineoplásicos mais eficientes e com uma faixa terapêutica mais segura. Nesse seguimento a síntese química tem desempenhado um papel fundamental na busca por novos grupos farmacológicos contra o câncer, principalmente por ser um processo rápido e não enfrentar dificuldades como a sustentabilidade, o oferecendo uma gama de substância de utilidade terapêutica [4-5].

As Ftalimidas fazem parte da classe química das imidas cíclicas, um importante grupo de compostos orgânicos que apresentam natureza hidrofóbica e capacidade de atravessar as membranas celulares [6]. Ftalimidas em geral têm demonstrado segundo a literatura excelentes atividades biológicas, como anticonvulsivante, analgésica, antimicrobiana, hipolipidêmica e antitumoral [7-10]. Essa classe de compostos tem despertado grande interesse científico principalmente devido a sua versatilidade estrutural, assim como também possíveis modificações nessa estrutura, sendo possível com isso potencializar a atividade biológica e/ou diminuir a toxicidade desses compostos,

para que os mesmos atuem cada vez mais de forma seletiva em alvos moleculares e enzimáticos [11-12].

As Ftalimidas têm despertado grande interesse de inúmeros estudos atualmente, principalmente aqueles voltados ao esclarecimento e tratamento de processos anti-inflamatórios e antitumorais [14-16]. O estudo da atividade anti-proliferativa *in vitro* utilizando linhagens celulares cancerígenas é atualmente muito utilizado, por apresentar vantagens como a avaliação de diversas substâncias em um período curto de tempo [17]. A utilização de modelos animais também tem sido amplamente utilizada na pesquisa de novos compostos antineoplásicos, por permitirem a avaliação de intempéries, como luz, temperatura e umidade. Por tanto esse estudo tem como objetivo sintetizar e avaliar a atividade antitumoral e anti-inflamatória de ftalimidas glicoconjugadas *in vitro* e *in vivo*, como promissores grupos farmacofóricos para o tratamento do câncer.

2. Materiais e Métodos

2.1 Síntese Química

Os métodos de síntese química apresentados foram organizados em três etapas consecutivas, em uma via de síntese convergente [18].

2.2 Síntese do glicosídeo 2,3-insaturado (3)

Ao composto comercial D-Glucal (Sigma) e ao Álcool Propargílico foi adicionado o solvente diclorometano. A mistura reacional foi refluxada após adição de do catalizador Montmorillonite K-10 (30 % p/p de 2). O final da reação foi acompanhado em placas de cromatografia de camada delgada (CCD) até o desaparecimento do composto de partida, em sistema diclorometano. Após a reação a mistura foi filtrada e o solvente rotaevaporado e o óleo obtido submetido à coluna cromatográfica de sílica gel, obtendo-se o produto puro em sistema ciclohexano: acetato de etila (9:1).

2.3 Síntese das N-[n(azidas)alquil]ftalimidas (n=2, 3 e 4) (2a-c)

2.3.1 Síntese da N-[2-(azido)etil]ftalimida (2a)

Em um erlenmeyer foi transferido anidrido ftálico e etanolamina. A mistura foi aquecida a 150°C por 30 minutos. Depois, o produto obtido foi cristalizado. Ao álcool ftalimidico obtido na 1ª etapa, foi adicionado HBr 48%. A reação foi então deixada sob

refluxo. Depois do fim da reação o produto foi lavado com água e extraído com diclorometano. A fase orgânica foi lavada com solução saturada de bicarbonato de potássio e em seguida tratada com sulfato de sódio anidro. Após evaporação do solvente foi obtido o produto correspondente *N*-[2-(bromo)etil]ftalimida.

A *N*-[2-(bromo) etil]ftalimida obtida anteriormente foi adicionado o solvente Dimetilformina (DMF) e azida de sódio. O produto foi lavado com água e extraído com acetato de etila. A fase orgânica foi tratada com sulfato de sódio anidro e o solvente retirado no rota-evaporador.

2.3.2 Síntese da *N*-[3-(azido)propil]ftalimida (2b)

N-[3-(bromo)propil]ftalimida foi dissolvida em DMF. Então, adicionou-se azida de sódio. A reação foi deixada por 24h sob agitação a temperatura de 60°C sob atmosfera inerte de N₂. A reação foi acompanhada e confirmada por CCD. Após o fim da reação o produto foi lavado com água destilada e extraído com acetato de etila. A fase orgânica foi tratada com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado.

2.3.3 Síntese da *N*-[4-(azido)butil]ftalimida (2c)

N-[4-(bromo)butil]ftalimida foi dissolvida em DMF. Então, foi adicionado azida de sódio. A reação foi deixada por 24h sob agitação a 60°C sob atmosfera de N₂. O final da reação foi confirmado por CCD. A mistura foi lavada com água e depois extraída com acetato de etila. A fase orgânica então foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente retirado à pressão reduzida em rota-evaporador.

2.4 Síntese dos glicoconjugados de ftalimidas com triazóis (1A-C)

Ao composto (3) foi adicionado diclorometano seco. Foi adicionado iodeto de cobre, sendo acrescentado em seguida a azida (2a-c). A reação ficou sob agitação em uma atmosfera de argônio por 24 horas a temperatura ambiente. Após, transcorrido o tempo da reação, foi realizada CCD com um sistema de eluição hexano: acetato de etila (7:3), para comprovar o final da reação.

2.4.1 Metil-[1, 2, 3]-triazol-1-il-*N*-ftalimidoetil 4,6-di-O-acetil-2,3-dideoxi- α -D-eritro-hex-2-enopiranosídeo (1A)

Para purificação do produto foi realizada uma cromatografia em sílica gel, em que a mistura reacional deverá ser eluída em um sistema hexano: acetato de etila (5:5). As frações foram acompanhadas em CCD e o revelador utilizado foi vanilina. Em seguida, o solvente foi evaporado. O produto foi cristalizado em acetato de etila.

2.4.2 Metil-[1, 2, 3]-triazol-1-il-N-ftalimidopropil 4,6-di-O-acetil-2,3-dideoxi- α -D-eritro-hex-2-enopiranosídeo (1B)

Para purificação do produto foi realizada CCD, sendo utilizado o produto dissolvido em acetato de etila e, em seguida, aplicado na placa preparativa, utilizando pipeta de Pasteur. O sistema de eluição foi hexano: acetato de etila (5:5). Após eluição e revelação sob luz UV, o material foi raspado, colocado em béquer e extraído em acetato de etila após filtração a vácuo, o solvente foi evaporado fornecendo o produto.

2.4.3 Metil-[1, 2, 3]-triazol-1-il-N-ftalimidobutil 4,6-di-O-acetil-2,3-dideoxi- α -D-eritro-hex-2-enopiranosídeo (1C)

Para purificação do produto foi realizada uma cromatografia em sílica gel, em que a mistura reacional foi eluída em um sistema hexano: acetato de etila (5:5). As frações foram ser acompanhadas em CCD e utilizado vanilina como revelador. Em seguida, o solvente foi evaporado. O produto foi cristalizado em acetato de etila.

2.5 Avaliação da Citotoxicidade

O estudo da atividade citotóxica foi realizado pelo método de cultura de tecidos com células de linhas contínuas em fase exponencial de crescimento. As células foram mantidas em meio DMEM e suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO), 1% de solução de antibiótico (penicilina 1000 UI/mL + estreptomicina 250 mg/mL) e 1% de L-glutamina 200 Mm (Santos et al., 2005). A viabilidade celular foi determinada utilizando o corante vital Azul de Tripan 0,4% p/v, em PBS. Uma suspensão celular (10^5 células/mL) foi distribuída em placa de cultura com 96 poços (220 μ L/ poço). As placas ficaram incubadas a 37 °C em estufa (Sedas, Milão-Itália), com atmosfera úmida enriquecida com 5 % de CO₂. Após 24h de incubação os compostos sintetizados foram adicionados à placa de cultura (22 μ L/poço) em diferentes concentrações (25 e 50 μ g/mL. Foram utilizados controles negativos com DMSO e positivo com o antineoplásico Doxorubicina durante o procedimento. 72 h após o tratamento, os efeitos citotóxicos das amostras testes foram avaliados de acordo com o protocolo do *National Cancer Institute*

(NCI), utilizando o método colorimétrico do sal tretazólico MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio).

Foi realizada a leitura das absorbâncias em leitor de placa de Elisa, no comprimento de onda de 490nm. A média das absorbâncias do controle negativo foi tida como 100% de viabilidade celular e com isso os resultados foram avaliados de acordo com a inibição da proliferação celular em relação ao controle negativo. Os resultados foram expressados pela média $\pm$ o D.P.

2.6 Avaliação da Toxicidade Aguda

Doses graduadas (50-1000 mg / kg) foram administrados oralmente em 5 camundongos por grupo (US Environmental Protection Agência 1992). No primeiro dia, os animais foram observados a cada 10 minutos durante 4 horas, seguido de duas observações ao dia após a administração de 24h, 48h, 72h, para alterações na atividade motora espontânea, reflexo, marcha, respiração, contorções e piloereção acrescido de mortalidade.

2.7 Atividade Antitumoral

2.7.1 Animais

Para a avaliação da atividade antitumoral foram utilizados camundongos albinos swiss (*Mus-musculus*) machos, com idade entre 35 a 60 dias e peso médio de 30,0g, oriundos do Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami-Lika-UFPE. Os animais foram mantidos à temperatura ambiente a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, em ciclo dia/noite natural (12h luz e 12h escuro), com livre acesso de água e alimento. Esta pesquisa recebeu a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (Of. nº 098/2002).

2.7.2 Delineamento da Atividade Antitumoral in vivo

Foram utilizados o Sarcoma 180 e o Carcinoma de Ehrlich como modelos de tumores experimentais, provenientes do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Os tumores foram cedidos na forma ascíticas e mantidos em camundongos albinos swiss machos, e a cada sete dias era realizada a manutenção dos mesmos. As células tumorais foram implantadas através de via subcutânea (s.c) na região

axilar direita dos camundongos na concentração de $2,5 \times 10^8$ células ml⁻¹ desenvolvendo assim os tumores na sua forma sólida.

Após 24 da implantação dos tumores foi iniciado o tratamento dos animais que teve duração de sete dias seguidos. Foram utilizados 40 animais para cada tipo de tumor, cada grupo experimental foi composto por 8 animais. Os animais receberam soluções contendo as Ftalimidas Glicoconjugadas na concentração de 20mg/Kg/dia de peso do animal através de injeções intraperitoneais. As Ftalimidas foram preparadas em solução de Carboximetilcelulose 1% (CMC 1%) com água deionizada. Os animais do controle negativo receberam apenas a solução de CMC 1% e o controle positivo recebeu o quimioterápico 5-Fluorouracil (*Sigma Aldrech*) em condições iguais.

Um dia após o fim do tratamento, os animais foram anestesiados com urethane (1,25g/kg) e coletadas amostras de sangue por punção cardíaca para as análises hematológicas do hematócrito, leucograma e número total de hemácias. Consecutivamente os animais foram sacrificados com overdose do anestésico. Foi realizada a retirada dos tumores, dissecados e pesados e posteriormente encaminhados para a análise histopatológica. A inibição tumoral foi determinada a partir do peso médio dos grupos de animais tratados em relação ao grupo controle não tratado. A avaliação da inibição tumoral (TWI%) foi realizada através do cálculo: $TWI = C - T / C \times 100$, onde C: é a medida do peso dos tumores do grupo controle negativo e T: é a média dos pesos dos tumores dos animais tratados. Foram desconsiderados tumores com pesos iguais ou menores do 0,39g denominados “no-takes”.

2.7.3 Análise Histopatológica

Os tumores foram mantidos em solução tamponada de formalina a 10%. Posteriormente foram realizadas as inclusões em parafina e os cortes (4 µm) da amostra, fixados em Hematoxilina e corados em Eosina (HE) e analisados em microscópio óptico (Olympus BH-2, Japan).

2.7.4 Atividade Anti-inflamatória

A peritonite foi induzida a partir de uma injeção intraperitoneal de carragenina nos animais, 1 hora após o tratamento com a carragenina, os animais do grupo controle receberam ácido acetilsalicílico e os testes receberam respectivamente as fthalimidas 1A, 1B e 1C. Após 4 horas os animais foram sacrificados para coleta do líquido peritoneal.

Para preservação dos leucócitos contidos no líquido peritoneal, foi injetada uma solução de salina 0, 9% contendo EDTA (1mM) nos animais sacrificados. Para contagem das células foi utilizado um contador de célula automático (ABX MICROS 60).

2.7.5 Análise Estatística

Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, com um intervalo de confiança de 95% e as diferenças estatísticas entre os grupos foram acessadas através da análise de variância one-way ANOVA seguido de testes de Turkey. $P < 0,05$ análises significantes. As análises foram realizadas no software Prisma (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, versão 5.01).

3. Resultados

3.1 Caracterização dos compostos

Os compostos foram preparados e a estrutura foi identificada por análise espectroscópica ^1H e ^{13}C RMN e comparada com dados da literatura, de acordo com Assis et al, 2012; Barbosa; Oliveira (2011). A pureza dos compostos foi atestada em um HPLC-DAD Shimadzu Prominence Model. O esquema geral de síntese está ilustrado na Figura 1.

O composto N-[2-(azidoetil)]ftalimida (1A) apresentou rendimento de 75%, estado sólido e Ponto de Fusão (Mp) de 60-61 $^{\circ}\text{C}$.

O composto N-[3-(azidopropil)]ftalimida (1B) teve rendimento de 76%, estado sólido e Ponto de Fusão (Mp) de 40 $^{\circ}\text{C}$.

O composto N-[4-(azido)butil]ftalimida (1C) apresentou rendimento de 70%, estado sólido e Ponto de Fusão (Mp) de 45-48 $^{\circ}\text{C}$.

3.2 Avaliação da Citotoxicidade

A citotoxicidade dos compostos 1A, 1B e 1C estão apresentadas na Figuras 2 e 3 com seus percentuais de inibição. Foram testadas nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ em culturas de células NCIH 292 (carcinoma pulmonar), HL60 (leucemia promielocítica) e MCF-7 (câncer de mama), em placas de cultura com 96 poços, a 37 $^{\circ}\text{C}$, por 72 h utilizando o método colorimétrico de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) de acordo com o protocolo do *National Cancer Institute* (NCI).

Os resultados mostraram que o composto 1A foi capaz de inibir o crescimento da linhagem NCIH 292 em 22,2% e 28% para a linhagem MCF-7 na dose de 25 µg/mL. Na dose de 50 µg/mL o composto 1A inibiu o crescimento das respectivas linhagens em 27% e 29,4%. Já o composto 1B inibiu na dose de 25 µg/mL as linhagens NCIH 292 e MCF-7, respectivamente em 22,6% e 24,2% e na dose de 50 µg/mL a inibição foi de 28,3% e 27,4% para as duas linhagens. O composto 1C promoveu uma inibição de 23,9% e 26,5% para essas respectivas linhagens também na dose de 25 µg/mL e de 32,1% e 28,8% na dose de 50 µg/mL para NCIH 292 e MCF-7, respectivamente.

Nenhum dos compostos testados apresentou percentual de inibição para a linhagem celular HL 60. O composto Doxorrubicina, fármaco amplamente utilizado na quimioterapia contra o câncer, foi utilizado como controle positivo e apresentou inibição de 100% para as linhagens NCIH 292 e HL 60 e 86,3% para MCF-7 para a dose de 25 µg/mL. Na dose de 50 µg/mL a inibição foi de 86,1%, 93,7% e 67,7% para as respectivas linhagens.

3.3 Toxicidade aguda

Nenhuma das doses testadas (50-1000 mg/Kg) apresentou toxicidade nos animais, não havendo morte dos mesmos, como demonstrado na Tabela 1, e ausência identificações de alterações comportamentais como mudanças no comportamento motor, marcha, respiração, contorções ou piloereção.

3.4 Atividade Antitumoral in vivo

Os animais tratados com os glicoconjugados de ftalimidas (1A, 1B e 1C) na concentração de 20,0 mg/kg/dia foram monitorados e avaliados sinais físicos e comportamentais, decorridos os tempo 30, 60, 90 e 120 minutos. Durante a observação dos animais, não foram observadas reações incomuns, como: respiração ofegante, tremores ou piloereção. Assim como os grupos tratados com glicoconjugados, os controles negativos (CMC %) e positivo (5-FU) apresentaram comportamento normal.

3.4.2 Avaliação do peso médio dos animais com os tumores após 7 dias de tratamento

Foram mensurados o peso de todos os animais da experimentação após sete dias de tratamento, visando observar possíveis alterações nesse parâmetro, como demonstrado nas Fig 4 e Fig 5. Os animais não apresentaram mudanças significativas do peso corporal

de um mesmo grupo. As pequenas diferenças de massa corporal de animais submetidos a tratamento diferentes foram em virtude da forma como os mesmos foram organizados nos grupos, onde os camundongos de pesos similares foram introduzidos no mesmo grupo, o que não reflete erros, visto que a dose utilizada no tratamento foi de acordo com o peso dos camundongos e por tanto o tratamento foi dose/peso dependente.

3.4.3 Média dos pesos dos tumores e inibição tumoral frente ao Carcinoma de Ehrlich e ao Sarcoma 180

Após os sete dias de tratamento foi avaliado o peso dos tumores (Fig6 e Fig7) e a inibição tumoral (Fig 8) nos animais implantados com Carcinoma de Ehrlich e com Sarcoma 180 comparando os diferentes grupos: controle positivo (5-FU) e controle negativo (CMC 1%) e os tratados com os glicoconjugados de ftalimidas (1A, 1B e 1C). Foi observado no grupo tratado com o 5-Fluoruracil a menor média do peso tumoral, seguido pelos animais tratados com os compostos 1A, 1B e 1C, observando valores próximos entre esses grupos.

A média da massa tumoral dos animais que receberam apenas o veículo de administração CMC 1% (controle negativo) foi em gramas de $2,1 \pm 0,1$ para o Carcinoma de Ehrlich e de $1,6 \pm 0,18$ para o Sarcoma 180. Já os animais tratados com os glicocojugados de ftalimidas 1A, 1B e 1C apresentaram uma massa tumoral em gramas de $0,78 \pm 0,17$, $0,79 \pm 0,15$ e $0,79 \pm 0,08$ para o Carcinoma de Ehrlich, respectivamente, e $0,47 \pm 0,03$, $0,61 \pm 0,04$ e $0,57 \pm 0,04$ frente ao Sarcoma 180, respectivamente. Já os grupos tratados com o 5-Fluoruracil apresentaram média da massa tumoral de $0,5 \pm 0,16$ pra o tumor de Ehrlich e $0,4 \pm 0,04$ pra o Sarcoma 180. Através desses resultados pode se observar que os compostos glicoconjugados de ftalimidas apresentaram boa capacidade inibição da massa tumoral.

3.4.4 Avaliação da Inibição tumoral de camundongos swiss implantados com tumores experimentais Carcinoma de Ehrlich e Sarcoma 180 tratados com os glicoconjugados de ftalimidas 1A, 1B e 1C.

Em relação à inibição tumoral o quimioterápico 5-FU apresentou 76,6% de inibição do Carcinoma de Ehrlich e 76,8% frente ao Sarcoma 180. Já o composto 1A promoveu uma inibição de 63,8% e 70,6% frente aos respectivos tumores. O composto

1B foi capaz de inibir em 62,8 % e 62% respectivamente, enquanto o composto 1C inibiu em 62% e 64,3% o Carcinoma de Ehrlich e o Sarcoma 180 (Fig 8).

Os glicoconjugados de ftalimidas 1A, 1B e 1C demonstraram boa atividade antitumoral de acordo com os protocolos do National Câncer Institute (NCI), que preconiza como satisfatório os resultados de inibição tumoral superiores a 60%, o que foi observado entre os compostos testados, sendo o composto 1A o que apresentou melhor atividade antitumoral frente aos dois tipos de tumores.

3.4.5 Avaliação do peso médio de Rins, Fígado e Baço e determinação de parâmetros Hematológicos

Foram mensurados os pesos de rim, fígado e baço dos animais tratados e dos grupos controles, como demonstrado na Tabela 2 para o carcinoma de Ehrlich e na Tabela 3 para o sarcoma 180. Não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) desses órgãos em comparação com os grupos controle negativo e controle positivo. Não foram encontradas alterações hematológicas em nenhum dos grupos analisados.

3.4.6 Atividade Anti-inflamatória

O ensaio antiinflamatório por peritonite analisa a migração leucocitária, por meio da contagem dos leucócitos que estão no exsudado presente na cavidade abdominal dos animais testados, após os mesmos serem submetidos a uma dose de carragininina. A administração de carragininina aumentou a migração leucocitária na cavidade peritoneal do grupo tratado com CMC 1% ($11,4 \pm 0,6$). Os compostos 1A, 1B e 1C mostraram-se capazes de reduzir o número de leucócitos do líquido peritoneal formado na cavidade dos animais em ($4,7 \pm 0,9$; $5,4 \pm 0,5$; $5,4 \pm 0,8$ leucócitos $\times 10^3/\text{mm}^3$, respectivamente). O Ácido Acetilsalicílico utilizado como controle positivo também apresentou um elevado percentual de inibição do número de leucócitos do exsudado peritoneal ($4,1 \pm 0,5$ leucócitos $\times 10^3/\text{mm}^3$) (Fig. 9).

3.4.7 Avaliação Histopatológica:

3.4.7.1 Análise histológica do Sarcoma 180

De forma geral em todos os grupos foram encontradas células poligonais, exibindo pleomorfismo celular (atipia celular), com características de invasão denotada pela

presença de anisocariose (acentuada diferença entre os tamanhos dos núcleos). A neoplasia apresentou considerável índice mitótico, com invasão muscular e presença de áreas de necrose de coagulação e em alguns achados observa-se hemorragia. Figura XX

3.4.7.2 Análise histológica do Carcinoma de Ehrlich

As células tumorais apresentaram-se pleomórficas, atípicas e arredondadas. Observou também, infiltrado inflamatório pelo parênquima tumoral e presença de células em apoptose, com redução no tamanho (picnose), cromatina condensada e algumas com um halo branco em volta (anoiquia) (Fig. 10; 11;12;13).

4. Discussão

a. Citotoxicidade

De acordo com a metodologia utilizada, são consideradas antiproliferativas as substâncias que apresentam valores de inibição acima de $\geq 75\%$, esse *cut-off* credencia a substância a ser incluída no screening de compostos com atividade antitumoral segundo o protocolo do *National Cancer Institute* (NCI). Segundo esse protocolo compostos com ação antiproliferativa entre 20 e 50% apresentam pouca atividade antitumoral *in vitro*, o que foi observado nos compostos testados, não apresentando por tanto citotoxicidade nessa metodologia *in vitro*.

Porém, muitos compostos ftalimidicos são relatados na literatura com atividade antitumoral [10; 19-21]. Os dados da literatura levam a hipótese de que esse glicoconjugados de ftalimidas possuem atividade antitumoral, o que foi demonstrado nos ensaios *in vivo*, relacionada a mecanismos que não podem ser avaliados em ensaios *in vitro*, como inibição da angiogênese, um mecanismo de fundamental importância para o crescimento tumoral, sobre o microambiente do tumoral, ou ainda sobre o a transição epitélio-mesênquimal (EMT-*epithelial-mesenchymal*) processo em que as células epiteliais sofrem mudanças na sua polarização e com isso passam por modificações bioquímicas e morfológicas, ganhando com isso capacidades migratória e invasiva, além de resistência apoptose [22, 25].

4.2 Atividade Antitumoral In Vivo

Os compostos testados (1A, 1B e 1C) apresentaram-se como potentes inibidores do Carcinoma de Ehrlich e do Sarcoma 180, promovendo uma regressão tumoral nos animais. Esses resultados corroboram com outros trabalhos da literatura, que demonstraram excelentes atividades antitumoral de ftalimidas com seus respectivos derivados [21; 24-26], como o estudo utilizando membrana corioalantóide (CAM – *corioalantoic membrane assay*) de *Gallus gallus domesticus*, observaram que derivados de ftalimidas com benzotiazol foram capazes de bloquear a angiogênese nos embriões, assim como o composto utilizado como controle positivo a Talidomida, uma ftalimida que tem sido amplamente utilizada no tratamento do Mieloma Múltiplo [19]. O bloqueio da angiogênese tem sido um dos principais alvos de estudos que buscam desenvolver novas moléculas antineoplásicas e os compostos testados, por apresentarem a ftalimida como um dos seus grupos farmacofóricos, pode estar atuando inibindo esse processo de nova vascularização. Esses compostos ftalimidicos podem ter suprimido fatores angiogênicos que são comuns a muitos cânceres, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento do fibroblasto básico (bFGF), fundamentais para o desenvolvimento de novos vasos e conseqüentemente para a nutrição do tumor [27].

Além da atividade antitumoral, esses compostos (1A, 1B e 1C) demonstraram excelente atividade anti-inflamatória pelo modelo de peritonite, sendo isso um resultado muito positivo também para um melhor efeito antitumoral, pois o processo inflamatório é um sinal fisiológico desencadeador de angiogênese, principalmente pela liberação de citoxinas [29]. Outros estudos também demonstraram a relação direta entre a inibição de fatores inflamatórios, como o Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) e o desenvolvimento do câncer [21]. Esse estudo também demonstrou que compostos derivados de ftalimidas foram capaz de inibir o TNF- α , ação que também pode ter sido promovida pelos compostos aqui testados (1A, 1B e 1C) visto que esses compostos também são imidas cíclicas [21].

A inibição da nova vascularização tem sido alvo de diversos estudos, pois o bloqueio da angiogênese tem se mostrado muito eficiente no tratamento do câncer, principalmente por evitar resistência das células cancerígenas aos antineoplásicos e o processo de metástase. Estudos utilizando compostos com anel triazólico e adicionaram um grupamento metila na posição 3 na estrutura do triazol e observaram que essa molécula foi capaz de inibir a enzima metionina-aminopeptidase, uma enzima muito

importante para o desenvolvimento da angiogênese. O anel triazólico ligou os nitrogênios 1 e 2 na enzima metionina-aminopeptidase, causando sua inativação [29]. Com isso esses compostos triazólicos se apresentam como um grupo farmacofórico no tratamento de neoplasias, o que pode estar relacionado aos compostos (1A, 1B e 1C) que possuem o anel triazólico na sua estrutura química.

4.3 Atividade Anti-inflamatória

Os glicoconjugados de ftalimidas (1A, 1B e 1C) apresentaram excelente atividade Anti-inflamatória no modelo de peritonite o que corrobora com outros estudos que demonstraram derivados ftalimidicos com potente ação anti-inflamatória [30-33]. Fármacos com atividade anti-inflamatória não esteroides são os principais medicamentos utilizados na terapêutica de processos inflamatórios e dor [34-35]. Porém, esses compostos apresentam efeitos adversos, como transtornos gastrointestinais. Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) atuam nas enzimas Ciclooxygenases (COX), que estão envolvidas diretamente na produção de prostaglandinas, que levam a reação inflamatória [36-37].

As ciclooxigenases apresentam duas isoformas, a COX-1 e COX-2, sendo a COX-1 encontrada em maior concentração nos rins e no estômago enquanto a COX-2 está relacionada diretamente com a produção de prostaglandinas através do metabolismo do Ácido Aracônico. Os AINEs, como a Aspirina, Endometacina e o Ácido Acetilsalicílico atuam de forma não seletiva nas isoformas das Ciclo-oxigenases, e por isso ao atuarem na COX-1 promovem as reações adversas no trato gastrointestinal e o efeito anti-inflamatório ao atuarem na COX-2. Além disso esses compostos ligam-se mais fortemente a isoforma COX-1 do que a COX-2, potencializando as reações adversas [38-39].

Com o intuito de prevenir essas reações indesejadas, a busca por novos compostos com atividade Anti-inflamatória visa à síntese de moléculas que possuam a capacidade de inibição seletiva da COX-1 e COX-2. Nesse contexto, as imididas cíclicas, como por exemplos, as ftalimidas, apresentam grande potencial terapêutico, como atividade hipolipidêmica, antitumoral e anti-inflamatória com inibição das Ciclooxygenases [40].

Estudos com sulfonamidas, um grupo de compostos ftalimidicos com átomos de enxofre na molécula, e demonstram uma potente ação anti-inflamatória dessas imidas cíclicas. Esse mesmo estudo, utilizando o Docking study, uma metodologia que permite

estudar a modelagem molecular de compostos utilizando Software, que simulam baseado em bancos de dados possíveis alvos do composto em estudo, avaliou que a ação dessas ftalimidas é seletiva, atuando na COX-2 e por tanto não sendo capaz de promover reações adversas por ligação com a COX-1 [41].

Outro estudo, utilizando derivados ftalimidicos com anel bezil demonstrou que esses compostos foram muito eficientes em inibir seletivamente a COX-2 em animais submetidos a processo inflamatório por carraginata, além de promoverem uma ação analgésica. Esse estudo também utilizou o Docking study, o que permitiu analisar as interações que os derivados ftalimidicos estudados fazem com a enzima COX-2 [42].

A ação Anti-inflamatória dos compostos 1A, 1B e 1C corroboram com outros estudos que utilizaram derivados triazólicos para avaliação Anti-inflamatória. Estudo utilizando 1,2,3 Triazol associado com benzotiazol para avaliar o potencial desses compostos frente ao processo inflamatório em edema de pata induzido por carraginata [43]. O estudo demonstrou que esses compostos foram capazes de reduzir a ação das Ciclooxygenases 1 e 2, inclusive alguns dos derivados 1,2,3 triazol foram mais eficientes nessa inibição do o Ibuprofeno, anti-inflamatório utilizado como controle positivo [43]. Outro estudo sintetizou e avaliou a ação anti-inflamatória de novos benzoxazolinones ligados a 1,2,3-triazol e observaram que esses compostos foram muito eficientes na inibição da COX-2 e do Fator de Necrose Tumoral- Alfa (TNF- α) [44]. Outra pesquisa, também utilizando derivados triazólicos avaliaram a ação da Interleucina 1 β (IL-1 β) e constataram que esses triazóis reduziram significativamente a atividade dessa interleucina, que é de fundamental importância no processo inflamatório, inclusive no aumento da hipersensibilidade inflamatória através da ativação da COX-2 [45].

4.4. Avaliação Histopatológica

Os compostos glicoconjugados de ftalimidas (1A, 1B e 1C) promoveram significativamente uma redução da massa tumoral nos animais tratados com esses compostos. Esses resultados corroboram com outras pesquisas que utilizaram compostos ftalimidicos análogos da Talidomida, contendo átomos de enxofre na sua molécula, que foram utilizados no tratamento de camundongos com carcinoma de Ehrlich [46]. Esse estudo, assim como os resultados aqui descritos, foram encontrados na análise histológica dos tumores sólidos áreas de necrose, indicando a morte das células neoplásicas. Também observamos áreas de apoptose, o que também foi encontrado nesse estudo [46].

Esse mesmo estudo realizou análise imunohistoquímica e observaram um aumento significativo da proteína Fas-, uma proteína transmembranar pertencente à família do Fator de Necrose Tumoral, que quando se liga com o seu receptor induz o processo de apoptose. Esse mecanismo das ftalimidas análogas da Talidomida que promoveu o aumento do índice apoptótico nas células do carcinoma de Ehrlich, ainda pouco elucidado, pode ser também um mecanismo de ação dos compostos ftalimidicos 1A, 1B e 1C levando a um aumento do índice apoptótico também nas células do Sarcoma 180.

A criação de uma nova vascularização, processo conhecido como angiogênese, é fundamental para a proliferação, invasão e metástase tumoral, promovendo um pior prognóstico para o câncer. A inibição desse processo tão fundamental para o crescimento tumoral tem sido alvo de inúmeras terapias, principalmente na intenção de evitar a metástase tumoral por extravasamento das células neoplásicas. A pesquisa com análogos da Talidomida também avaliou o efeito desses compostos sobre a via VEGF, a principal no desenvolvimento da angiogênese e constataram por imunohistoquímica uma diminuição dessa proteína. O VEGF é fundamental para o crescimento de tumores sólidos, sua supressão leva a um menor aporte sanguíneo para o tumor e consequentemente menos oxigênio, o que leva a morte celular das células da massa tumoral [46]. Devido a similaridade química desses análogos da Talidomida com os compostos 1A, 1B e 1C, essa via de vascularização tumoral também pode ter sido bloqueada por esses glicoconjugados de ftalimidas.

Um estudo utilizando ftalimidas com benzotiazol avaliaram o efeito desses compostos sobre a angiogênese, utilizando Membrana Corioalantóide, e observaram que esses compostos ftalimidicos assim como a Talidomida possuem a capacidade de inibir a nova rede vasos, mecanismo que também pode ter sido bloqueado pelos compostos 1A, 1B e 1C, que possuem o anel ftalimidico como grupo farmacofórico, e por tanto por inibem a vascularização podem ter promovido as áreas de necrose e apoptose encontradas na histologia tanto do carcinoma de Ehrlich como no Sarcoma 180 [19; 47]

5. Conclusão

De acordo com a proposta inicial, foram sintetizados os glicoconjugados de ftalimidas (1A, 1B e 1C), que apresentaram bons rendimentos químicos. Posteriormente foram iniciadas as experimentações biológicas, com a finalidade de avaliar as atividades

antitumoral e Anti-inflamatória dos compostos ftalimidicos. A primeira análise foi a citotoxicidade in vitro dos compostos frente a linhagens cancerígenas, observando uma baixo percentual de citotoxicidade dos compostos contra as linhagens.

Na experimentação in vivo, utilizando os tumores sólidos Sarcoma 180 e carcinoma de Ehrlich os composto 1A, 1B e 1C apresentaram uma significativa redução da massa tumoral, com percentual de inibição bem próximo ao composto utilizado como controle negativo (5-FU). Essa redução observada in vivo que não foi contatada in vitro, provevelmente se deve ao fato dos compostos testados estarem atuando em vias de crescimento tumoral que não podem ser avaliadas em ensaios in vitro, como inibição da angiogênese, um mecanismo fundamental para o desenvolvimento de tumores. Na análise histológicas foi possível confirmar aspectos de redução tumoral promovido pelos composto 1A, 1B e 1C, como apoptose e áreas de necrose.

Os compostos glicoconjugados de ftalimidas também foram eficientes na redução do processo inflamatório, no modelo de inflamação induzido por peritonite, o que torna esses compostos como promissores fármacos para tratamentos futuros de neoplasias, visto que os mesmo apresentaram excelente atividade antitumoral e também boa atividade Anti-inflamatória, principalmente pela redução do processo inflamatório que está diretamente ligado com a progressão do câncer, por liberar moléculas inflamatórias como a COX-2 que promove a progressão das neoplasias por estimular fatores de crescimento tumoral como o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) além de elevar a expressão de proteínas antiapoptóticas como a Bcl-2.

Por tanto, os glicoconjugados de ftalimidas (1A, 1B e 1C) despontam como moléculas promissoras para o tratamento de neoplasias, principalmente por também atuarem inibindo o processo inflamatório, tão fundamental para o crescimento tumoral. Além disso esses compostos despertam muito interesse devido a grande complexidade de suas moléculas, pois possuem três grupos farmacofóricos em sua estrutura: as ftalimidas, os triazóis e o alcino-carboidrato e cada um desses compostos possuem ações em diversos processos biológicos, que inclusive podem potencializar o efeito biológico tanto desses grupos farmacofóricos, quanto de outros compostos.

Conflito de Interesses

Os autores declaram que não possuem nenhum conflito de interesse no presente trabalho.

Agradecimentos:

A Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco.

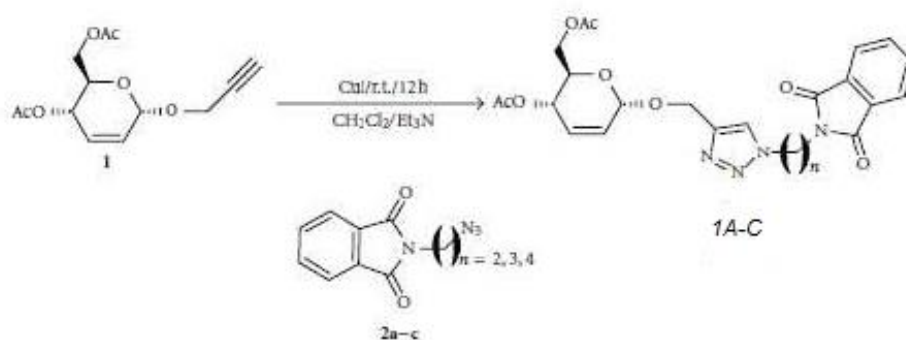
Referências

- 1- Garcia, M. et al. Global Cancer Facts and Figures. ACS, 2007.
- 2- Stratton, MR.; Campbell, P. J.; Futreal, A.; The cancer genome. *Nature*, 2009; **458**:719-724.
- 3- Tenório, R. P.; Góes, AJS. Thiosemicarbazones: Preparation Methods, Synthetic Applications And Biological Importance. *Quim. Nova*, 2005; **28**:1030-1037.
- 4- Huryn, M. D. Drug Discovery in an Academic Setting: Playing to the Strengths. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2013; **4**:313–315.
- 5- Reitz, A. B. Future Horizons in Drug Discovery Research. *ACS Med. Chem. Lett.* 2013; **3**:80–82.
- 6- Chechinell, V. F.; Corrêia, R.; Campos, F.; Yunes, R. A; Nunes, R. J. Chemical aspects and therapeutic potencial of cyclic imides: A review. *Química Nova*, 2003; **26**:230-241.
- 7- Gajare, S. P; Mahajan, S. S. Qsar Studies of Phthalimide Derivatives For Their Potent Anxiolytic Activity. *Int J Cur Res Rev*, 2012; **4**:151.
- 8- Jean SL, Paulo YR, Chung CM, Celio TH, Fernando PR, Clarice LQ. Synthesis and in vitro anti mycobacterium tuberculosis activity of a series of phthalimide derivatives, *Bioorg Med Chem*, 2009; **17**:3795–3799.
- 9- Hassanzadeh F, Rabbani M, Khodarahmi GA, Fasihi A, Hakimelahi GH, Mohajeri M, Synthesis of phthalimide derivative and evaluation of their anxiolytic activity, *Res Pharm Sci* 2007; **2**:35-41.
- 10- Babu AH, Ramana AV, Sinha R, Yahav JS, Arora SK, Antitubercular agents. Part 1: Synthesis of phthalimido and naphthalimido linked phenazines as a new prototype antitubercular agent. *Bioorg Med Chem*, 2005; **15**:1923-1926.
- 11- Barbosa, M. L. C. Multifactorial Diseases and the Challenges in the Design of Multi-target Drugs: The Contribution of the Laboratory of Evaluation and Synthesis of Bioactive Substances - LASSBio®. *Rev. Virtual Quim.* 2015; **7**.
- 12- Jalenca, X.; Mestres, J. On the origins of drug polypharmacology. *Medicinal Chemistry Communications* , 2013; **4**:80.

- 13- Shiheido et al.; A Phthalimide Derivative That Inhibits Centrosomal Clustering Is Effective on Multiple Myeloma. *Plos One*, 2012; **7**:1-13.
- 14- Palumbo A.; Larocca, A.; Falco, P.; Sanpaolo, G.; Falcone, A.P. et al. Lenalidomide, melphalan, prednisone and thalidomide (RMPT) for relapsed/ refractory multiple myeloma. *Leukemia*, 2010; **24**:1037–1042.
- 15- Avet-Loiseau H.; Attal, M.; Moreau, P.; Charbonnel, C. et al. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myeloma. *Blood*, 2007; **109**:3489–3495,.
- 16- Gaikwad, K. V.; Gaikwad, S. V.; Jadhav, S. B.; Rathod, S. D. Synthesis of some novel chalcones of phthalimidoester possessing good antiinflammatory and antimicrobial activity. *India Journal of Chemistry*, 2010; **49**:131-136.
- 17- Suggit M, Bibby MC. 50 years of preclinical anticancer drug screening: Empirical to target-driven approaches. *Clinical Cancer Research*, 2005; **11**:971-981.
- 18- Assis SPO, Silva MT, Oliveira RN, Lima VLM. Synthesis and Anti-Inflammatory Activity of New Alkyl-Substituted Phthalimide 1H-1,2,3-Triazole Derivatives. *The Scientific World Journal*, 2012; **1**:7.
- 19-Nagarajan S, Majumder S, Sharma U, Rajendran S, et al. Synthesis and anti-angiogenic activity of benzothiazole, benzimidazole containing phthalimide derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2013; **23**:287–290.
- 20- Dispenzieri A, Lacy MQ, Zeldenrust SR, Hayman SR, Kumar SK, et al. The activity of lenalidomide with or without dexamethasone in patients with primary systemic amyloidosis. *Blood* 2007; **109**:465–470.
- 21- Orzeszko A, Lasek W, Switaj T, Stoksik M, Kaminska B. Tumor necrosis factor- α production-regulating activity of phthalimide derivatives in genetically modified murine melanoma cells B78H1. *Il Farmaco* v.58:371-376, 2003.
- 22- Onuchic AC, Chammas R. Cancer and the tumor microenvironment. **Rev Med.** 2010; **89**:21-31.
- 23- Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; **8**:119:1420.
- 24- Lopez-Girona, A.; Mendy, D.; Ito, T.; Miller, K.; Gandhi, A. K.; Kang, J.; Karasawa, S, et al. Cereblon is a direct protein target for immunomodulatory and antiproliferative activities of lenalidomide and pomalidomide. *Leukemia*, 2012; **26**:2326–2335.
- 25- Heintel D, Rocci A, Ludwig H, Bolomsky A, Caltagirone S, Schreder M. High expression of cereblon (CRBN) is associated with improved clinical response in patients with multiple myeloma treated with lenalidomide and dexamethasone. *British Journal of Haematology*, 2013; **161**:695–700.

- 26- Dimopoulos, M.A., Spencer, A., Attal, M., Prince, M.H., Harousseau, J.L., Dmoszynska, A., San Miguel, J, et al. Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma. *The New England Journal of Medicine*, 2007; **357**:2123–2132.
- 27- Karamysheva AF. Mechanisms of Angiogenesis. *Biochemistry* 2008; **73**:751-762.
- 28- Auerbach R, Lewis R, Shinnars B, Kubai L, Akhtar, N. Angiogenesis Assays: A Critical Overview. *Clinical Chemistry* 2003; **49**:32–40.
- 29- Kallander LS, et al. *Journal of Medicinal Chemistry* 2005; **48**:5644-5647.
- 30- Rajasekaran A, Rajagopal KA. Synthesis of some novel triazole derivatives as anti-nociceptive and anti-inflammatory agents. *Acta Pharmaceutica*, 2009; **59**:355–364.
- 31- Falcao EP, de Melo SJ, Srivastava RM, Catanho MT, Do Nascimento SC. Synthesis and antiinflammatory activity of 4-amino-2- aryl-5-cyano-6-{3- and 4-(N phthalimidophenyl)} pyrimidines. *Eur J Med Chem* 2006; **41**:276–282.
- 32- Machado AL, Lima LM, Araujo JX Jr, Fraga CA, Koatz VL, et al. Design, synthesis and antiinflammatory activity of novel phthalimide derivatives, structurally related to thalidomide. *Bioorg Med Chem Lett* 2005; **15**:1169–1172.
- 33- Collin X, Robert J, Wielgosz G, Le Baut G, Bobin-Dubigeon C, et al. New anti-inflammatory N-pyridinyl(alkyl)phthalimides acting as tumour necrosis factor-alpha production inhibitors. *Eur J Med Chem* 2001; **36**:639–649.
- 34- Charlier C, Michaux C. Dual inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) as a new strategy to provide safer non-steroidal anti-inflammatory drugs. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2003; **38**:645-659.
- 35- Fiorucci S, Meli R, Bucci M, Cirino G. Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy? *Biochemical Pharmacology* 2001; **62**:1433–1438.
- 36- Balaji B, Hariharan S, Shah DB, Ramanathan M. Discovery of potential and selective COX-1 inhibitory leads using pharmacophore modelling, in silico screening and in vitro evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2014; **86**:469-480.
- 37- Kang YJ, Mbonye UR, DeLong CJ, WadaM, Smith WL. Regulation of intracellular cyclooxygenase levels by gene transcription and protein degradation, *Prog. Lipid Res.* 2007; **46**:108-125.
- 38- Bansal S, Bala M, Suthar, SK, Choudhary S, Bhattacharya S, Bhardwaj V, et al. Design and synthesis of novel 2-phenyl-5-(1,3-diphenyl-1H-pyrazol- 4-yl)-1,3,4-oxadiazoles as selective COX-2 inhibitors with potent anti-inflammatory activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2014; **80**:167-174.

- 39- Palaska E, Sahin G, Kelicen P, Durlu NT, Altinok G. Synthesis and anti-inflammatory activity of 1-acylthiosemicarbazides, 1,3,4-oxadiazoles, 1,3,4-thiadiazoles and 1,2,4-triazole-3-thiones. *Il Farmaco* 2002; **57**:101–107.
- 40- Abdel-Aziz AAM, Eltahir KHE, Asiri YA. Synthesis, anti-inflammatory activity and COX-1/COX-2 inhibition of novel substituted cyclic imides. Part 1: Molecular docking study. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2011; **46**:1648e1655.
- 41- Al-Suwaidan IA, Alanazi AM, El-Azab AS, Al-Obaid AM, et al. Molecular design, synthesis and biological evaluation of cyclic imidesbearing benzenesulfonamide fragment as potential COX-2 inhibitors. Part 2. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2013; **23**:2601–2605.
- 42- Alanazi AM, El-Azab AS, Al-Suwaidan IA, Eltahir KEH, Asiri YA, Naglaa I, et al. Structure-based design of phthalimide derivatives as potential cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: Anti-inflammatory and analgesic activities. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2015; **92**:115-123.
- 43- Shafi S, Alam MM, Mulakayala N, Mulakayala C, Vanaja G, Kalle AM, et al. Synthesis of novel 2-mercapto benzothiazole and 1,2,3-triazole based bis-heterocycles: Their anti-inflammatory and anti-nociceptive activities. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2012; **49**:324-333.
- 44- Haider S, Sarwar MA, Hamid H, Shafi S, Nargotra A, Mahajan P, et al. Synthesis of novel 1,2,3-triazole based benzoxazolinones: Their TNF- α based molecular docking with in-vivo anti-inflammatory, antinociceptive activities and ulcerogenic risk evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2013.; **70**:579-588.
- 45- Sambasiva Rao P, Kurumurthy C, Veeraswamy C, Kumar, GS, Poornachandra Y, Ganesh CK, et al. Synthesis of novel 1,2,3-triazole substituted-N-alkyl/aryl nitron derivatives, their anti-inflammatory and anticancer activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2014; **80**:184-191.
- 46- Zahran MAH, Salem TAR, Samaka RM, Agwa HS, Awad AR. Design, synthesis and antitumor evaluation of novel thalidomide dithiocarbamate and dithioate analogs against Ehrlich ascites carcinoma-induced solid tumor in Swiss albino mice. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2008; **16**:9708–9718.
- 47- Majumder S, Rajaram S, Muley A, Reddy HS, Tamilarasan KP, et al. Thalidomide attenuates nitric oxide-driven angiogenesis by interacting with soluble guanylyl cyclase. *British Journal of Pharmacology* 2009; **158**:1720–1734.



Síntese dos compostos 1A-C

Figura 1: Estrutura química dos glicoconjugados de ftalimidas (1A, 1B e 1C).

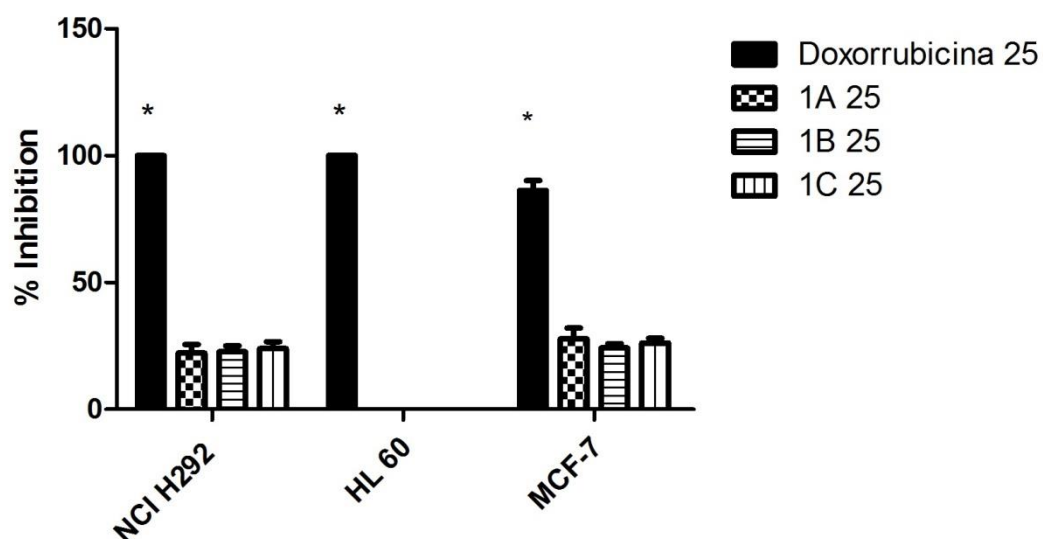


Figura 2: Citotoxicidade celular dos glicoconjugados de ftalimida (1A, 1B e 1C) frente as linhagens de células cancerígenas NCIH 292, HL-60 e MCF-7 na concentração 25µg/mL. Os dados representam a média $\pm$ o desvio padrão. As diferenças estatísticas do controle foram determinadas por one-way ANOVA seguido de teste de Tukey, *P<0,05 para os grupos em comparação com a Doxorubicina.

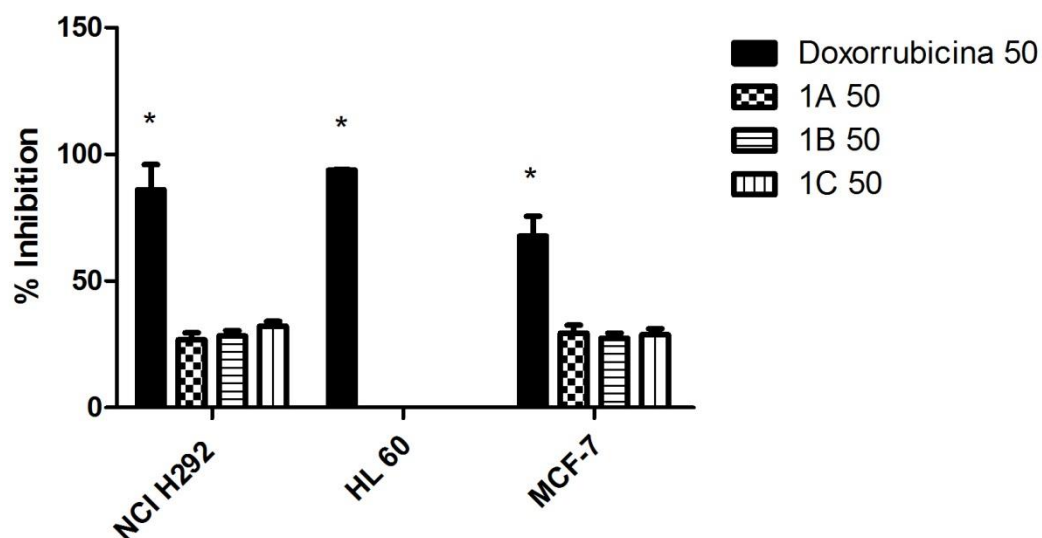


Figura 3: Citotoxicidade celular dos glicoconjugados de ftalimida (1A, 1B e 1C) frente as linhagens de células cancerígenas NCIH 292, HL-60 e MCF-7 na concentração 50µg/mL. Os dados representam a média $\pm$ o desvio padrão. As diferenças estatísticas do controle foram determinadas por one-way ANOVA seguido de teste de Tukey, * $P < 0,05$ para os grupos em comparação com a Doxorubicina.

Tabela 1: Determinação da DL₅₀ dos compostos (1A, 1B e 1C).

Dose (mg/Kg)		Numero de Mortes
50 (mg/Kg)	(1A, 1B e 1C).	0/5
100 (mg/Kg)	(1A, 1B e 1C).	0/5
200 (mg/Kg)	(1A, 1B e 1C).	0/5
300 (mg/Kg)	(1A, 1B e 1C).	0/5
400 (mg/Kg)	(1A, 1B e 1C).	0/5
500 (mg/Kg)	(1A, 1B e 1C).	0/5
1000 (mg/Kg)	(1A, 1B e 1C).	0/5

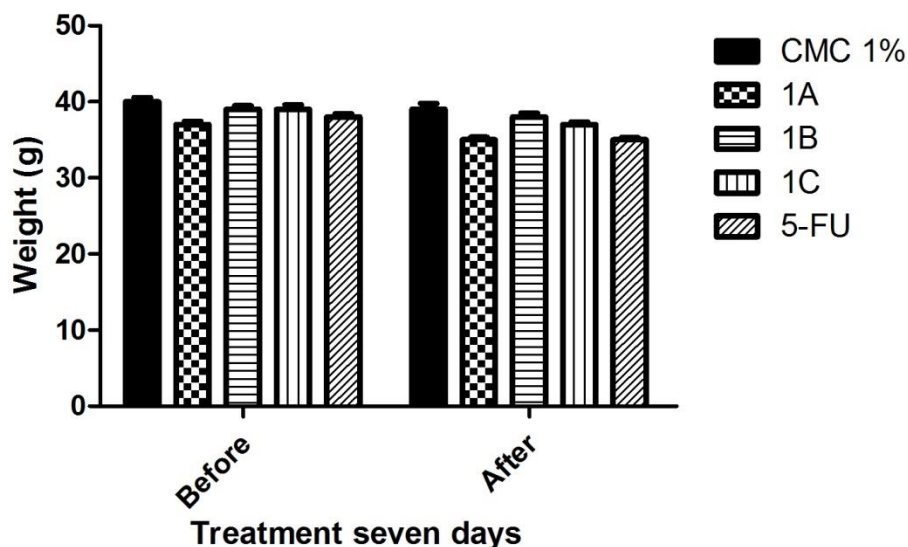


Figura 4: Média do Peso dos animais com carcinoma de Ehrlich, antes e após 7 dias de tratamento. Os dados representam a média $\pm$ o desvio padrão. As diferenças estatísticas do controle foram determinadas por one-way ANOVA seguido de teste de Tukey, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos.

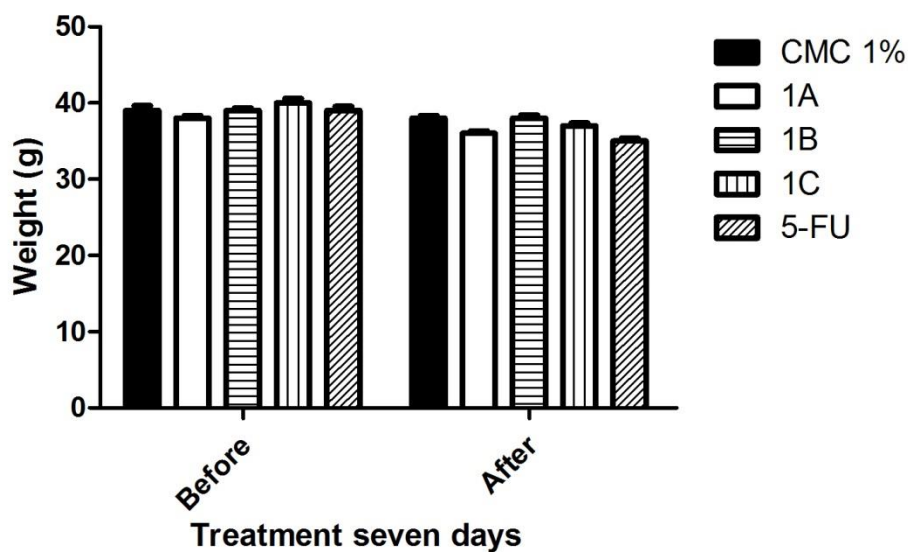


Figura 5: Média do Peso dos animais com Sarcoma 180 antes e após 7 dias de tratamento. Os dados representam a média $\pm$ o desvio padrão. As diferenças estatísticas do controle foram determinadas por one-way ANOVA seguido de teste de Tukey, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos.

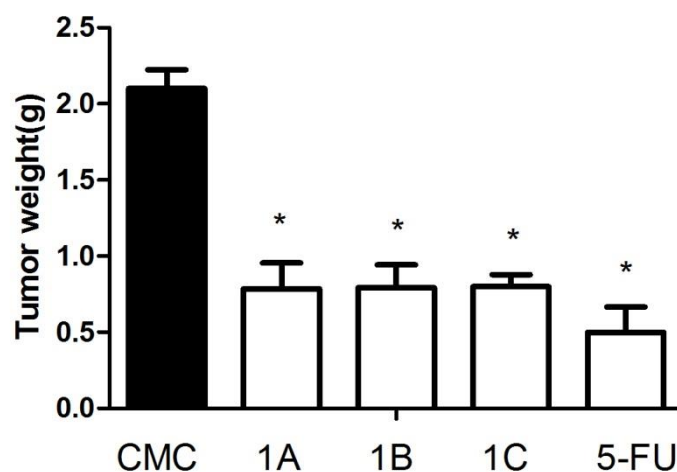


Figura 6: Peso dos tumores (carcinoma de Ehrlich) dos grupos tratados com os compostos 1A, 1B e 1C (20mg/Kg). Os dados representam a média $\pm$ o desvio padrão. As diferenças estatísticas do controle foram determinadas por one-way ANOVA seguido de teste de Tukey, * $P < 0,05$ para os grupos em comparação com CMC 1%.

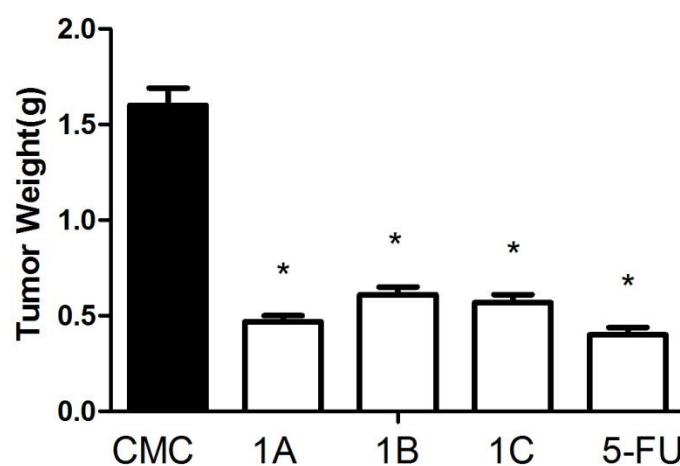


Figura 7: Peso dos tumores (Sarcoma 180) dos grupos tratados com os compostos 1A, 1B e 1C (20mg/Kg). Os dados representam a média $\pm$ o desvio padrão. As diferenças estatísticas do controle foram determinadas por one-way ANOVA seguido de teste de Tukey, * $P < 0,05$ para os grupos em comparação com CMC 1%.

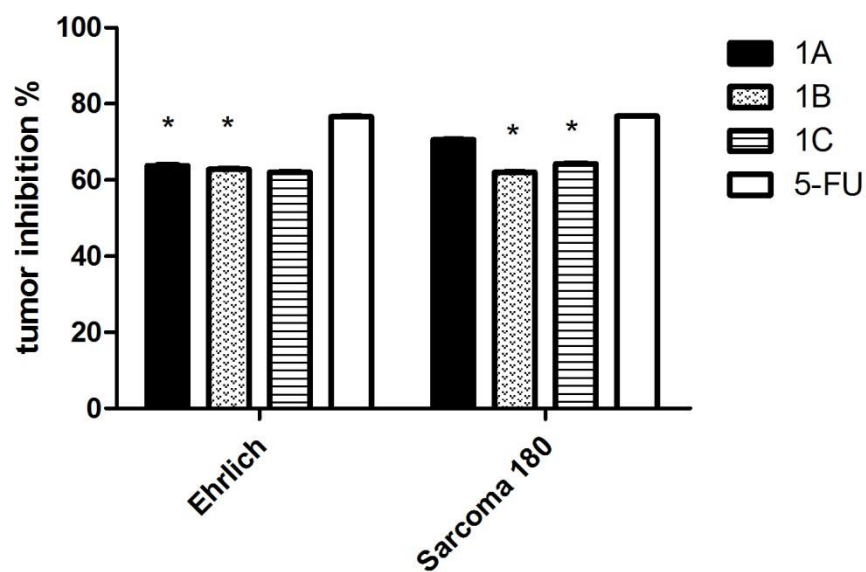


Figura 8: Avaliação da inibição tumoral do Carcinoma de Ehrlich e do Sarcoma 180 a partir do tratamento com 5-FU e os glicoconjugados de ftalimida (1A, 1B e 1C). O controle (CMC 1%) está normatizado para 100%. Os dados representam a média $\pm$ o desvio padrão. As diferenças estatísticas do controle foram determinadas por one-way ANOVA seguido de teste de Tukey, $*P < 0,05$ para os grupos em comparação 5-FU.

Tabela 2: Peso dos órgãos dos camundongos submetidos ao carcinoma de Ehrlich tratados com os compostos 1A, 1B e 1C, 5-FU e o controle negativo CMC1%. Os dados representam a média e desvio padrão. As diferenças estatísticas do controle foram determinadas por one-way ANOVA seguido de teste de Tukey, *P<0,05 para os grupos em comparação com o grupo controle CMC 1%.

Peso dos Órgãos	Grupos				
	CMC 1%	1A	1B	1C	5-FU
Fígado	2,42±0,7	2,18±0,32	2,2±0,36	2,16±0,35	2,37±0,44
Baço	0,30±0,2	0,28±0,3	0,26±0,4	0,28±0,6	0,22± 0,9
Ríns	0,56±0,07	0,54±0,02	0,51±0,05	0,50±0,03	0,55±0,08

Tabela 3: Peso dos órgãos dos camundongos submetidos ao Sarcoma 180 tratados com os compostos 1A, 1B e 1C, 5-FU e o controle negativo CMC1%. Os dados representam a média e desvio padrão. As diferenças estatísticas do controle foram determinadas por one-way ANOVA seguido de teste de Tukey, *P<0,05 para os grupos em comparação com o grupo controle CMC 1%.

Peso dos Órgãos	Grupos				
	CMC 1%	1A	1B	1C	5-FU
Fígado	2,13±0,5	2,06±0,38	2,1±0,33	2,12±0,27	2,19±0,34
Baço	0,34±0,15	0,26±0,07	0,23±0,05	0,28±0,09	0,25± 0,04
Ríns	0,51±0,04	0,53±0,02	0,54±0,03	0,53±0,04	0,51±0,06

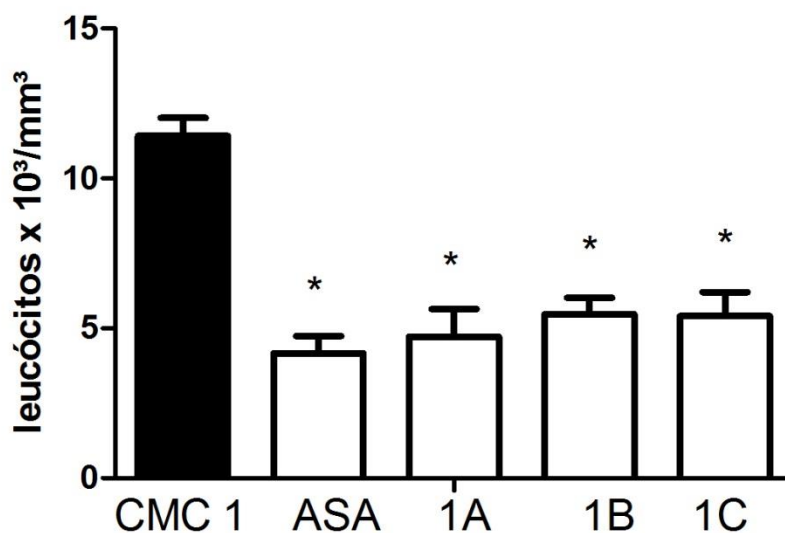


Figura 9: Avaliação da atividade Anti-inflamatória dos composto 1A, 1B e 1C sobre a migração leucocitária induzida pela peritonite aguda tendo como agente flogístico a carragenina. As diferenças estatísticas do controle foram determinadas por one-way ANOVA seguido de teste de Tukey, * $P < 0,05$ para os grupos em comparação com CMC 1%.

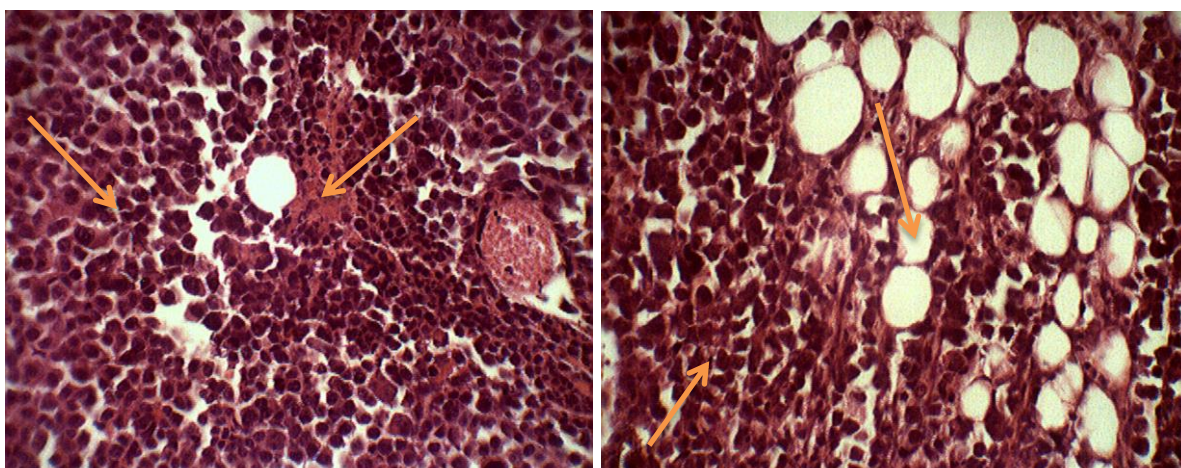


Figura 10: Fotomicrografia de camundongos com Carcinoma de Ehrlich tratados com CMC 1% e 5-FU. A) Células pleomórficas; Presença de necrose coagulativa. B) Célula exibindo atipia celulae; Infiltração de tecido adiposo. HE 400x.

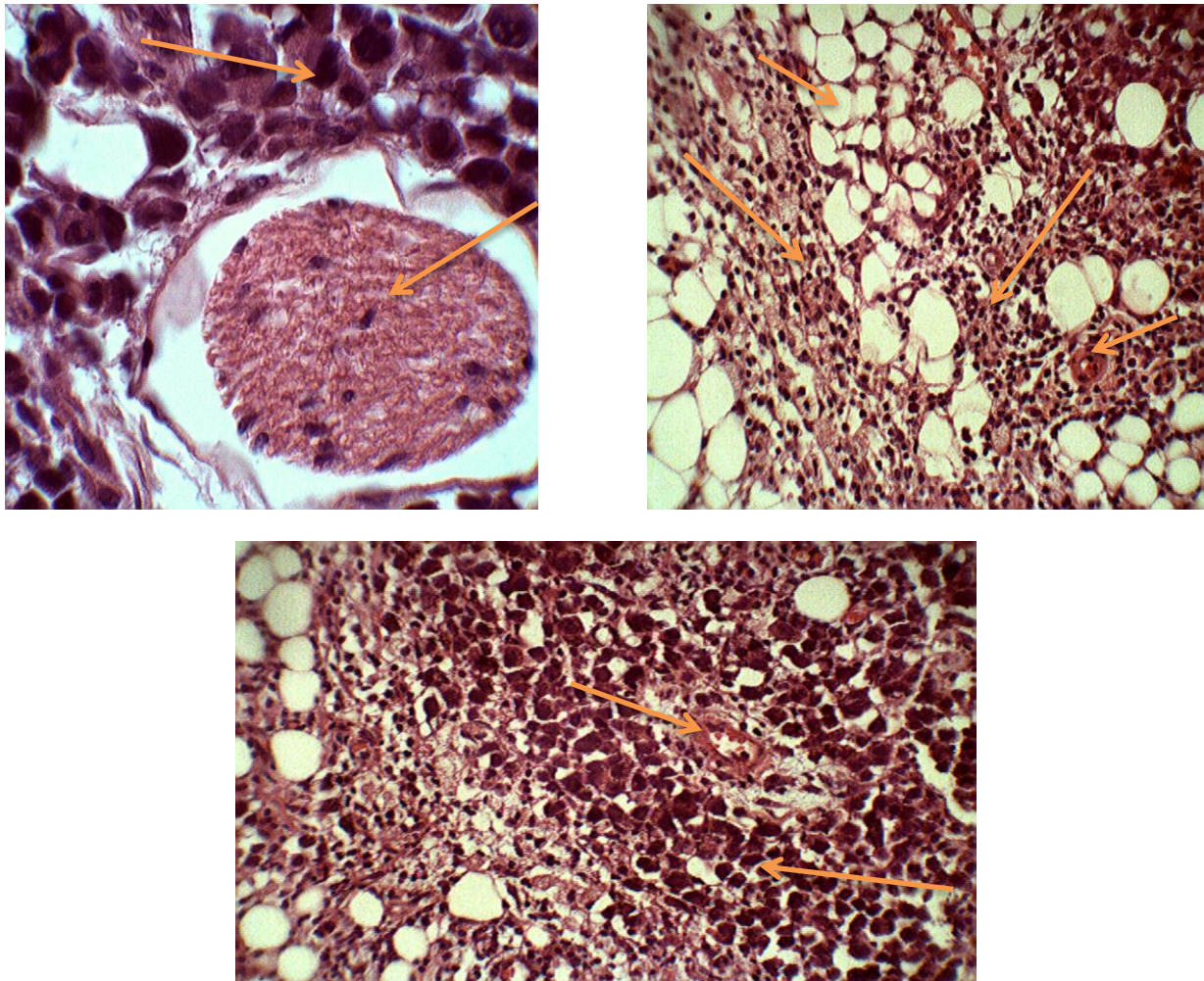


Figura 11: Fotomicrografia de camundongos com Carcinoma de Ehrlich tratados com 1A, 1B e 1C. A) Células com núcleo pgnótico com características de apoptose. B) Células leucocitárias; Infiltração de tecido adiposo; Vaso sanguíneo em provável retração. C) Vaso sanguíneo; Células pleomórficas; Pouca infiltração leucocitária. HE 400x.

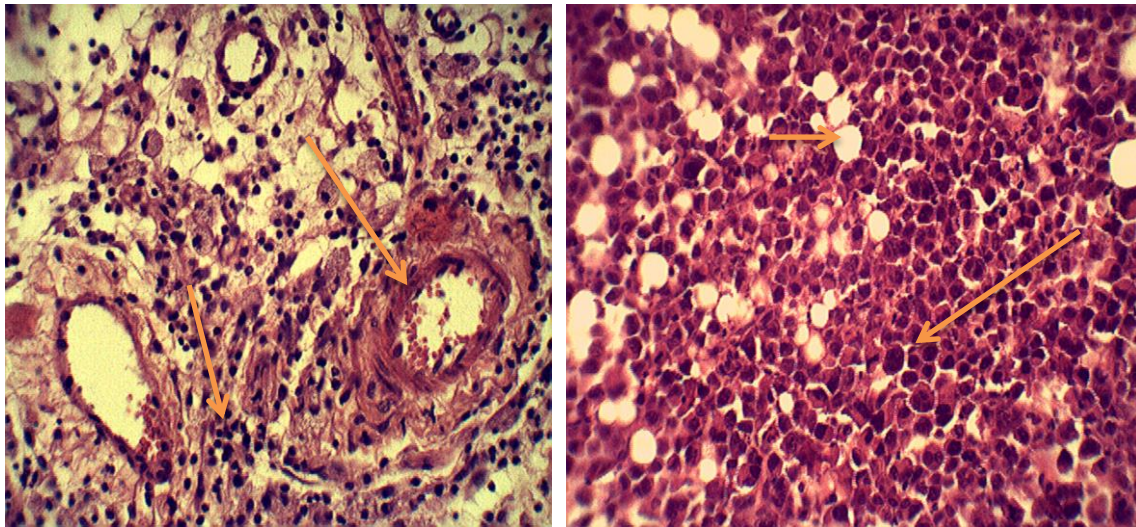


Figura 12: Fotomicrografia de camundongos com Sarcoma180 tratados com CMC 1% e 5-FU. A) Vasos sanguíneos proeminentes; Intenso infiltrado leucocitário. B) Atipia celular; Infiltração de tecido adiposo. HE 400x.

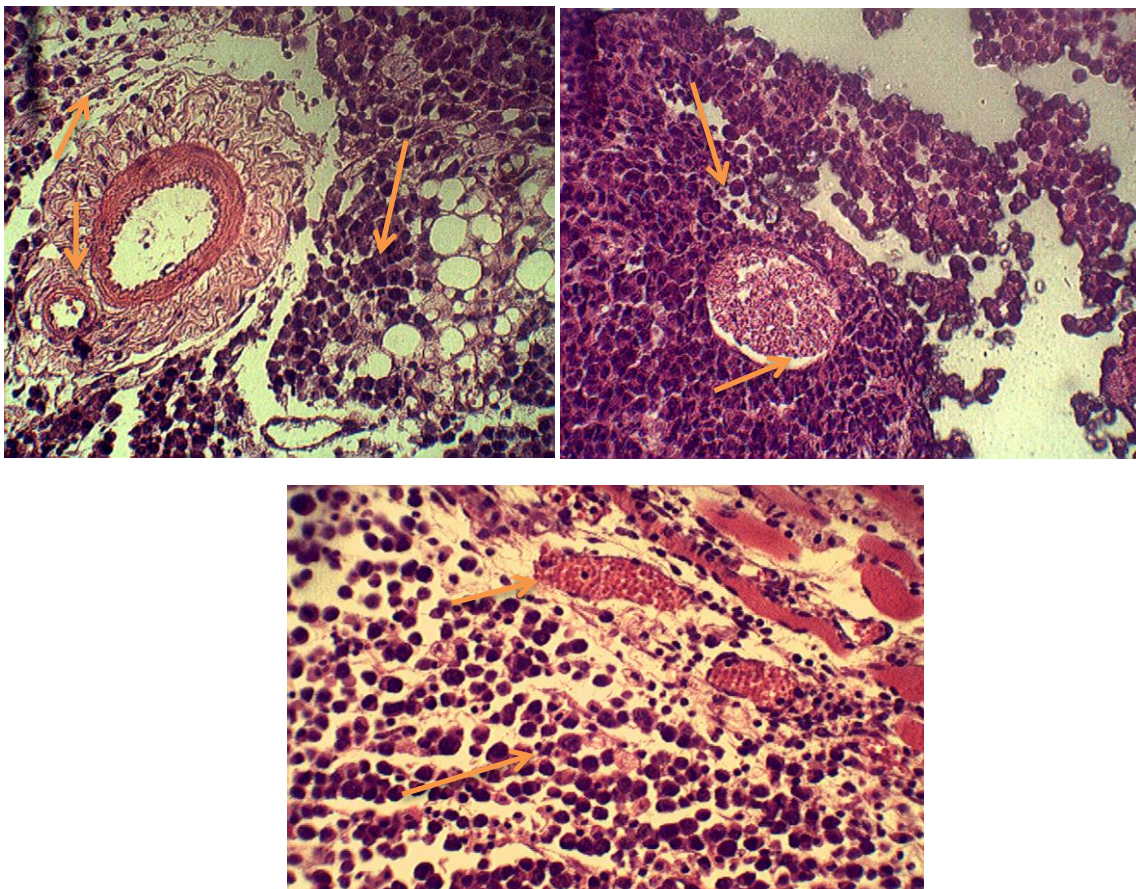


Figura 13: Figura 10: Fotomicrografia de camundongos com Sarcoma 180 tratados com 1A, 1B e 1C. A) Presença de leucócitos; Vasos Sanguíneos; Células pleomórficas. B) Células em picnose em provável processo de apoptose. C) Presença de anisocariose

(acentuada diferença entre os tamanhos dos núcleos); Infiltração de tecido muscular. HE 400.