



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - CCS

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - DCFAR

LpQM – LABORATÓRIO DE PLANEJAMENTO EM QUÍMICA MEDICINAL

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E CITOTÓXICA DE
DERIVADOS HÍBRIDOS DA PIRIDINA, TIOSSEMICARBAZONA E TIAZÓIS**

Recife

2017

THIAGO DAVID DOS SANTOS SILVA

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E CITOTÓXICA DE
DERIVADOS HÍBRIDOS DA PIRIDINA, TIOSSEMICARBAZONA E TIAZÓIS**

**Tese de doutorado apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da
Universidade Federal de Pernambuco como
requisito para obtenção do grau de Doutor.**

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Ana Cristina Lima Leite

CO- ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Gardenia Carmen Gadelha Militão

Recife

2017

Catálogo na fonte:
Bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4-1895

S586d	Silva, Thiago David dos Santos. Determinação da atividade antitumoral e citotóxica de derivados híbridos da piridina, tiossemicarbazona e tiazóis / Thiago David dos Santos Silva. – Recife: o autor, 2017. 106 f.: il.; 30 cm. Orientadora: Ana Cristina Lima Leite. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2017. Inclui referências e anexos. 1. Antitumoral. 2. Citotoxicidade. 3. Câncer de fígado. 4. Toxicidade. I. Leite, Ana Cristina Lima (Orientadora). II. Título. 615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2017-294)
-------	---

THIAGO DAVID DOS SANTOS SILVA

**“DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E CITOTÓXICA DE
DERIVADOS HÍBRIDOS DA PIRIDINA, TIOSSEMICARBAZONA E TIAZÓIS”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: 28/07/2017.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley (Presidente e Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro (Titular Externa)
Centro Acadêmico de Vitória (UFPE/CAV)

Dra. Jéssica Miranda do Nascimento (Titular Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Fabiano Ferreira (Titular Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Jamerson Ferreira de Oliveira (Titular Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

*"Nada me perturbe,
Nada me amedronte
Tudo passa
A paciência tudo alcança...
A quem tem Deus
Nada falta
Só Deus basta"*

Santa Tereza D'Ávila

*Sendo eu, um aprendiz
A vida já me ensinou que besta
É quem vive triste
Lembrando o que faltou
Magoando a cicatriz*

*E esquece de ser feliz
Por tudo que conquistou*

*Afinal, nem toda lágrima é dor
Nem toda graça é sorriso
Nem toda curva da vida
Tem uma placa de aviso*

*E nem sempre o que você perde
É de fato um prejuízo*

*O meu ou o seu caminho
Não são muito diferentes
Tem espinho, pedra, buraco
Pra "modê" atrasar a gente*

*Mas não desanime por nada
Pois até uma topada
Empurra você pra frente*

*Tantas vezes parece que é o fim
Mas no fundo, é só um recomeço
Afinal, pra poder se levantar
É preciso algum tropeço*

Bráulio Bessa - Adaptado

Agradecimentos

Agradecer, neste momento, faz-se tão necessário quanto defender esta tese.

Agradeço a **Deus** pela vida, pelos ensinamentos constantes, e a Nossa senhora pela intersessão, com o objetivo de me mostrar o real valor do AMOR, da CARIDADE e da FÉ.

Aos meus pais: **Conceição e Fernando**, e ao meu irmão **Diego**, meus anjos da guarda terrenos, por terem aceitado a missão de me incentivar e apoiar todos os meus passos, e brilhantemente, me ensinar valores essenciais a vida como RESPONSABILIDADE e CARÁTER. Por terem acreditado na minha capacidade e sonhado comigo para que este dia chegasse. Agradeço a Deus por vocês serem o meu alicerce.

A **Dayana** (minha esposa) por entender minhas ausências no finais de semana em detrimento de estudo e experimentos. Por me apoiar e torcer para que todos os protocolos dessem certo, e por me ajudar nos experimentos quando eu adoeci.

A prof.(a) Dra. **Ana Cristina Lima Leite** por ter me recebido no LPQM de portas abertas e aceitado me orientar.

A prof.(a) Dra. **Gardênia Carmen Gadelha Militão**, "Tu te tornas eternamente responsável por aquele que cativas" - O pequeno Príncipe

Aos os meus amigos da Fisiologia em especial ao **Paulo Bruno, Carla e Júlia**

Aos Professores do departamento de Fisiologia e Farmacologia que me apoiaram e sempre estavam dispostos a solucionar os problemas, em especial aos: Prof. Dr.(a) **Leucio, Ana Dulce, Cláudio** (Uso da sala de cultura, microscópio, freezer -80), **Dayane** (Uso do leitor de placas), **Ângela, Belmira, Reginaldo e Michelly** (Apoio e presteza no recebimento e armazenamento de materiais).

Eu pude sonhar, criar, desenhar e construir o lugar mais maravilhoso do mundo, mas foi necessário pessoas para transformar meu sonho em realidade:

Péricles Austregésilo, pelo incentivo, força e sobre tudo por acreditar no meu compromisso e dedicação;

Aos queridos "Mestres dos Magos": **Cleopatra, Amália, Bruna, Lais, Amanda e Carolina**, pelas incansáveis conversas, risos, momento de descontração e grande amizade, vocês tornaram a caminhada mais leve.

Aos Amigos do departamento de antibióticos: **Cinthya, Temistocles, Danielle, Jeyce, Jaciana, Carla, Sandrine, Ane**, e em especial a prof.(a) Dr.(a) **Teresinha** por ter aberto as portas do seu laboratório para que eu pudesse desenvolver meus experimentos

Aos Técnicos do departamento de antibióticos **Nelson e Maria**, por todo apoio e amizade ao transmitir seus conhecimentos sobre manutenção e cultura de células.

Aos amigos do LPQM: **Gervânio, Miriã, Luciana, Marcos, Dayane, Paulo André, Arsênio**. Em especial ao **Marcos Cardoso**, autor da síntese de moléculas que possibilitou a realização deste trabalho.

A Fiocruz-BA, Pesquisador Dr. **Daniel Bezerra**, pelo aceite na colaboração dos ensaios *in vivo*.

A toda a **minha família** e **amigos** que sempre torceram por mim.

A **Lizandra Miranda, Nelson Lima, Patrícia Neri**, pela amizade, disponibilidade e incansáveis caronas no percurso Vitória/Recife.

A secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas **Nerilin Trajano, Rilvan Guedes** (Assistente), **Wery** (Bolsita) pela dedicação com o que fazem e por toda ajuda.

A todos que direta e indiretamente contribuíram com este trabalho, muito obrigado;

A todos aqueles que padecem de algum tipo de câncer, onde a luta para se obter a cura ou o alívio é uma constante e torna-se incansável e infinitamente dolorosa no corpo e na alma.

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio dos seguintes órgãos e instituições:

Fundação de Amparo a ciência e tecnologia - FACEPE

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - Fiocruz Bahia

Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

RESUMO

O câncer é um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo. Nas últimas duas décadas, melhorias em diagnóstico e terapêutica foram realizadas, levando a queda de 23% na taxa de mortalidade por câncer; No entanto, o câncer ainda é uma das principais causas de morte mundialmente. Portanto, pesquisa básica e clínica são necessárias para reduzir a mortalidade relacionada ao câncer. Um total de 49 compostos híbridos contendo porções de piridil,1,3-tiazol e tiossemicarbazonas foram testados para avaliar o seu potencial anticâncer sendo realizado um estudo farmacológico de suas propriedades antitumorais em vários modelos biológicos *in vitro*, frente a linhagens de células tumorais humanas HL-60 (leucemia), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), HepG2 (carcinoma hepatocelular), NCI-H292 (carcinoma de pulmão) e células não tumorais (PBMC, células mononucleares de sangue periférico humano) e *in vivo* em um modelo xenográfico de câncer de hepatocelular. Os compostos foram classificados em quatro grupos de acordo com a estrutura química de que são derivados: grupo TAP (TAP 01- 12) são 2-piridil 2,3-tiazóis com um metil em C6. Os grupos TP (TP 01-12) são piridiltiazolil, os TS (TS 01 - 13) são tiossemicarbazonas e TZ (TZ 01 - 12) são compostos de benziltiazolil. A maioria dos compostos foi altamente citotóxico em pelo menos uma linhagem celular testada ($IC_{50} \leq 3 \mu M$), exceto o grupo benziltiazolil (TZ), sendo HL-60 a linhagem mais sensível e HepG2 a mais resistente. Os compostos TAP-07 ((2-(1-(piridin-2-il)etileno)hidraziil)-4-(4-clorofenil)-1,3-thiazol) e TP-07 (2-(2-(piridin-2-ilmetileno)hidrazinil)-4-(4-clorofenil)-1,3-tiazol) apresentaram atividade citotóxica em todas as linhagens de células tumorais, incluindo HepG2 (IC_{50} 2,2 e 5,6 μM , respectivamente) sem efeitos antiproliferativos para células normais (PBMC) ($IC_{50} > 30 \mu M$), tornando TAP-07 e TP-07, os compostos com o índice de seletividade mais favorável. TAP-07 e TP-07 induziram apoptose em células HepG2 e apresentaram atividade antitumoral *in vivo* (40mg/Kg) no modelo xenográfico de câncer de hepatocelular em camundongos C.B-17 com imunodeficiência combinada severa. Os diagnósticos sistêmicos verificados por técnicas bioquímicas e histopatológicas não revelaram sinais significativos de toxicidade após o tratamento com TAP-07 e TP-07. No conjunto, dos compostos avaliados, os resultados indicaram a atividade antitumoral em câncer de fígado de derivados de 2-piridil-2,3-tiazol.

Palavras-chave: 2,3-tiazol 2-piridil. HepG2. Antitumoral. Citotoxicidade. câncer de fígado; Toxicidade.

ABSTRACT

Cancer is the major public health problem worldwide. In the last two decades, improvements in diagnostics and therapeutics have been done, leading to 23% drop in the cancer death rate; however, cancer still is a leading cause of death worldwide. Therefore, basic and clinical research is necessary to reduce the mortality related to cancer (Siegel et al., 2016). A total of 49 hybrid compounds containing pyridyl,1,3-thiazole and thiosemicarbazones groups were tested to assess their anticancer potential *in vitro* against human tumor and non-tumor cell lines: HL-60 (leukemia), MCF-7 (breast adenocarcinoma), HepG2 (hepatocellular carcinoma), NCI-H292 (lung carcinoma) (PBMC, human peripheral blood mononuclear cells) and *in vivo with a* hepatocellular xenograft cancer model. The compounds were classified at four groups according to the chemical structure they are derived from: TAP group are 2-pyridyl 2,3-thiazoles with a methyl at C6; TP compounds are pyridyl thiazolyl and TZ are benzyl thiazolyl compounds while TS compounds are thiosemicarbazones. Most of them were highly potent in at least one cell line tested ($IC_{50} \leq 3 \mu M$), except TZ compounds, being HL-60 the most sensitive and HepG2 the most resistant cell line. Among them, TAP-07 (2-(1-(pyridin-2-yl)ethylene)hydrazinyl)-4-(4-chlorophenyl)-1,3-thiazole) and TP-07 (2-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(4-chlorophenyl)-1,3-thiazole) presented cytotoxic activity in all tumor cell lines, including HepG2 (IC_{50} 2.2 and 5.6 μM , respectively) without antiproliferative effects to normal cells (PBMC) ($IC_{50} > 30 \mu M$), making TAP-07 and TP-07, the compounds with the most favorable selectivity index. TAP-07 and TP-07 induced apoptosis in HepG2 cells and presented *in vivo* (50 mg/kg) antitumor activity in hepatocellular xenograft cancer model at *C.B-17* severe combined *immunodeficient* mice. Systemic toxicological evaluation verified by biochemical and histopathological techniques revealed no major signs of toxicity after treatment with TAP-07 and TP-07. Together the results indicated the anti-liver cancer activity of 2-pyridyl 2,3-thiazole derivatives.

Keywords: 2-pyridyl 2,3-thiazoles. HepG2. antitumor. cytotoxicity. liver cancer. toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características das células tumorais.	24
Figura 2 - Representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2016/2017, segundo Unidade da Federação (todas as neoplasias malignas).	27
Figura 3 - Representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2016/2017, segundo Unidade da Federação (todas as neoplasias malignas)	27
Figura 4: Esquema representativo do ciclo celular.	29
Figura 5: Esquema representativo de crescimento de um tumor maligno primário	30
Figura 6: Características morfológicas dos principais tipos de morte celular.	31
Figura 7: Esquema representativo do mecanismo de ação da quimioterapia	35
Figura 8: Estruturas da tiossemicarbazona	36
Figura 9: 3-Amino piridina, Triapina	37
Figura 10: Núcleo tiazol	39
Figura 11: Viabilidade celular determinada por coloração com azul de tripan de células HepG2 (A e B) e HL-60 (C e D) tratadas com TAP-07 e TP-07 após 24 (A e C) e 48 (B e D) horas de incubação.	67
Figura 12: Análise microscópica de células HepG2 e HL-60 coradas com may-grunwald-giemsa após 24 e 48 h de incubação.	68
Figura 13: Conteúdo de DNA analisado por citometria de fluxo de células HepG2 (A e B) e HL-60 (C e D) tratadas com TAP-07 e TP-07 após 24 (A e C) e 48 h (B e D) de incubação.	69

Figura 14: Efeito dos compostos TAP-07 e TP-07 na indução da apoptose na linha celular HepG2 após 24 h de incubação.

70

Figura 15: Viabilidade celular determinada por coloração com azul de tripan de células HepG2 (A e B) e HL-60 (C e D) tratadas com TAP-07 e TP-07 após 24 (A e C) e 48 (B e D) horas de incubação.

72

Figura16: Análise microscópica de células HepG2 e HL-60 coradas com may-grunwald-giemsa após 24 e 48 h de incubação.

76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estimativa para o ano 2016/2017 das taxas brutas de incidência *por 100 mil habitantes e de número de casos novos por câncer, segundo a localização primária. Taxas de incidência estimada para 2017* para os tipos de câncer mais frequentes (exceto pele não melanoma) em Homens, Brasil e regiões geográficas.	25
Tabela 2: Estimativa para o ano 2016/2017 das taxas brutas de incidência *por 100 mil habitantes e de número de casos novos por câncer, segundo a localização primária. Taxas de incidência estimada para 2017* para os tipos de câncer mais frequentes (exceto pele não melanoma) em Mulheres, Brasil e regiões geográficas.	26
Tabela 3: Códigos e respectivas estruturas químicas das moléculas/séries cedidas pela colaboração de Cardoso, 2012.	45
Tabela 4: Linhagens tumorais e célula não neoplásica utilizada no ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	50
Tabela 5: Atividade citotóxica das moléculas da série TAP (Tiazolilacetilpiridina).	62
Tabela 6: Atividade citotóxica das moléculas da série TP (Tiazolilpiridina).	63
Tabela 7: Atividade citotóxica das moléculas da série TS (Tiossemicarbazona).	64
Tabela 8: Atividade citotóxica das moléculas da série TZ (Tiazolil da tiossemicarbazona).	65
Tabela 9: Efeito de TAP-07 e TP-07 no corpo e peso de órgão relativo de camundongos SCID C.B-17 portadores de células HepG2	73
Tabela 10: Efeito de TAP-07 e TP-07 em parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos C.B-17 SCID portadores de células HepG2	73
Tabela 11: Efeito de TAP-07 e TP-07 em parâmetros bioquímicos clínicos de sangue periférico de camundongos SCID C.B-17 portadores de células HepG2	74

LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS

5-FU	5-Fluorouracil
Dox	Doxorrubicina
ANOVA	<i>Analisis of Variance</i> (Análise de variância)
CI ₅₀	Concentração inibitória de 50%
CO ₂	Dióxido de carbono
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
E.P.M.	Erro padrão da média
IC	Intervalo de confiança
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio
TS	Tiossemicarbazona
TZ	Tiazolil da Tiossemicarbazona
TAP	Tiazolil acetilpiridina
TP	Tiazolil piridina
PBS	Phosphate buffer solution (Tampão fosfato)
TBS	Tris buffer solution (Tampão tris)

SUMÁRIO

1	Introdução	19
2	Revisão de literatura	21
2.1	Aspectos Gerais sobre o câncer	21
2.2	Aspectos Epidemiológicos do câncer	25
2.3	Células neoplásicas e ciclo celular	28
2.3.1	Apoptose	30
2.3.2	Vias gerais de ativação da apoptose: Via extrínseca e intrínseca	32
2.3.3	Princípios da quimioterapia: Alvos farmacológicos utilizados no tratamento do câncer	33
2.4	Tiossemicarbazonas, Piridinas e Tiazóis; Aspectos químicos e farmacológicos	36
2.4.1	Tiossemicarbazonas	36
2.4.2	Piridinas	38
2.4.3	Tiazóis	39
3	Objetivos	40
3.1	Objetivo Geral	40
3.2	Objetivos Específicos	40
4	Materiais e Métodos	41
4.1	Materiais	42
4.2	Obtenção dos derivados LpQM: TAP, TP, TS TZ	42
4.3	Modelos Biológicos	48
4.4	Células	48

4.4.1 Manutenção das culturas em células tumorais	48
4.5 Avaliação da atividade antiproliferativa em células tumorais <i>in vitro</i>	49
4.6 Obtenção das células PBMC e eritrócitos humanos	50
4.6.1 Ensaio de citotoxicidade em células mononucleares do sangue periférico	50
4.7 Avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos humanos	51
4.8 Viabilidade celular - Exclusão por Azul de Tripán	51
4.9 Análise morfológica - Coloração por May-Grunwald-Giemsa	52
4.10 Análises por Citometria de Fluxo	52
4.10.1 Determinação da Externalização da Fosfatidilserina – Anexina V por citometria de fluxo	53
4.10.2 Análise do Ciclo Celular por citometria de fluxo	54
4.11 Modelo xenográfico de tumor hepatocelular humano em camundongos	54
4.12 Avaliação da toxicidade sistêmica: parâmetros hematológicos, bioquímicos e análise histopatológica dos órgãos	56
4.12.1 Análise histopatológica	56
5. RESULTADOS	57
5.1 Avaliação da atividade citotóxica das séries TAP,TP, TS e TZ em células tumorais humanas	57
5.2. Avaliação de morte celular na linhagem HepG2 pelos compostos 2-piridil-2,3-tiazol pelo método de exclusão do corante azul de tripan	62
5.3 Indução de morte celular por apoptose na linhagem celular HepG2 pelos compostos 2-piridil-2,3-tiazol	63
5.4 Ensaio in vivo	68
5.4.1 Avaliação da redução do desenvolvimento de células HepG2 pelos compostos 2-piridil-2,3-tiazol em modelo xenográfico	68
5.4.2 Avaliação dos parâmetros toxicológicos de animais tratados com compostos 2-piridil-2,3-tiazol em modelo xenográfico de HepG2	68

5.4.3 Avaliação histopatológica dos órgãos de camundongos portadores de células HepG2 tratados pelos compostos 2-piridil-2,3-tiazol	74
6 DISCUSSÃO	76
7 CONCLUSÕES	80
REFERÊNCIAS	81
ANEXOS	93

1. INTRODUÇÃO

Câncer, tumores malignos e neoplasias são termos utilizados para designar um grupo de doenças que pode afetar várias partes do corpo. O câncer é uma doença grave e complexa, tratando-se de uma patologia multifatorial em que estão envolvidas diversificadas vias bioquímicas e imunológicas (WHO, 2012). Esta doença é caracterizada por um crescimento anormal de células além dos seus limites, o que pode ocasionar a invasão de partes adjacentes do corpo ou mesmo a migração de células tumorais para outros órgãos, processo denominado metástase, que é a principal causa de morte por câncer (WHO, 2015).

O surgimento do câncer pode ser desencadeado por diversas desordens, tanto de ordem exógena quanto endógena. Fatores ambientais, biológicos e predisposições genéticas associadas a desequilíbrios hormonais são situações que podem comprometer o comportamento celular, gerando situações onde haja favorecimento para surgimento de neoplasias malignas (COTRAN et al., 2005; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2000; SILVA, 2006).

O câncer pode ser iniciado em praticamente qualquer parte do organismo humano, que é constituído de trilhões de células. De acordo com as necessidades do corpo, as células normais crescem e se dividem para dar origem a novas células. Seguindo este ciclo, as células que sofrem danos ou envelhecem, naturalmente morrem para dar lugar a outras. Entretanto, quando o câncer ocorre, há uma falha deste processo. Novas células passam a ser formadas sem que haja necessidade, e aquelas que deveriam morrer permanecem vivas. Esse excesso de células em divisão descontrolada dá origem aos tumores malignos (NCI, 2015).

Neoplasias malignas são a principal causa de morte no mundo, e entre seus principais sítios de incidência, podemos citar pulmões, fígado, estômago, cólon, mama e esôfago como os cânceres responsáveis pelo maior número de mortes. Dentre as principais causas do câncer figuram os carcinógenos físicos como a radiação ionizante, carcinógenos químicos como os componentes do tabaco, arsênico e aflatoxinas, e carcinógenos biológicos como vírus, bactérias e outros parasitas. O avanço da idade é também considerado um fator de risco para o câncer, uma vez que a doença está relacionada aos mecanismos de reparo do DNA e com o aumento da idade há uma tendência à diminuição da efetividade destes mecanismos (WHO, 2015).

O arsenal quimioterápico disponível para o tratamento do câncer apresenta vários problemas quanto à especificidade, potencialidade e presença de efeitos indesejados (GOTTESMAN, 2002).

Atualmente as neoplasias malignas constituem um problema de saúde pública dada sua crescente importância como causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo. No Brasil, as estimativas para o ano de 2017 apontam a ocorrência de aproximadamente 596 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país (INCA, 2016). Diante de tal cenário, fica clara a necessidade de continuidade em investimentos no desenvolvimento de ações abrangentes para o controle do câncer, incluindo o desenvolvimento de novos fármacos. A síntese química contribui tanto para o fornecimento de fármacos quanto para o surgimento de novas moléculas bioativas para serem utilizadas no tratamento de diversas doenças.

Compostos contendo a porção tiossemicarbazona, tiazóis e piridinas têm sido amplamente descritos na literatura em associação com uma grande variedade de atividades biológicas, tornando evidente o papel desse grupo químico como farmacóforo responsável pelas respostas biológicas observadas nos mais diversos derivados.

Diante de tal cenário, fica claro a necessidade de pesquisar novos grupos de fármacos para o controle e o tratamento do câncer. A prevenção de novos casos, o aumento da sobrevida e a melhora na qualidade de vida das pessoas com câncer são um dos novos desafios das pesquisas atualmente.

O presente trabalho baseia-se na possibilidade de investigar o potencial anticâncer de novos derivados através de estudo do potencial antitumoral e citotóxico de derivados híbridos da piridina, tiossemicarbazona e tiazóis em células tumorais de diferentes origens e avaliar a seletividade, citotoxicidade em células não neoplásicas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais sobre o câncer

Neoplasia significa "novo crescimento", e é então chamado de neoplasma (KUMAR et al., 2005). Em 1930 o patologista Rupert Willis definiu neoplasia maligna como massa tumoral anormal de tecido, cujo crescimento excede ao crescimento dos tecidos normais e persiste mesmo cessada a causa que o provocou, desta forma sendo considerada a definição mais aceita (CONTRAN et al., 1999). Câncer é um termo comum para todos os tumores malignos, derivados do termo latim para caranguejo.

O câncer representa um conjunto de mais de 100 doenças e pode também ser definido como enfermidade complexa de caráter mutacional, proliferativo, de crescimento celular aberrante e descontrolado, em que células em um mesmo microambiente, invadem os tecidos e órgãos adjacentes, podendo migrar para regiões distantes do organismo, evento este conhecido como metástase (INCA, 2017).

A célula cancerígena propriamente dita caracteriza-se pela perda de função em consequência da ausência desdiferenciação, proliferação incontrolada, invasividade dos tecidos adjacentes e metástases. A origem dessa célula e o desenvolvimento de um tumor benigno ou maligno é consequência de alterações genéticas que podem ser produzidos por mecanismo como inativação de genes supressores de tumor, ativação de oncogenes.(SIEBER, HEINIMANN, TOMLINSON, 2003).

Considerado como uma doença genética o desenvolvimento do câncer se deve a mutações em determinados genes nucleares. Uma mutação em um gene que modula a proliferação ou a diferenciação da célula pode fazer com que seu produto seja hiperativo ou produzido em excesso e, como resultado, tem-se a transformação do fenótipo celular. Esses genes mutantes são, por isso, classificados como oncogenes; ou seja, genes causadores de câncer. Em contra partida os genes normais expressos durante o desenvolvimento embrionário são denominados proto-oncogenes (WESTPHAL et. al., 2003).

Muitos proto-oncogenes codificam moléculas que induzem a diferenciação celular, receptores para essas moléculas, proteínas relacionadas a transdução de sinais e fatores de transcrição. Quando ocorrem mutações nos proto-oncogenes, com sua consequente hiperativação ou superexpressão, pode ser observado o desenvolvimento de uma neoplasia (WESTPHAL et. al., 2003). Um grande número de agentes apresenta capacidade de provocar lesão e induzir transformação neoplásica das células, entre eles citam-se: carcinógenos químicos, energia

radioativa, vírus oncogênicos e alguns agentes microbianos. Os genes supressores de tumor quando ativos inibem a ocorrência de divisão celular. O equilíbrio na atuação desses dois grupos de genes resulta no perfeito funcionamento do ciclo celular (SANTOS; WADA, 2005). Sendo assim, o desenvolvimento de um câncer envolve um número de diferentes alterações genéticas ocorrendo sequencialmente na célula, incluindo a deleção de genes específicos (genes supressores de tumores), a mutação de oncogenes (que podem transformar células normais em tumorais), além de outras aberrações cromossômicas. Essas mudanças sequenciais estão aparentemente associadas à progressão até maiores graus de malignidade (HILL; TANNOCK, 2013).

Dentre os tratamentos do câncer, a cirurgia foi o primeiro tratamento que alterou de forma significativa a doença e ainda é um importante método terapêutico utilizado. A radioterapia, outra modalidade terapêutica que pode ser prescrita em associação ou isoladamente, tem o objetivo de levar as células malignas a perder sua clonogenicidade, nem sempre preservando os tecidos normais (INCA, 2017). A quimioterapia também tem seu papel de destaque como um dos principais métodos para o tratamento de diversos tipos de câncer (HUANG et al., 2013). É a opção utilizada principalmente para tratamento de tumores não curáveis por radioterapia e/ou cirurgia. O principal objetivo dessa terapia é destruir as células que estão se multiplicando de forma desordenada e preservar as normais (CALABRESI; CHABNER, 1997).

O tratamento quimioterápico é fundamentado na utilização de compostos, na forma de mono ou politerapia, baseada na cinética celular, considerando o ciclo e o tempo de vida celular, a fração de crescimento e o tamanho da massa tumoral (INCA, 2017). Apesar das vantagens, o principal problema advindo deste tratamento consiste na inespecificidade da maioria dos antineoplásicos, trazendo assim uma citotoxicidade generalizada (ELTING et al., 2003).

A célula neoplásica adquire vantagens metabólicas e capacidades biológicas quando comparadas às células não neoplásicas como: a) perda do controle da proliferação e divisão celular; b) imortalização celular devido à ativação da enzima telomerase; c) alterações cromossômicas (de forma e número); d) perda das propriedades adesivas da membrana plasmática, que permite o reconhecimento célula-célula e a inibição por contato do movimento e crescimento celular; e) perda de função e da capacidade de diferenciação ou especialização; f) capacidade para invadir tecidos vizinhos ou distantes e formar metástases; g) capacidade de induzir a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese). Observa-se, ainda, que todos os casos de câncer estão envolvidos com as vias de transmissão de sinais biológicos, no controle positivo e negativo do ciclo celular e da morte celular programada (RIBEIRO *et al.*, 2003).

A classificação do câncer é feita de acordo com o tipo de célula que o originou, baseada no componente parenquimatoso, e não de acordo com os tecidos para os quais se espalhou. Pode-se

chamar de classificação primária (KUMMAR *et al.*, 2009). Os tumores benignos são designados com a inclusão do sufixo "oma" na célula de origem, por exemplo, um tumor benigno que surge a partir das células fibroblásticas é denominado fibroma. Adenoma é o termo aplicado a um neoplasma epitelial benigno que forma padrões glandulares assim como tumores derivados de glândulas, mas não necessariamente reproduzindo os padrões glandulares. A nomenclatura dos tumores malignos segue o mesmo padrão usado para os neoplasmas benignos, com adição de algumas expressões. Os tumores malignos que surgem do tecido mesenquimal são chamados de sarcomas. Os neoplasmas malignos, originados a partir de células epiteliais são chamados de carcinomas (KUMAR *et al.*, 2005).

Existem grandes diferenças entre as características morfológicas, moleculares e funcionais dos diversos tipos de células neoplásicas, tais como: a) polimorfismo (células diferem muito em tamanho e formas); b) aneuploidia (quantidade anormal de cromossomas); c) citoplasma geralmente basófilo, devido à riqueza em ribossomas, visto que se multiplicam muito e d) citoesqueleto desorganizado, características estas que variam de célula para célula neoplásica.

O diagnóstico laboratorial do câncer se torna, a cada ano, mais sofisticado e complexo. Dentre os principais métodos utilizados encontram-se: métodos histológicos e citológicos, imunohistoquímica, diagnóstico molecular, citometria de fluxo e marcadores tumorais (KUMAR *et al.*, 2005).

Embora ainda não se tenha alcançado uma compreensão completa a respeito das mutações que controlam o câncer, sabe-se que vias regulatórias críticas para a proliferação, crescimento e sobrevivência da célula podem ser perturbadas por estas alterações. Em células tumorais, observa-se um desequilíbrio entre proliferação desenfreada, instabilidade genômica, alterações do ciclo celular e evasão da morte celular por apoptose (HAHN, 2004). Essas transformações mutam as células normais em cancerosas através da desregulação de um amplo espectro de vias reguladoras e efetoras, e é esta complexidade que tem dificultado o desenvolvimento de terapias específicas e efetivas contra o câncer (PULVERER *et al.*, 2001).

A gênese tumoral pode levar vários anos até que se identifique a presença de um tumor. Considera-se que existem três estágios para a carcinogênese: a iniciação, onde a célula sofre mutações por carcinógenos; a promoção, onde a continuidade da exposição aos carcinógenos impede o reparo celular e inicia a produção de células malignas e a progressão, que consiste na multiplicação desenfreada das células e aparecimento de sintomas clínicos (ALMEIDA, *et al.*, 2005; SOARES, 2013)

Apesar dos mecanismos complexos de iniciação do câncer, muito tem-se pesquisado sobre como ele se origina e sobre o seu comportamento. Hanahan e Weinberg (2011) enumeraram as capacidades biológicas adquiridas por células tumorais durante seu desenvolvimento.

Fuga dos supressores do crescimento, resistência à morte celular/ imortalidade replicativa, indução de angiogênese, ativação de processo invasivo e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2011; LUO; SOLIMINI; ELLEDGE, 2009), reprogramação do metabolismo energético e evasão da destruição pelo sistema imune (LUO; SOLIMINI; ELLEDGE, 2009) são características adquiridas por células tumorais para manutenção da sinalização proliferativa (Figura 1).

Muitas destas características são provavelmente suportadas pela instabilidade genômica (que acelera a aquisição das características dos marcadores supracitados) e inflamação (que alimenta muitas das funções dos marcadores). Além das células tumorais, os tumores apresentam uma outra dimensão de complexidade. Eles contêm um repertório de recrutamento de células aparentemente normais que contribuem para a aquisição de traços característicos, criando o que chamamos de "microambiente do tumor", que torna propício o seu crescimento e desenvolvimento (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Figura 1: Características das células tumorais.



Adaptado de HANAHAN & WEINBERG (2011).

2.2 Aspectos epidemiológicos do câncer

As principais observações relativas ao câncer podem ser sugeridas pelos estudos epidemiológicos existentes, que relacionam a um ambiente particular, a hereditariedade e influências culturais com a ocorrência de tumores malignos. Algumas doenças que se mostrem associadas com um risco maior de desenvolver o câncer, podem fornecer dados sobre a malignidade (KUMAR *et al.*, 2009).

Desde 2003 o câncer tem sido a segunda causa de morte por doença, atrás apenas de mortes relacionadas a doenças cardiovasculares, com uma incidência anual estimada em 6 milhões de casos (SRIVASTAVA *et al.*, 2013).

Estima-se que, em 2020, o número de casos novos anuais de câncer seja da ordem de 15 milhões, sendo que cerca de 60% desses novos casos ocorrerão em países em desenvolvimento. É também conhecido que aproximadamente um terço dos casos novos de câncer que ocorrem anualmente no mundo poderiam ser prevenidos (PARKING; BRA; DEVESA, 2001; ALMEIDA *et al.*, 2005; INCA, 2017).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2016/2017, apontam que ocorrerão 596 mil casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão, no sexo masculino, e os cânceres de mama e de colo do útero, no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo (BRASIL, 2017) (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1: Estimativa para o ano 2016/2017 das taxas brutas de incidência *por 100 mil habitantes e de número de casos novos por câncer, segundo a localização primária. Taxas de incidência estimada para 2017* para os tipos de câncer mais frequentes (exceto pele não melanoma) em Homens, Brasil e regiões geográficas.

	Brasil	Região Norte	Região Nordeste	Região Centro-Oeste	Região Sudeste	Região Sul
1º	Próstata (61,82)	Próstata (29,50)	Próstata (51,84)	Próstata (67,59)	Próstata (62,36)	Próstata (95,63)
2º	Traqueia, Brônquio e Pulmão (17,49)	Estômago (11,62)	Estômago (10,67)	Traqueia, Brônquio e Pulmão (14,53)	Cólon e Reto (24,27)	Traqueia, Brônquio e Pulmão (35,17)
3º	Cólon e Reto (16,84)	Traqueia, Brônquio e Pulmão (8,07)	Traqueia, Brônquio e Pulmão (9,75)	Cólon e Reto (14,16)	Traqueia, Brônquio e Pulmão (19,02)	Cólon e Reto (22,35)
4º	Estômago (13,04)	Cólon e Reto (5,34)	Cólon e Reto (7,05)	Estômago (11,50)	Cavidade Oral (14,58)	Estômago (17,13)
5º	Cavidade Oral (11,27)	Bexiga (4,32)	Cavidade Oral (6,86)	Cavidade Oral (9,15)	Estômago (13,79)	Esôfago (16,86)

Fonte: BRASIL, 2016/2017. INCA 2016.

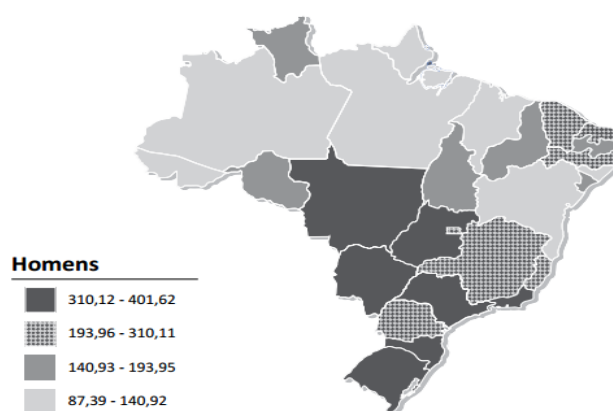
Tabela 2: Estimativa para o ano 2016/2017 das taxas brutas de incidência *por 100 mil habitantes e de número de casos novos por câncer, segundo a localização primária. Taxas de incidência estimada para 2017* para os tipos de câncer mais frequentes (exceto pele não melanoma) em Mulheres, Brasil e regiões geográficas.

	Brasil	Região Norte	Região Nordeste	Região Centro-Oeste	Região Sudeste	Região Sul
1º	Mama feminina (56,20)	Colo do útero (23,97)	Mama feminina (38,74)	Mama feminina (55,87)	Mama feminina (68,08)	Mama feminina (74,30)
2º	Cólon e Reto (17,10)	Mama feminina (22,26)	Colo do útero (19,49)	Colo do útero (20,72)	Cólon e Reto (22,66)	Cólon e Reto (23,27)
3º	Colo do útero (15,85)	Cólon e Reto (5,89)	Cólon e Reto (8,77)	Cólon e Reto (16,93)	Colo do útero (11,30)	Traqueia, Brônquio e Pulmão (20,61)
4º	Traqueia, Brônquio e Pulmão (10,54)	Estômago (5,82)	Traqueia, Brônquio e Pulmão (7,24)	Traqueia, Brônquio e Pulmão (9,37)	Traqueia, Brônquio e Pulmão (10,56)	Colo do útero (15,17)
5º	Estômago (7,37)	Traqueia, Brônquio e Pulmão (5,07)	Estômago (6,73)	Ovário (6,96)	Corpo do útero (9,58)	Estômago (8,71)

Fonte: BRASIL, 2016/2017. INCA 2017.

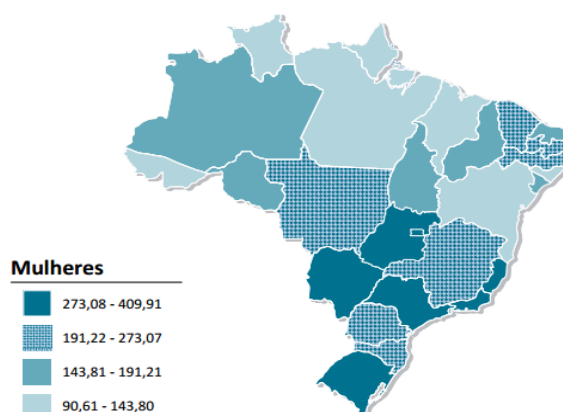
A distribuição dos casos novos de câncer segundo sua localização primária é bem heterogênea entre Estados e Capitais do País. As regiões Sul e Sudeste, de maneira geral, apresentam as maiores taxas, enquanto as regiões Norte e Nordeste mostram as menores (Fig. 2 e Fig. 3). As taxas de câncer da região Centro-Oeste apresentam um padrão intermediário, tanto para homens quanto para mulheres (BRASIL. INCA, 2017).

Figura 2: Representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2016/2017, segundo Unidade da Federação (todas as neoplasias malignas).



Fonte: Brasil, 2016/2017.INCA 2017

Figura 3: Representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2016/2017, segundo Unidade da Federação (todas as neoplasias malignas)



Fonte: Brasil, 2016/2017.INCA 2017

2.3 Células neoplásicas e ciclo celular

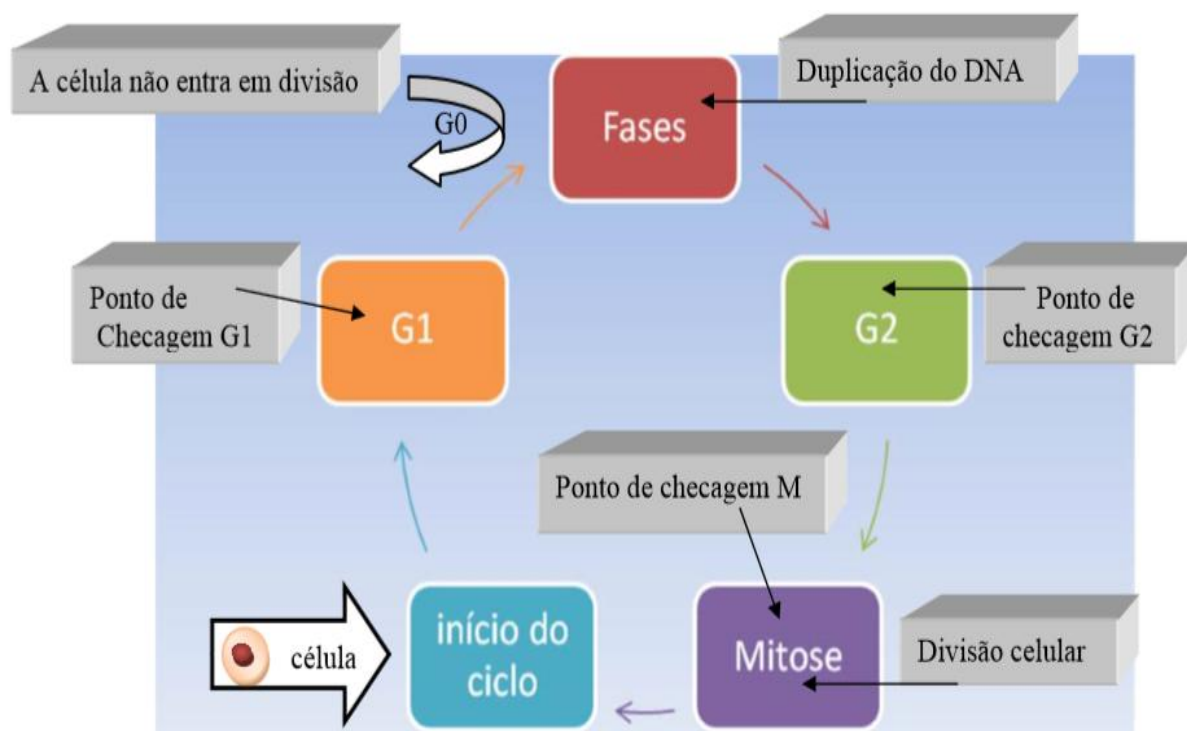
O processo de divisão celular é dinâmico e ocorre de forma ordenada. Inicialmente acontece um período de crescimento seguido pela divisão, sendo o conjunto denominado de ciclo celular (ALMEIDA *et al.*, 2005).

O processo básico da gênese de novas células, em que há alternância dos estágios de interfase e de divisão das células é denominado de ciclo celular e é de fundamental importância seu conhecimento para entendimento do mecanismo de ação de fármacos antineoplásicos e também para estudos relacionados ao câncer (RANG; RITTER; DALE, 2012).

O ciclo celular (Fig. 4) consiste de algumas fases: G₁ (pré-síntese de DNA), S (síntese de DNA), G₂ (pré- mitótica) e M (mitótica) (MALUMBRES; BARBACID, 2009). A mitose é subdividida em outras seis fases que incluem prófase, que controla a segregação do envelope nuclear; pró-metáfase, a ligação dos cromossomos aos fusos polares; metáfase, onde os cromossomos atingem o máximo encurtamento e há formação do fuso mitótico, com algumas fibras que vão de polo a polo e outras que se ligam aos cromossomos pelos centrômeros; anáfase, o alinhamento dos cromossomos a placa metafásica; telófase- a separação das cromátides irmãs e citocinese, a separação das células em duas células filhas (MOIR *et al.*, 2000). As denominadas células quiescentes são aquelas que se encontram momentânea ou definitivamente fora ciclo celular, e estão, portanto, em G₀.

Cada fase do ciclo depende de uma ativação e completude das fases anteriores. Devido ao seu papel de manutenção da homeostase dos tecidos e regulação dos processos de crescimento fisiológico como regeneração e reparo, o ciclo celular possui um ponto de restrição (entre G₀ e G₁) e checkpoints (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003) que regulam a entrada na fase S, a entrada na mitose e a saída da mitose (Fig. 4). Esses pontos de checagem são essenciais para impedir a progressão de células com DNA danificado (HOCHEGGER; TAKEDA; HUNT, 2008). A principal função do ciclo celular é garantir que o DNA seja fielmente duplicado durante a fase S e que cópias idênticas dos cromossomos sejam igualmente distribuídas entre as células filhas durante a mitose (MALUMBRES; BARBACID, 2009).

Figura 4: Esquema representativo do ciclo celular.



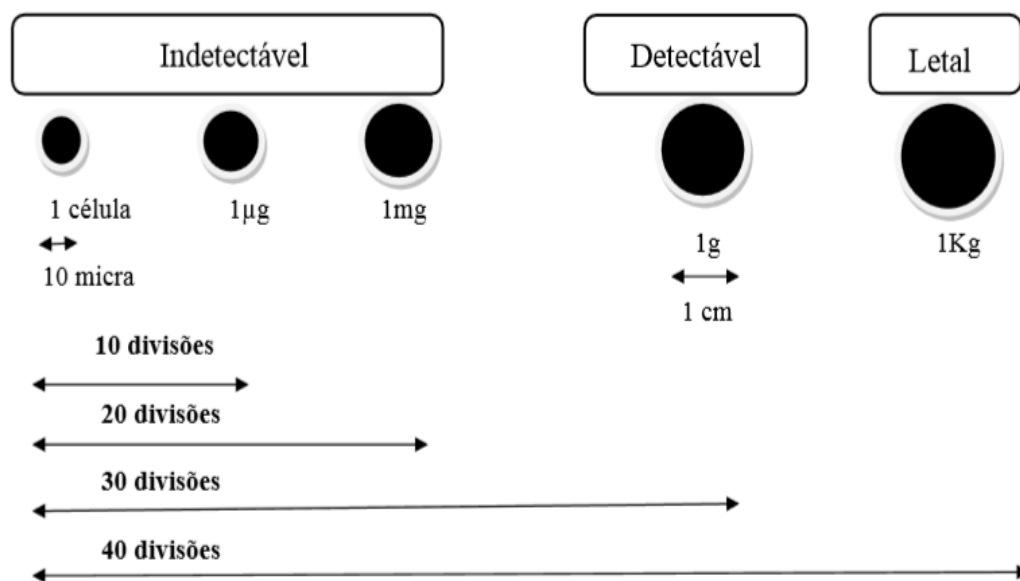
Fonte: Adaptado de ALMEIDA et al., 2012.

O ciclo celular é regulado por mecanismos denominados *checkpoints* (pontos de controle) que protegem a transição entre as fases do ciclo garantindo que o estágio precedente tenha sido completado sem erros (KHODJAKOV; RIEDER, 2009). A parada nos pontos de controle permite que as células reparem os defeitos, impedindo a sua transmissão para as células filhas e contribuindo com a manutenção da estabilidade genômica (MALUMBRES; BARBACID, 2009).

Processos oncogênicos ocorrem principalmente em reguladores da progressão da fase G1. No câncer, as células não respondem a estímulos externos que controlam a transição G1/S e, por isso, permanecem no ciclo celular. Como a saída do ciclo celular facilita a maturação e a diferenciação, estes mecanismos também estão prejudicados durante a tumorigênese. Após a passagem do ponto de restrição em G1, a célula se torna comprometida com novo ciclo de divisão, independente dos sinais externos de crescimento. A passagem pelo ponto de restrição é controlada por quinases dependentes de ciclina (CDKs) (SHERR, 1996). Quando a replicação, a reparação do DNA ou a reunião dos cromossomos for aberrante, as células normais detêm o seu avanço no ciclo celular até que a condição seja corrigida. Porém, se o dano ao DNA ou ao cromossomo for extenso, a reparação fica impossível e a célula inicia a apoptose. As alterações do funcionamento de genes controladores do ciclo celular, em decorrência de mutações, são relacionadas ao surgimento de um câncer (SHERR, 1996).

Evidências científicas demonstram que a grande maioria dos tumores é originária de uma única célula, então denominados de tumores monoclonais (Fig. 5) (PONDER et. al., 1986). A instabilidade genômica é uma das características mais comuns dos tumores humanos (HANAHA; WEINBERG, 2011). A incapacidade da maioria das células cancerosas em tornarem-se células adultas não replicantes significa que as mesmas permanecem em um estado altamente proliferativo e superam as células normais (LORD; ASHWORTH, 2012).

Figura 5: Esquema representativo de crescimento de um tumor maligno primário



Fonte: Adaptado de Schabel (1977). BRASIL. INCA; Fisiopatologia do câncer 2017.

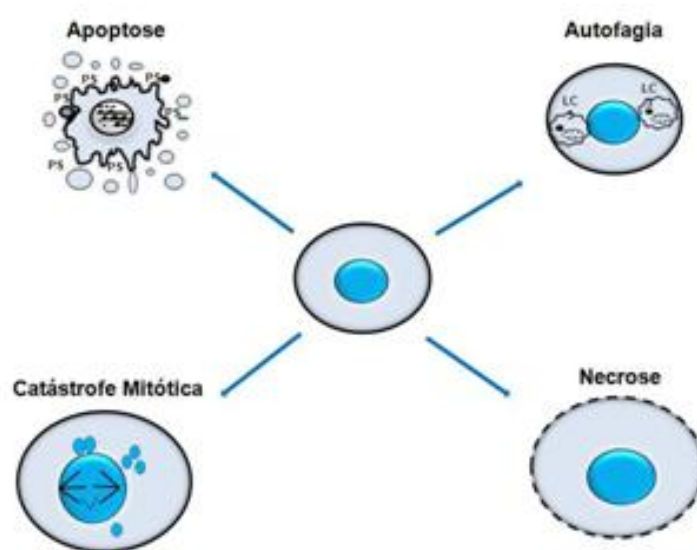
2.3.1 Apoptose

O equilíbrio entre a proliferação e a morte celular regula e controla o número de células no organismo. A cascata de eventos, bioquímicos e fisiológicos, que leva a mudanças na síntese de macromoléculas, na homeostase celular, na regulação do volume celular, e finalmente na perda da viabilidade celular está intimamente relacionada às mudanças morfológicas características de cada tipo de morte celular (BRASILEIRO-FILHO, 2006; TINARI *et al.*, 2008).

Com o propósito de pesquisar e compreender as patologias, diversos tipos de morte celular vêm sendo descritos, tais como a apoptose, autofagia, necrose, catástrofe mitótica, excitotoxicidade e senescência. No entanto, a apoptose é o tipo mais intensamente estudados (KRYSKO *et al.*, 2008).

A morte celular pode ser classificada de acordo com sua aparência morfológica (apoptose, necrose, autofagia ou catástrofe mitótica (Fig. 6)), critérios com base em enzimas (com ou sem o envolvimento de nucleases ou de classes distintas de proteases, tais como caspases, catepsinas e glutaminases), aspectos funcionais (programada ou acidental, fisiológica ou patológica) ou características imunológicas (imunogênicas ou nãoimunogênicas) (MELINO, 2001; OKADA; MAK, 2004; GALLUZZI et.al., 2007)

Figura 6: Características morfológicas dos principais tipos de morte celular.



PS: fosfatidilserina; LC3: proteína citoplasmática que é considerada um marcador da macroautofagia. Fonte: Bruin & Medema, 2008.

A autofagia é uma resposta ativa a falta de nutrientes, diferenciação e desenvolvimento, sendo então um processo adaptativo de resposta ao estresse metabólico, que resulta na degradação de proteínas e organelas. A autofagia é definida como um processo em que proteínas e organelas são degradadas por proteases lisossomais (RICCI & ZONG, 2006).

A catástrofe mitótica não é considerada uma forma de morte, mas sim um sinal irreversível para a morte (RICCI & ZONG, 2006), sendo principalmente associada nos pontos de checagem do ciclo celular. É um processo resultante de mitose aberrante, durante a separação das cromátides irmãos (BREDESEN, 2007). O dano que leva a catástrofe mitótica pode ser induzido por fármacos quimioterápicos como agentes da hiperpolimerização dos microtúbulos (paclitaxel), agentes

despolimerizantes de microtubulos (vinblastina e vincristina) e inibidores de checkpoint quinase 1 (Chk1) (7-hidroxiestaurosporina) (RICCI & ZONG, 2006).

As principais características da necrose incluem: depleção energética, danos a membrana lipídica e perda da função homeostática de canais e bombas de íons. É bem caracterizada pela vacuolização do citoplasma, perda de integridade de membrana e aumento do volume celular (KRYSKO *et al.*, 2008). A necrose é induzida por inibidores da produção de energia celular, desbalanço no fluxo de cálcio, geração de ROS e ativação de proteases não apoptóticas, cada um destes eventos potencializa o outro. A β -lapachona e o honokiol são exemplos de compostos que induzem necrose em células tumorais (RICCI & ZONG, 2006).

Descrita por Kerr e colaboradores em 1972 a apoptose é um importante fenômeno, bem caracterizado, na citotoxicidade induzida por fármacos anticâncer (KIM *et al.*, 2009), sendo também um processo seletivo de deleção celular fisiológica (HENGARTNER, 2000), visto que ocorre para o controle da população celular e do tecido (VERMES *et al.*, 2000), desenvolvimento embrionário (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004), dentre outros processos fisiológicos e patológicos.

Do grego *apo* "de" e *ptose* "cair", a apoptose é conhecida como morte celular programada, fenômeno esse em que a célula é estimulada a acionar mecanismos que culminam com sua morte. A célula em apoptose não sofre autólise, ela é fragmentada e seus fragmentos são endocitados por células vizinhas, sem desencadear quimiotatismo nem ativação de células fagocitárias, diferentemente da necrose (BRASILEIRO-FILHO, 2006). A apoptose pode ser reconhecida por algumas características marcantes e coordenadas, pode ser observado retração celular e consequente perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. As organelas mantêm a morfologia, porém em alguns casos, as mitocôndrias podem apresentar ruptura na membrana externa. A cromatina sofre condensação, além disso, na membrana plasmática, formam-se prolongamentos, os chamados *blebs*, que aumentam de tamanho e se rompem, originados os corpos apoptóticos, onde são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar processo inflamatório (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004).

2.3.2 Vias gerais de ativação da apoptose: via extrínseca e intrínseca.

As vias gerais da apoptose são duas, extrínseca e intrínseca, e quando a via intrínseca é ativada, o primeiro passo é o aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial seguida da

liberação de proteínas que normalmente estavam localizadas no espaço intermembranar [citocromo c, fator de indução da apoptose, Smac/DIABLO (*Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP Binding Protein with Low Propidium iodideI*), entre outros]. O citocromo c se liga a Apaf-1 (*Apoptotic peptidase activating factor 1*) e forma um complexo multicatalítico chamado apoptossomo. Este complexo ativa a caspase-9 a partir de sua forma zimogênica pró-caspase-9. Então, a caspase-9 cliva as caspases efetoras -3, -6 e -7, ativando-as para realizar a fragmentação do DNA (KUMAR *et al.*, 2009; ZIEGLER; GROSCURTH, 2004; BRASILEIRO-FILHO, 2006).

A via de receptor de morte ou via extrínseca envolve a ativação de receptores de membrana. Eles são membros da superfamília de receptores de fatores de necrose tumoral (*Tumor Necrosis Factor receptor* - rTNF). Estão inclusos nessa família os receptores de membrana rTNF-1, FAS (CD95), TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*), entre outros. Esses receptores possuem um domínio distinto dentro do citoplasma denominado de domínio de morte (*Death Domain* - DD) que contém uma sequência de 65 aminoácidos. Após a associação dos receptores de membrana ao seu correspondente DD, ocorre uma mudança conformacional nos receptores, o que promove o recrutamento de uma molécula adaptadora FAS que irá associar-se com o domínio de morte (DD) formando o FADD. Este complexo formado é o responsável por iniciar a cascata de caspases, pois o FADD se liga a procaspase-8 e forma caspase-8, ativando as caspases efetoras -3, -6 e -7 (STRASSER *et al.*, 2000; ZIEGLER; GROSCURTH, 2004).

2.3.3 Princípios da Quimioterapia e alvos farmacológicos utilizados no tratamento do câncer

A utilização de agentes químicos, isolados ou em combinação com o objetivo de tratar os tumores malignos, denomina-se de quimioterapia antineoplásica. Difere da radioterapia e da terapia cirúrgica por ser um tratamento sistêmico e cada vez mais tem se tornado uma das mais importantes e promissoras ferramentas de combate ao câncer no mundo (BONASSA; SANTANA, 2005). Existem as terapias com fotorradiação (KUSUZAKI *et al.*, 2007) e a imunoterapia (HERR & MORALES, 2008). A proposta do tratamento com os agentes antineoplásicos é de impedir a multiplicação de células cancerosas, a metastização e de proporcionar a destruição do tumor existente (SKEEL, 2007). Diante do exposto anteriormente, é importante que novas estratégias como o restabelecimento do controle do ciclo celular com fármacos que agem nos pontos de checagem, possam ser disponibilizadas como uma estratégia viável na terapia anticâncer (FISCHER *et al.*, 2004).

No século passado, houve uma grande revolução no desenvolvimento de agentes citotóxicos para a terapia do câncer. Foi possível alcançar o controle de certas neoplasias, como as neoplasias da infância, leucemia aguda, doença de Hodgkin, linfomas não-Hodgkin, neoplasia trofoblástica gestacional e tumores de células germinativas (ISMAEL *et al.*, 2008). O desenvolvimento da terapia antineoplásica frente a mudanças severas, como a limitação da indicação de algumas drogas e o fato das substâncias citotóxicas causarem danos não só unicamente no tumor como no tecido normal e saudável, tornou-se cada vez mais frequente a busca por agentes mais seletivos (ISMAEL *et al.*, 2008).

A quimioterapia clássica, porém, traz ao paciente uma série de limitações quanto a sua frequência de uso e a tolerância orgânica frente às reações adversas. Normalmente, dependendo do tipo de reação provocada pelo medicamento, o paciente precisa de um intervalo entre os ciclos, maior ou menor, visto que as doses utilizadas nos pacientes é individual e são calculadas baseando-se na superfície corporal de cada indivíduo.

Adicionalmente, a descoberta de novos fármacos através da extração de produtos naturais tem tido limitações quando comparados com as substâncias sintéticas pesquisadas. Alguns achados mostram que dentro da indústria farmacêutica a descoberta de produtos naturais promissores para o tratamento de muitas doenças são caros e desafiam o tempo e custo dessas pesquisas (LAM, 2007).

Estudo da relação estrutura-atividade, obtidos por técnicas recentes de modelagem molecular apesar de serem dispendiosas e requererem extensos período de investigação, são, ainda, de suma importância na descoberta e na caracterização de novos fármacos, onde novos agentes terapêuticos podem ser desenvolvidos pela análise inicial de dados teóricos (WERMUTH *et al.*, 1998; THOMAS, 2000).

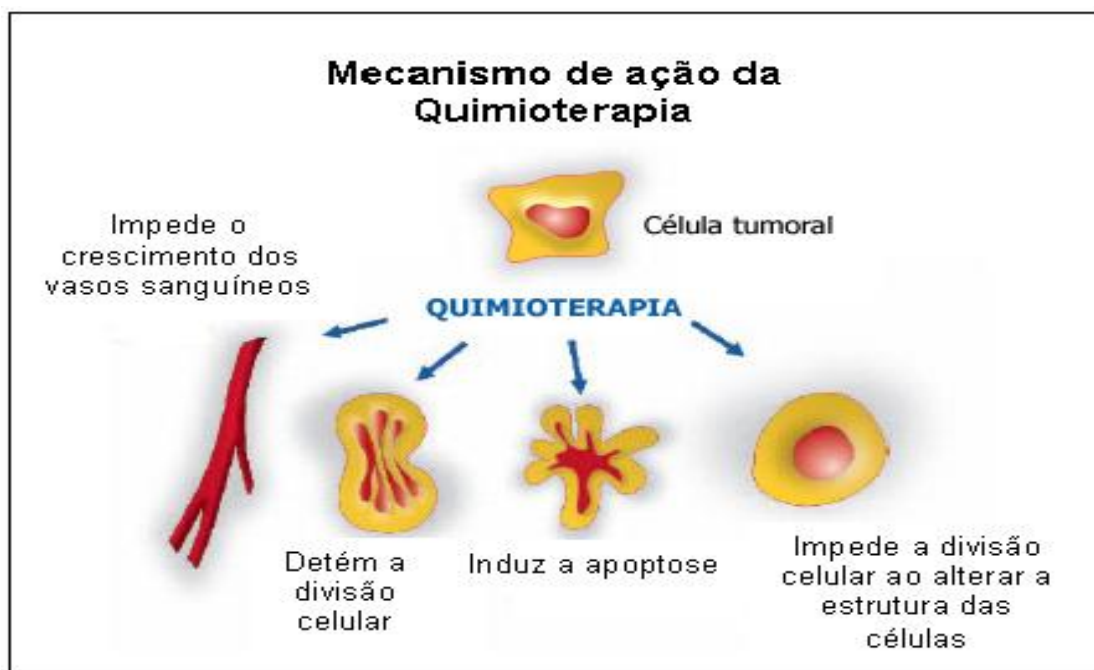
No entanto, apesar do considerável arsenal de fármacos já existentes para o tratamento do câncer, em muitos casos, o sucesso terapêutico não é alcançado por causa de falhas nos esquemas terapêuticos, altos índices de recidivas, redução da sobrevida dos pacientes e dos efeitos adversos, o que leva a uma contínua busca por novos fármacos (SALGALLER; LODGER, 1998). O fármaco ideal deve aumentar a especificidade, protegendo tecidos normais, minimizar o desconforto dos pacientes e aumentar a eficácia, resultando na erradicação da massa heterogênea do tumor (BRANNON-PEPPAS; BLANCHETTE, 2004).

Muitos fármacos eficazes contra o câncer exercem sua ação sobre células que se encontram no ciclo celular, portanto, denominados de fármacos ciclo-específicos, entre eles citam-se: alcalóides da vinca, antimetabólitos, epipodofilotoxinas e taxanos. Um outro grupo denominado

fármacos ciclo-não-específicos tem a capacidade de esterilizar as células tumorais, independente de estarem atravessando o ciclo ou em repouso. São exemplos de agentes ciclo-não-específicos: agentes alquilantes, análogos da platina, antibióticos antitumorais, antraciclinas e campotecinas (KATZUNG, 2006).

Diversas abordagens moleculares estão em fase de investigação, para o uso de alvos seletivos para atuação dos agentes anticâncer, incluem por exemplo: drogas que atuam na expressão gênica, na inibição da angiogênese, fármacos citotóxicos e indutores de apoptose conforme figura ilustrativa do mecanismo de ação dos quimioterápicos, (Fig. 7), (BERNARDI et al., 2003).

Figura 7: Esquema representativo do mecanismo de ação da quimioterapia



Fonte: adaptado de drcarlosrey acesso em 20/04/2017.

Embora a quimioterapia seja amplamente utilizada no tratamento do câncer, várias são as desvantagens de sua utilização: quase todos os agentes são dirigidos contra a proliferação celular, mais do que para metastatização propriamente dita. Portanto, pode ocorrer desenvolvimento de resistência, além do fato de que a eliminação total das células malignas não é possível com doses terapêuticas e a resposta imune do hospedeiro não consegue lidar com as células remanescentes (LEHNINGER; NELSON; COX, 2011).

Os agentes utilizados no tratamento anticâncer incluem uma grande variedade de compostos que agem por vários mecanismos, porém apresentam significativa toxicidade sobre os

tecidos normais (BOENTE; SAMPAIO; DEL GIGLIO, 2010). Com isso, se faz necessário uma pesquisa contínua por novos fármacos mais eficazes, mais seletivos e menos tóxicos.

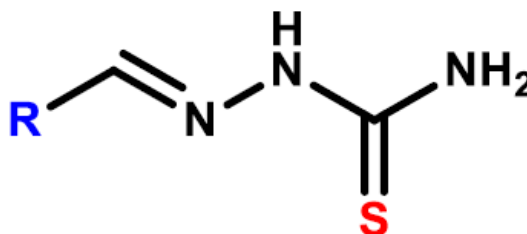
2.4. Tiossemicarbazonas, Piridinas e Tiazóis: Aspectos químicos e farmacológicos

2.4.1 Tiossemicarbazonas

No planejamento racional de fármacos, a química medicinal possui diversas ferramentas para a obtenção de novos substratos / ligantes de interesses biológicos: o bioisostérismo, a latenciação molecular, a hibridação química dentre outros (EIGLER, 1997). Com o desenvolvimento da automatização na síntese orgânica bem como a possibilidade de realizar ensaios *in vitro* em larga escala (HTS), e associado ao advento de padrões ou regras para validação de novos protótipos-líderes tem propiciado um incremento na eficácia e rapidez para determinação de novos parâmetros de Relação Estrutura-Atividade Biológica (SAR) (SILVERMAN, 1992).

As tiossemicarbazonas (Fig. 8) apresentam um amplo perfil farmacológico e constituem uma importante classe de compostos cujas propriedades têm sido extensivamente estudadas na Química Medicinal e, particularmente, na Química Medicinal Inorgânica, em razão de sua capacidade quelante. De modo geral pode-se dizer que tiossemicarbazonas agem, seja como inibidores de enzimas, através da complexação de metais endógenos ou através de reações de redox, seja através de interações com o DNA e da inibição da síntese do DNA. Além disso, alguns complexos metálicos desses ligantes apresentam a habilidade de mimetizar a ação de certas enzimas. (ANA; PILLAR, 2009)

Figura 8: Estruturas da tiossemicarbazona



Cardoso, 2012 (adaptado)

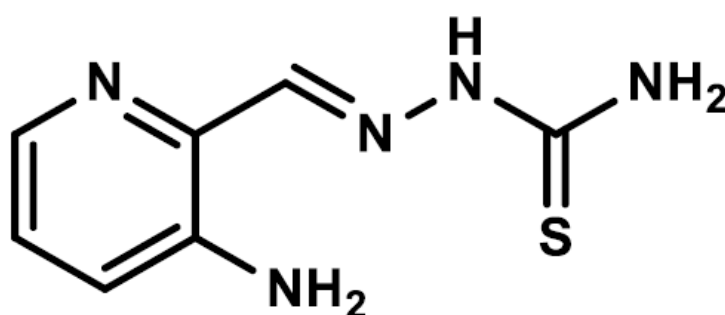
A capacidade das tiossemicarbazonas formarem complexos estáveis com íons metálicos de transição as torna moléculas versáteis. De fato, diversas tiossemicarbazonas têm sido exploradas como: agentes antiviral (KARAKÜÇÜK-İYIDOĞAN, *et. al.*, 2011; GLISONI *et. al.*, 2012),

fungicida (CHANDRA; GUPTA, 2005), antibactericida (PAVAN *et. al.*, 2010; RODRÍGUEZ-ARGÜELLES *et. al.*, 2009; KASUGA *et. al.*, 2003), antitumoral (KOVALA-DEMERTZI *et. al.*, 2012; LIMA LEITE *et. al.*, 2006; BERNHARDT *et. al.*, 2009; RICHARDSON *et.al.*, 2006; BERNHARDT *et.al.*, 2007; QUACH *et. al.*, 2012), antichagásica (LEITE *et. al.*, 2006; LEITE *et. al.*, 2007; HERNANDES *et. al.*, 2010; DONNICI *et. al.*, 2009) e antiprotozoária (BHARTI *et. al.*, 2004; BHARTI *et. al.*, 2003; BHARTI *et. al.*, 2002)

Do ponto de vista sintético as tiossemicarbazonas apresentam como característica principal sua versatilidade de obtenção, assim como sua vasta aplicação como intermediários de muitos núcleos importantes. Em geral, estas moléculas apresentam baixo custo de síntese, além de grande economia de átomos, uma vez que, com exceção da água que é liberada na sua síntese, todos os outros átomos dos compostos reagentes estarão presentes na molécula final (TENORIO *et al.*, 2005).

Liu e colaboradores demonstraram a grande potencialidade da substância 3-aminopiridina-2-carboxaldeído tiossemicarbazona (triapina – 3-AP) (Fig 9), como uma das principais substâncias orgânicas no combate a tipos específicos de células tumorais, tais como carcinoma de fígado M-109, carcinoma de ovário humano A2780 e em trabalhos experimentais com modelo de leucemia (LIU, 2011).

Figura 9: 3-Amino piridina, Triapina



Cardoso, 2012 (adaptado)

As tiossemicarbazonas derivadas de α -(N)-heterociclos carboxaldeído apresentam a propriedade de formar complexos fortes com metais de transição, como ferro e cobre. Estudos indicam que a triapina (Fig. 9) atua inativando a atividade da ribonucleotídeo redutase,

através do complexo organometálico formado com o átomo de ferro inibindo, desta forma, a etapa limitante da síntese de DNA (CORY, 1989).

2.4.2 Piridina

A química de heterocíclicos é parte integrante das ciências químicas e constitui uma parte considerável de modernas pesquisas que ocorrem atualmente em todo o mundo. A química dos compostos heterocíclicos é tão lógica como a química de compostos aromáticos ou alifáticos (YUSUF; JAIN, 2011).

Heterociclos também desempenham um importante papel na concepção e descoberta de novos compostos farmacologicamente ativos (HETZHEIM; MÖCKEL, 1967). A procura da piridina e seus derivados aumentou nos últimos 50 anos pela descoberta de muitos compostos bioativos contendo piridina por várias indústrias (SCRIVEN; BERRY, 2001). Com aplicações específicas desde meados do século passado, a piridina assumiu um papel importante na compreensão da química dos sistemas biológicos. Ela desempenha um papel fundamental ao catalisar ambos sistemas biológicos e químicos.

Em muitas enzimas de organismos vivos é o nucleotídeo piridina prostético (NADP) (LI *et. al.*, 1999), que está envolvido em vários processos de oxidação – redução (FARHANULLAH *et. al.*, 2003). Outra evidência da grande importância da piridina em sistemas biológicos é a sua presença em importantes vitaminas como a niacina e piridoxina (vitamina B6) e também em alcaloides altamente tóxicos como a nicotina (Joule; SMITH; MILLS, 1995). Na indústria farmacêutica, a piridina está presente em mais de 7000 núcleos de compostos bioativos (ROTH; KLEEMANN, 1988).

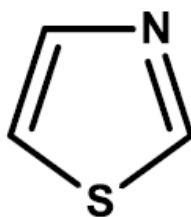
Dentro da Química Orgânica sintética, piridinas são amplamente utilizadas na química de coordenação e apresentam vários derivados. Entre os derivados piridínicos mais estudados atualmente, temos a triapina (3-aminopiridina-2-carboxaldeído tiossemicarbazona, 3-AP) (Fig. 9), um potente agente antitumoral dotado de características para a quelação com metais de transição.

As primeiras tentativas de avaliação clínica para câncer da triapina como um único agente ou em combinação com a gemcitabina falharam nitidamente na eficácia. Em estudos mais recentes, a combinação de 3-AP com fludarabina ou citarabina em pacientes com leucemia aguda refratária, desordens mieloproliferativas agressivas, ou leucemia mielóide mostrou alguma promessa (YEE *et. al.*, 2006).

2.4.3 Tiazóis

Outra classe de compostos heterocíclicos bastante estudada na atualidade são os tiazóis. Este núcleo (Fig. 10) pode ser encontrado como subunidade em diversas moléculas biologicamente ativas naturais e/ou sintéticas. Apresentam também amplo espectro de atividades biológicas, dentre as quais destacam-se a potente ação citotóxica frente a diferentes tipos de tumores tais como carcinoma de pulmão, adenocarcinoma de cólon, glioblastoma, melanoma, câncer de próstata e leucemia (ALIABADI, *et al.* 2010; LAFRANC, 2013). Além do amplo espectro frente a outras atividades biológicas, tais como antitumoral (VICINI *et. al.*, 2003; POPSAVIN *et. al.* 2012), antibacteriana (LU *et. al.*, 2012; MACCIONI *et. al.* 2002), antidepressiva (FUNAKOSHI *et. al.*, 2002), anti-inflamatória (SHAFI *et. al.*, 2012), antichagásico (CAPUTTO *et. al.*, 2012; NAVARRETE-VAZQUEZ *et. al.*, 2011; DA SILVA *et. al.*, 2017) e Leishmania (DA SILVA *et. al.*, 2017).

Figura 10: Núcleo tiazol



Cardoso, 2012 (adaptado)

O núcleo tiazol está presente como subunidade em diversas moléculas biologicamente ativas, tais como sulfatiazol (ROTH; KLEEMANN, 1988), um importante fármaco antimicrobiano, o ritonavir (**Norvir**), medicamento utilizado no combate ao vírus HIV (SOUZA; ALMEIDA, 2003), epotilonas A e B, produtos naturais que possuem potente atividade antitumoral (KAMATH; JORDAN, 2003).

Os resultados promissores alcançados por compostos com anel de tiazol nos motivaram a investigar o atividade antitumoral. As Tiossemicarbazonas e seus derivados atraíram considerável interesse farmacêutico devido ao seu potencial antiviral (GARCIA, 2003), antibacteriano (SAU, 2003; REBOLLEDO, 2003; KASUGA, 2003) e antitumoral (AFRASIABI, 2004; AFRASIABI, 2003; KOVALA-DEMERTZI, 2002; EASMON, 2001; HALL, 2000). Na continuação da nossa pesquisa de moléculas bioativas, consideramos que a derivação do grupo tiossemicarbazona em unidade de tiazol geraria novos grupos farmacofóricos, que provavelmente exibirão atividade antitumoral. Nós também Investigamos piridinas como agentes antitumoral por causa da sua ampla aplicabilidade na síntese orgânica, baixo preço e facilidade em síntese.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar o potencial antitumoral e citotóxico de derivados híbridos da piridina, tiossemicarbazona e tiazóis

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a citotoxicidade *in vitro* dos compostos derivados das piridinas, tiossemicarbazonas e tiazóis no painel de quatro linhagens tumorais.
- Determinar a citotoxicidade *in vitro* dos compostos em relação as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de voluntários saudáveis
- Determinar a atividade hemolítica dos compostos em eritrócitos humanos de voluntários saudáveis;
- Avaliar a viabilidade celular através do mecanismo de ação citotóxico das moléculas
- Avaliar a viabilidade celular por exclusão do azul de tripan e realizar uma análise morfológica após coloração por May-Grunwald-Giemsa
- Investigar a integridade da membrana celular, a fragmentação do DNA, ciclo celular e indução de apoptose em células tumorais
- Avaliar a taxa de inibição tumoral *in vivo*, parâmetros hematológicos, bioquímicos e histológicos após o tratamento

4. Materiais e Métodos

4.1 Materiais

Os materiais utilizados neste trabalho foram citados na tabela a seguir:

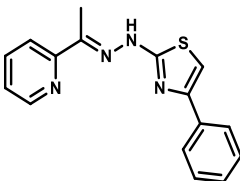
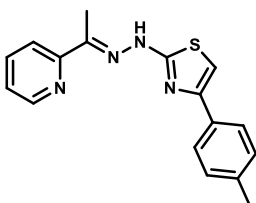
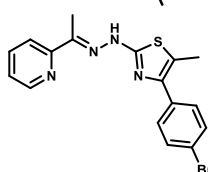
Reagente/ Solvente	Modo de preparo	Marca
Azul de tripan 10%	10 mg de azul de tripan PBS q.s.p. 100 mL de solução	Sigma®
Diimetilsufóxido (DMSO)		Sigma®
Doxorrubicina 1mg/ml	1mg de Doxorrubicina	Dinâmica®
Edta	1mL DMSO	Sigma®
Ficoll-Hypaque	-	Sigma®
Fitohemaglutinina	-	Sigma®
Iodeto de propídeo 50 µg/ML	1 mg de iodeto de propídeo PBS q.s.p. 50 mL	Boehringer®
Meio de cultura de células RPMI 1640	Diluído em água deionizada e esterilizada, filtrado em filtro Millipore (0,22 µm) e complementado com SBF 10%, 1% de glutamina, 1% de antibiócos,	Gibco®
Meio de cultura de células DEMEN	Diluído em água deionizada e esterilizada, filtrado em filtro Millipore (0,22 µm) e complementado com SBF 10%, 1% de glutamina, 1% de antibióticos	Gibco®
MTT	20 mg de MTT PBS q.s.p. 100 mL de solução	Sigma®
20 mg de MTT PBS q.s.p. 100		
Penicilina- Estreptomicina	Penicilina 10.000 U.I./mL Estreptomicina 10 mg/mL	Cultilab®
Tampão fosfato (PBS)	8,766 g de Cloreto de sódio 2,14 g de	Labsynth®

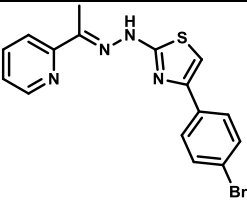
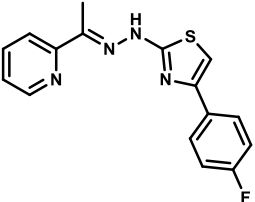
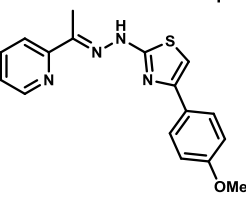
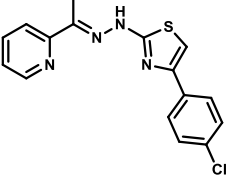
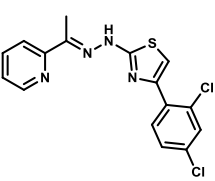
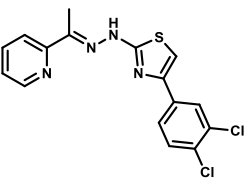
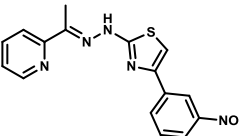
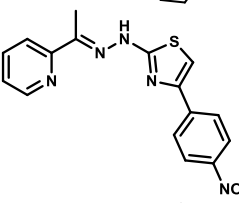
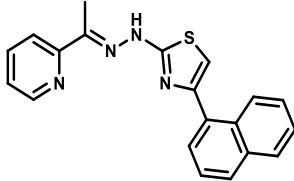
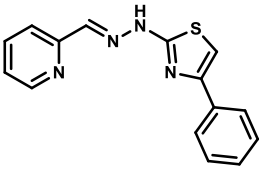
NaHPO ₄ ·7H ₂ O		
0,276 g de NaHPO ₄ ·H ₂ O		
H ₂ O q.s.p. 1L de solução (pH=7,2)		
Cultilab®		
Tripsina 0,25%	50 mL de Tripsina 2,5% 0,125 g de EDTA 450 mL de PBS	Proquímios@
TritonX-100		Isofar®

4.2 Obtenção dos derivados LpQM: TAP, TP, TS e TZ:

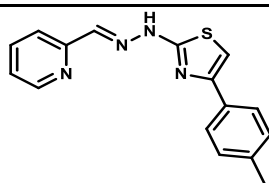
Os compostos foram sintetizados em projeto de tese desenvolvido no LpQM -Laboratório de Planejamento em Química Medicinal, sendo um total de 49 moléculas divididas nas seguintes séries: TAP (Tiazolilacetilpiridina) 12 moléculas sintetizadas, TP (Tiazolilpiridina) 12 moléculas sintetizadas, TS (Tiossemicarbazona) 13 moléculas sintetizadas, TZ (Tiazolil da tiossemicarbazona) 12 moléculas sintetizadas, por Marcos de Oliveira Cardoso orientado pela professora Dra Ana Cristina Lima Leite (CARDOSO, 2012).

Tabela 3: Códigos e respectivas estruturas químicas das moléculas/séries cedidas pela colaboração de Cardoso, 2012.

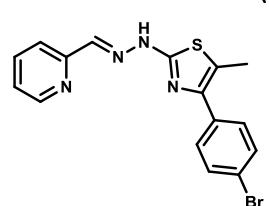
Códigos	Estrutura química
TAP-01	
TAP-02	
TAP-03	

TAP-04	
TAP-05	
TAP-06	
TAP-07	
TAP-08	
TAP-09	
TAP-10	
TAP-11	
TAP-12	
TP-01	

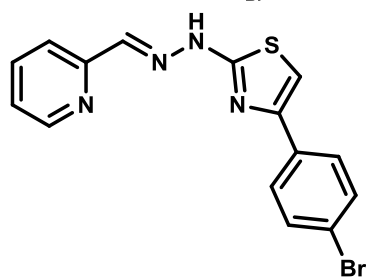
TP-02



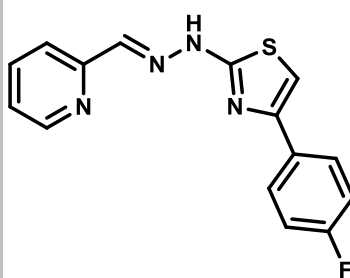
TP-03



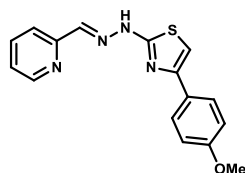
TP-04



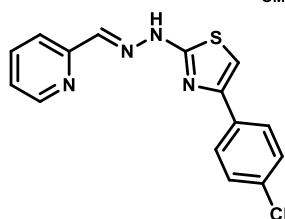
TP-05



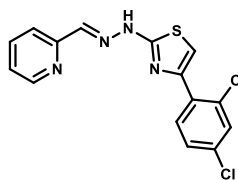
TP-06



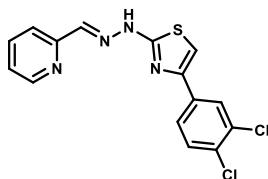
TP-07

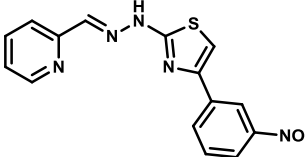
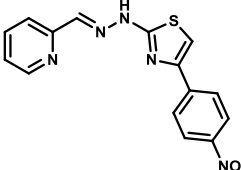
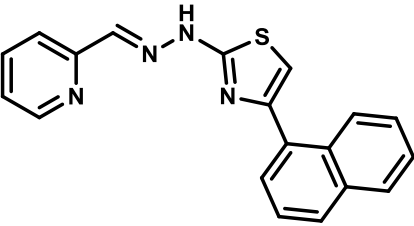
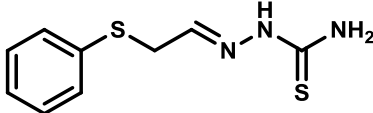
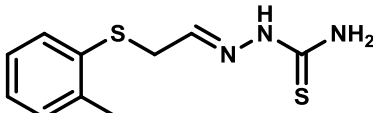
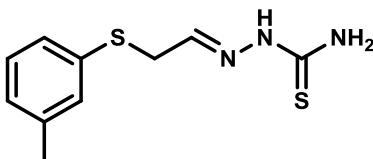
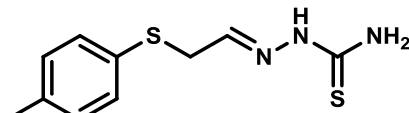
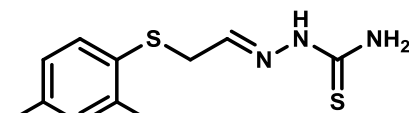
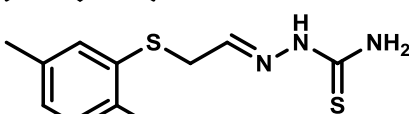
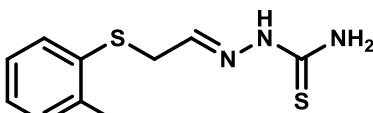
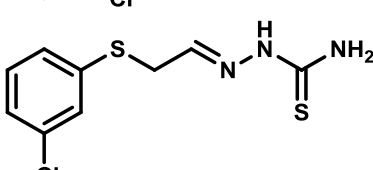
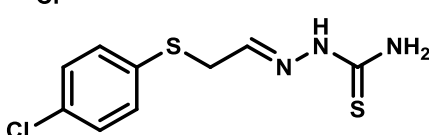


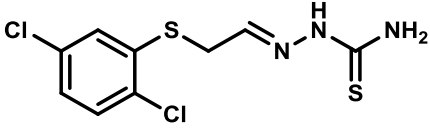
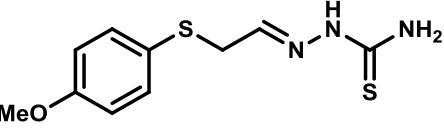
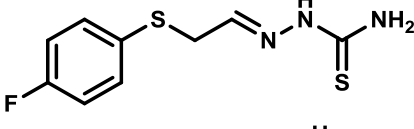
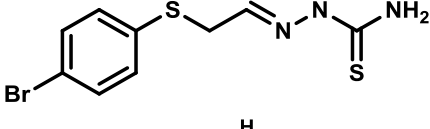
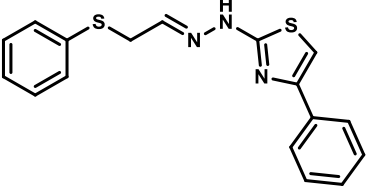
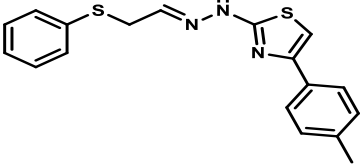
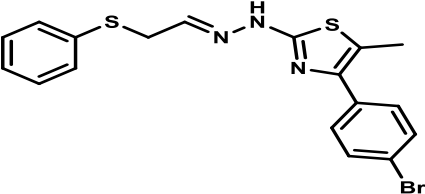
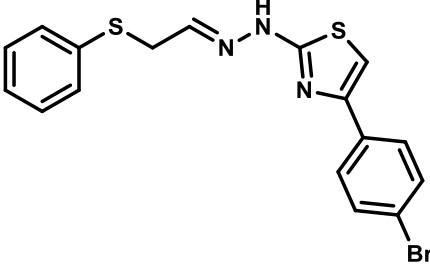
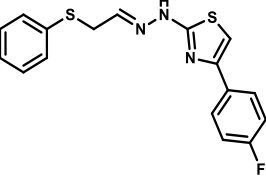
TP-08

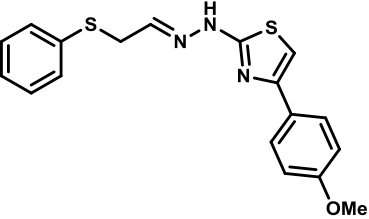
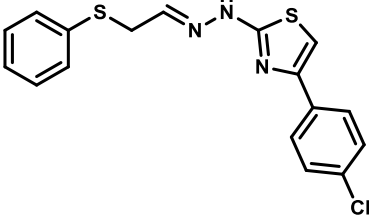
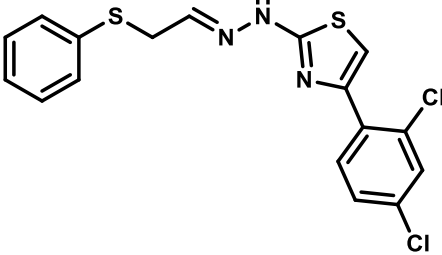
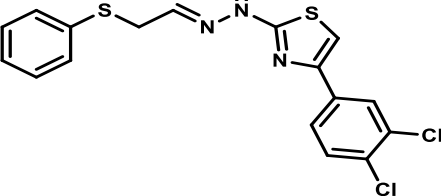
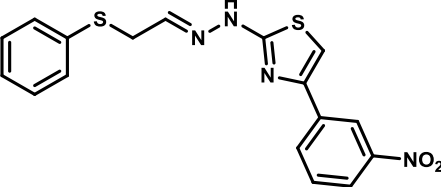
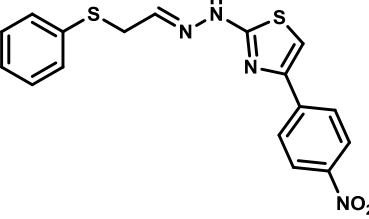
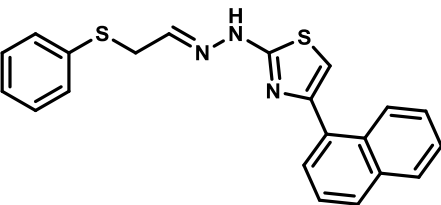


TP-09



TP-10	
TP-11	
TP-12	
TS-01	
TS-02	
TS-03	
TS-04	
TS-05	
TS-06	
TS-07	
TS-08	
TS-09	

TS-10	
TS-11	
TS-12	
TS-13	
TZ-01	
TZ-02	
TZ-03	
TZ-04	
TZ-05	

TZ-06	 <chem>COc1ccc(cc1)-c2sc(C=NNCSCc3ccccc3)n2</chem>
TZ-07	 <chem>Clc1ccc(cc1)-c2sc(C=NNCSCc3ccccc3)n2</chem>
TZ-08	 <chem>Clc1cc(Cl)ccc1-c2sc(C=NNCSCc3ccccc3)n2</chem>
TZ-09	 <chem>Clc1cc(Cl)cc(c1)-c2sc(C=NNCSCc3ccccc3)n2</chem>
TZ-10	 <chem>O=[N+]([O-])c1ccc(cc1)-c2sc(C=NNCSCc3ccccc3)n2</chem>
TZ-11	 <chem>O=[N+]([O-])c1cccc(c1)-c2sc(C=NNCSCc3ccccc3)n2</chem>
TZ-12	 <chem>c1ccc2ccccc2c1-c3sc(C=NNCSCc4ccccc4)n3</chem>

4.3 Modelos biológicos

Foram utilizados os seguintes modelos biológicos para todas as moléculas testadas:

- ✓ Linhagens celulares tumorais mantidas em cultura (**Tabela 4**)
- ✓ Linfócitos humanos isolados de voluntários sadios
- ✓ Camundongos *C.B-17 severe combined immunodeficient (SCID)*

4.4 Células

As células utilizadas nos ensaios de citotoxicidade estão listadas quanto ao tipo histológico, origem e fonte na tabela 4.

Tabela 4: Linhagens tumorais e célula não neoplásica utilizada no ensaio de citotoxicidade *in vitro*

LINHAGEM	TIPO HISTOLÓGICO	ORIGEM	FONTE
HL -60	Leucemia promielocítica	Humana	Banco de células do Rio de Janeiro
MCF-7	Carcinoma de mama	Humana	Banco de células do Rio de Janeiro
NCIH-292	Carcinoma de pulmão	Humana	Banco de células do Rio de Janeiro
HEPG2	Carcinoma de fígado	Humana	Banco de células do Rio de Janeiro
PMBC	Linfócitos e monócitos	Humana	Cultura primária de voluntários saudáveis

4.4.1 Manutenção da cultura das células tumorais

As linhagens tumorais foram cultivadas em meio RPMI 1640 ou DMEN, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos (penicilina/estreptomicina), mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂. Diariamente acompanhou-se o crescimento celular com o auxílio de um microscópio de inversão. O meio de crescimento foi trocado sempre que as células atingiam a confluência necessária para renovação dos nutrientes. Para a manutenção das células aderidas utilizou-se tripsina (0,25%) para que as células desprendessem da parede da garrafa para serem expandidas ou utilizadas (PESSOA, 2000).

4.5 Avaliação da atividade antiproliferativa em células tumorais *in vitro*

A citotoxicidade foi obtida através do método do 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5 difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) (MOSMANN, 1983), utilizando as seguintes linhagens celulares: HL-60 (leucemia promielocítica); MCF- 7 (Carcinoma de mama); NCIH-292 (Carcinoma de pulmão) HepG2 (Carcinoma de fígado).

O ensaio consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal MTT para formazan, pela atividade da enzima succinil-desidrogenase presente na mitocôndria da célula viável, permitindo dessa maneira quantificar a porcentagem de células vivas.

As linhagens celulares foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 25cm², volume de 50mL para células aderidas e 75cm², volume de 250mL para células em suspensão); utilizando o meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, seguido da observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão a cada 24 horas, quando necessário as células foram repicadas em meio de cultura novo, em uma concentração de 0,5-1,0 x 10⁶ céls/mL (BUTLER, 2004).

As células em suspensão ou monocamadas foram distribuídas em multiplacas de 96 cavidades em uma densidade de 0,3 x 10⁶ células/mL, para células em suspensão (HL-60) e 0,7 x 10⁵ células/mL para as células aderidas (NCIH-292, MCF-7e HepG2). Após 24 horas de incubação, os derivados TS, TP, TAP e TZ dissolvidos em DMSO puro estéril para a concentração estoque de 5mg/mL, foram diluídas seriadamente em meio RPMI para obtenção das concentrações finais (0,039-25µg/mL) e adicionadas em placa de 96 poços (100µL/poço) e encubados por 72 horas. O quimioterápico doxorrubicina (0,09 a 5µg/mL) foi utilizado como controle positivo. O controle negativo recebeu a mesma quantidade de DMSO. Após o período de incubação cada cavidade recebeu 25 µL da solução de MTT. As placas foram reincubada durante 3 horas, em estufa a 37 °C e a 5% CO₂. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 100µL de DMSO. Para a quantificação do sal reduzido nas células vivas, as absorbâncias foram lidas com o auxílio do espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 595nm (MOSSMAN *et al.*, 1983).

Os compostos foram testadas em diluição seriada, em duplicata ou triplicata. Foi registrada a percentagem de inibição x log da concentração e determinado suas CI₅₀ (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

4.6 Obtenção das células PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) e eritrócitos humanos

As células mononucleadas foram obtidas do sangue periférico de voluntários sadios (Projeto aprovado pelo comitê de ética sob número de registro 42941015.6.0000.5208). O sangue foi puncionado em tubo de coleta heparinizado por profissionais capacitados nas dependências da Universidade, utilizando seringas estéreis, descartáveis e com volume de 5 mL. Após coleta o material foi levado ao Laboratório de Proliferação e Cultura Celular no Departamento de Farmacologia e Fisiologia da UFPE.

4.6.1 Ensaio de citotoxicidade em células mononucleares do sangue periférico

Para avaliar a citotoxicidade do composto teste sobre a proliferação de células normais, o ensaio do *MTT* foi realizado utilizando células PBMC (*Peripheral blood mononuclear cells* - células mononucleadas de sangue periférico humano, que inclui linfócitos e monócitos) após 72 horas de exposição com o composto teste.

A amostra de sangue foi submetida a uma mistura com 5 mL de PBS. Posteriormente foi adicionado ao Ficoll e levado a centrifugação por 30 minutos a 1000 RPM. Após centrifugação em gradiente de Ficoll, foram aspirados as células mononucleares que estavam presentes na região intermediária entre as hemácias e o plasma. As células foram lavadas com tampão fosfato e ressuspendidas em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina para uma concentração final de final 3×10^5 células/mL. Fitohemaglutinina (3%) foi adicionada para induzir a proliferação dos linfócitos.

Posteriormente, as células PBMC foram plaqueadas em placas de 96 cavidades (3×10^5 células/poço em 100 µL de meio). Após 24 horas de incubação, as substâncias teste dissolvida em DMSO foram adicionados em cada poço e incubadas por 72 horas. A doxorrubicina (0,09 a 5 µg/mL) foi utilizada como controle positivo. O controle negativo recebeu a mesma quantidade de DMSO.

Três horas antes de completar 72 h, 25 µL de MTT foi adicionado. A placa foi reincubada durante 3 horas, em estufa a 37 °C e a 5% CO₂. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 100 µL de DMSO. Para a quantificação do sal reduzido nas células vivas, as absorbâncias foram lidas com o auxílio do espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 595 nm (MOSSMAN *et al.*, 1983).

4.7 Avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos humanos

A metodologia, utilizada segundo descrita por Costa-Lotufo *et. al.* 2010, permitiu avaliar o potencial das substâncias teste em causar lesões na membrana plasmática da célula, seja pela formação de poros ou pela ruptura total.

A coleta do sangue periférico (9 ml) foi realizada por profissionais capacitados, utilizando-se seringas esterilizadas e descartáveis de 10mL. Para tanto, foram escolhidos voluntários adultos saudáveis, na faixa etária de 20 a 30 anos, sem histórico de doenças recentes, não fumantes, sem exposição recente a radiações, a medicamentos ou álcool (BURIM *et al.*, 2001).

Foi coletado o sangue humano de acordo com o comitê de ética, sendo diluído em 1:30 de solução salina (NaCl 0,85% + CaCl₂ 10 mM). Os eritrócitos foram lavados 2 vezes em solução salina por centrifugação (15g/3min.) para redução da contaminação plasmática e ressuspensos em solução salina para obtenção de uma suspensão de eritrócitos (SE) a 2%. Os ensaios foram realizados em multiplacas com 96 cavidades. Cada poço da 1ª fileira recebeu 100µL da solução salina. Na 2ª, os poços receberam 50µL da solução salina e 50µL do veículo de diluição da substância teste, neste caso, DMSO 10%. Aos poços da 3ª fileira, foram adicionados 100µL de solução salina e 100µL das substâncias teste em solução. Da 4ª fileira em diante os poços receberam 100µL da solução salina, excetuando-se os da última fileira, que receberam 80µL de solução salina e 20µL de Triton X . 100 1% (controle positivo). As diluições foram feitas da 3ª à 11ª cavidade, retirando-se 100 µL da solução da cavidade anterior e transferindo para a seguinte de modo que as concentrações foram sempre diluídas pela metade. Em seguida, 100µL da suspensão de eritrócitos foram plaqueados em todos os poços. Após incubação de 1 hora, sob agitação constante à temperatura ambiente ($26 \pm 2^{\circ}\text{C}$), as amostras foram deixadas em repouso e o sobrenadante transferido para uma outra placa para a leitura da absorbância da hemoglobina no espectrofotômetro de placas a 540nm. A atividade das substâncias teste foi determinada de maneira relativa ao valor dos controles positivo e negativo.

4.8 Viabilidade celular - Exclusão por Azul de Tripán

O teste de exclusão por azul de tripan permite quantificar separadamente as células viáveis das células mortas pela substância testada. O corante penetra em todas as células, porém somente as células viáveis conseguem bombear o tripan para fora, sendo possível dessa maneira observar uma coloração azulada nas células mortas.

Células tumorais na concentração de 0.3×10^6 células/mL, foram incubadas por 24 h com as drogas e examinadas ao microscópio de inversão. A concentração utilizada foi estimada a partir do valor da CI_{50} encontrada no método do MTT para esta mesma linhagem celular. Foi retirado 90µL da suspensão de células e adicionado a 10µL do azul de tripan. As células viáveis e as não viáveis foram diferenciadas e contadas em câmara de Neubauer. A Doxorrubicina (2mg/ml) foi usada como controle positivo.

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de n experimentos. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4.9 Análise morfológica - Coloração por May-Grunwald-Giemsa

A coloração utilizada nesse experimento se baseia em interações eletrostáticas entre os corantes e moléculas-alvo. Essa coloração possui azul de metileno (corante básico), eosina (corante ácido), entre outros componentes básicos que permite distinguir o citoplasma e o núcleo, sendo possível analisar a célula quanto a sua integridade nuclear, bem como alterações no citoplasma. Essa técnica é bastante indicada para estudo do padrão de morte celular (apoptose/necrose) (McGAHON *et al.*, 1995).

As células foram plaqueadas na concentração de $0,3 \times 10^6$ células/mL e incubadas por 24 horas com as moléculas nas concentrações de (2 e 4µM), o controle positivo foi a doxorrubicina (0,5µM) e examinadas ao microscópio de inversão. Para observar a morfologia, 50µL da suspensão de células foram adicionadas à centrífuga de lâmina (Cytospin®). Após a adesão das células na lâmina, a fixação foi feita com metanol por 1 minuto e a coloração por May-Grunwald, por 10 segundos, seguida pelo Giemsa por mais 10 segundos.

As lâminas contendo as células coradas foram levadas ao microscópio para avaliação das suas características morfológicas e comparadas ao controle (não-tratadas). O registro das alterações celulares foi feito por fotografia em microscopia óptica.

4.10 Análises por Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para se determinar diferentes características das partículas biológicas. Os citômetros analisam as células ou partículas em meio líquido que

passam através de uma fonte de luz. O desvio da luz que está relacionado diretamente com a estrutura e morfologia das células, e a fluorescência são determinados para cada partícula que passa pela fonte de excitação. Após a aquisição do desvio da luz e fluorescência de cada partícula, a informação resultante pode ser analisada utilizando-se um computador com programa específico acoplado ao citômetro (SHAPIRO, 1995).

Para todos os compostos testados, cinco mil eventos foram avaliados por experimento e os debris celulares foram omitidos da análise. A fluorescência foi então determinada por citômetro de fluxo BD LSRFortessa cytometer usando o BD FACSDiva Software (BD Biosciences) and Flowjo Software 10 (Flowjo LCC, Ashland, OR, EUA). Cinco mil eventos foram analisados para cada replicata em pelo menos três experimentos independentes.

4.10.1 Determinação da Externalização da Fosfatidilserina – Anexina V por citometria de fluxo

Um dos principais processos que ocorrem na apoptose é a perda da assimetria da membrana fosfolipídica com a translocação da fosfatidilserina da membrana interna da bicamada lipídica para superfície celular. A externalização da PS ainda continua como um processo não totalmente conhecido, mas sabe-se que a externalização da fosfatidilserina funciona como um sinal da célula para que os macrófagos a fagocitem, antes da perda da integridade de membrana celular (VERMES *et al.*, 1995).

A externalização da fosfatidilserina foi analisada por citometria de fluxo após marcação da fosfatidilserina com a anexina V (VERMES *et al.*, 2000). Foi utilizado o FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA) para determinar apoptose inicial e tardia. As células foram lavadas duas vezes com PBS gelado e ressuspendidas em 135µL de PBS com 5µL de Iodeto de Propídio e 10µL de anexina V conjugada com ficoeritrina (PE).

As células foram levemente agitadas e incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente (20-25°C) no escuro. Posteriormente, as células foram analisadas por citometria de fluxo BD LSRFortessa cytometer usando o BD FACSDiva Software (BD Biosciences) and Flowjo Software 10 (Flowjo LCC, Ashland, OR, EUA). Anexina V é um corante hidrofílico impermeável em células intactas, e é utilizado como um indicador da integridade da membrana celular. A percentagem de células viáveis e de células apoptóticas inicial e tardia foi calculada.

Os dados foram analisados com a média $\pm$ S.E.M. de pelo menos três experiências independentes realizadas em duplicata. Foram avaliados dez mil eventos por experimento e os detritos celulares foram omitidos na análise. * $P < 0,05$ em comparação com o controle negativo por ANOVA seguido do teste de comparação múltipla da Dunnett.

4.10.2 Análise do Ciclo Celular por citometria de fluxo

Esse teste baseia-se na capacidade do iodeto de propídeo (PI) ligar-se ao DNA. O PI consegue intercalar proporcionalmente a quantidade de DNA da célula, podendo então mensurar as fases do ciclo celular, através da quantidade de DNA presente em cada fase do ciclo celular.

Uma alíquota de 100 μ L de suspensão de células tratadas e não tratadas foi incubada com 100 μ L de uma solução de lise (0,1% de citrato de sódio, 0,1% de Triton X-100 e 50 μ g/mL de iodeto de propídeo em PBS). Após um período de 30 minutos, onde os tubos permaneceram no escuro, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo (NICOLETTI et al., 1991).

Os dados serão apresentados como a média $\pm$ S.E.M. de pelo menos três experimentos independentes realizadas em duplicata. Serão avaliados dez mil eventos por experimento e os detritos celulares serão omitidos na análise. * $P < 0,05$ em comparação com o controle negativo por ANOVA seguido do teste de comparação múltipla da Dunnett.

4.11 Modelo xenográfico de tumor hepatocelular humano em camundongos

A vantagem da utilização de neoplasias transplantáveis, em comparação às demais, recai sobre o conhecimento prévio da quantidade e das características iniciais das células tumorais a serem inoculadas e sobre o desenvolvimento rápido da neoplasia, que restringe o tempo de estudo (STEWART *et al.*, 1959).

Um total de 54 camundongos fêmeas SCID C.B 17 (imunodeficiência combinada grave) apresentando massa corpórea variando entre 25-30g. Foram obtidos e mantidos nas instalações de animais no Instituto Gonçalo Moniz - FIOCRUZ (Salvador, Bahia, Brasil). Os animais foram alojados em gaiolas com acesso livre a alimentos e água. Todos os animais foram mantidos sob um ciclo de claro-escuro de 12:12h (luzes acesas às 6:00 da manhã). Os animais foram tratados de acordo com os princípios éticos para a experimentação animal da SBCAL (Associação Brasileira

de Ciência Animal de Laboratório), no Brasil. O Comitê Local de Ética Animal aprovou o protocolo experimental (número 01/2013). As células HepG2 (10^7 células por 500 μ L) foram implantadas subcutaneamente na axila esquerda dos camundongos. Os camundongos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos no início do experimento:

Grupo I —15 animais tratados com o veículo (DMSO 5%) utilizado para diluir as substâncias (grupo controle negativo);

Grupo II – 9 animais tratados com 5-fluorouracil (10mg/kg/dia);

Grupo III – 15 animais tratados com TAP 07 (40mg/kg/dia);

Grupo IV – 15 animais tratados com TP 07 (40mg/kg/dia);

Os animais foram tratados intraperitonealmente (200 μ L por animal) uma vez por dia durante 21 dias consecutivos.

Vinte e quatro horas após o último tratamento, os animais foram anestesiados com 10mg/kg de cloridrato de xilazina (Synter, Cotia, São Paulo, Brasil) e 100mg/kg de cloridrato de ketamina (König, Santana de Parnaíba, São Paulo, Brasil), administradas por via intraperitoneal. Quando se observou a ausência de reflexo de pata, a eutanásia foi realizada por deslocamento cervical e 1,5ml de sangue periférico foram coletadas da artéria braquial. Os animais foram eutanasiados por aprofundamento de nível anestésico e os tumores foram excisados e pesados. Os efeitos dos compostos foram expressos como a percentagem de inibição do controle. Para realizar a evolução sistemática dos efeitos toxicológicos, os camundongos foram pesados no início e no final do experimento.

O percentual de inibição do crescimento tumoral (IT) foi calculado pela fórmula:

$$IT (\%) = [(A-B)/A] \times 100$$

Onde: **A** = média dos massa dos tumores no grupo controle e **B** = média dos pesos dos tumores nos animais tratados.

Os dados foram analisados a partir da média $\pm$ E.P.M. de *n* experimentos. Para avaliação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste em comparação com o controle negativo do teste de comparação múltipla da Dunnett com a utilização do programa GraphPad Prisma versão 5.0.

4.12 Avaliação da toxicidade sistêmica: parâmetros hematológicos, bioquímicos e análise histopatológica dos órgãos

Os animais foram observados sobre sinais de anormalidades que incluíram alterações na pele e pêlos, tremores, convulsões e diarreia, ao longo do estudo. As análises hematológicas foram realizadas com microscopia óptica. A análise bioquímica de amostras de soro foi realizada utilizando um rotor Vet-16 e quantificada usando um sistema analítico de química analítica (Hemagen Diagnostics, Inc.). Os fígados, rins, pulmões e corações foram removidos, pesados e examinados quanto a sinais de lesões graves ou alterações de cor e hemorragia. Após exame macroscópico tumores, fígado, rins, pulmões e coração foram fixados em tampão de formalina a 4% e embutidos em parafina. As secções de tecido foram coradas para hematoxilina e eosina, e um patologista realizou análises sob microscopia óptica.

4.12.1 Análise histopatológica

A técnica de coloração hematoxilina e eosina (H/E) permite diferenciar o citoplasma do núcleo, possibilitando, assim, a análise de algumas estruturas celulares. A análise morfológica e histopatológica de tecidos dos animais tratadas permitem identificar alterações que possam estar ocorrendo e fornecer subsídios para sugerir os efeitos tóxicos causados pelo fármaco.

Após o eutanásia dos animais, ocorreu a retirada e pesagem de órgãos e tumores, os quais foram armazenados em formol a 10%. As peças foram retiradas do formol e seccionadas em pequenas fatias para posterior preparação das lâminas.

O material foi fixado em formol a 10% por 24 horas, desparafinado em xilol por 15 minutos, e desidratado em concentrações crescentes de álcool até 70% (mergulhando-se rapidamente as lâminas), sendo posteriormente lavadas em água destilada até ter sido removido todo o álcool. Posteriormente as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina. As lâminas contendo as células coradas foram levadas ao microscópio para avaliação das suas características morfológicas e comparadas ao controle (não tratadas).

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação da atividade citotóxica das séries TAP, TP, TS e TZ em células tumorais humanas

Quarenta e nove compostos foram sintetizados e avaliados quanto à citotoxicidade em relação a quatro linhas celulares de câncer. Os compostos foram classificados em quatro grupos de acordo com a estrutura química de que são derivados: grupo TAP são 2-piridil 2,3-tiazóis com um metil em C6. Os compostos TP são piridiltiazolil, os TS são tiossemicarbazonas e TZ são compostos de benziltiazolil. A linhagem celular mais sensível foi HL-60 (leucemia promielocítica) e a linhagem celular mais resistente foi HepG2 (carcinoma hepatocelular). Os compostos com $IC_{50} \leq 3 \mu M$ foram considerados altamente potentes e os compostos com valores de IC_{50} na faixa de 3 - 6 μM foram considerados como potentes. Por outro lado, os compostos com IC_{50} entre 6 μM e 12 μM foram considerados como moderadamente potentes, enquanto as moléculas que exibiam valores de IC_{50} na faixa de 12 - 24 μM foram consideradas como tendo baixa potência. Finalmente, os compostos que exibem $IC_{50} > 24 \mu M$ foram considerados não citotóxicos (FORTES et al., 2016). A maioria dos compostos de piridil tiazolil (grupo TAP e TP) foram altamente ativos em pelo menos uma linhagem celular (Tabela 4).

As moléculas da série TAP (Tabela 5), TP (Tabela 6), TS (Tabela 7) apresentaram elevado potencial de citotoxicidade em todas as linhagens tumorais testadas, com valores de CI_{50} que variaram de acordo com cada linhagem testada, porém as moléculas da série TZ (Tabela 8) não evidenciaram citotoxicidade significativa.

As moléculas da série TAP apresentaram CI_{50} que variaram de 0,51 a 1,62 μM em HL-60; 1 a 3,9 μM em MCF-7; 1,7 - 3,6 μM em NCIH- 292 e maior que 2 μM em HepG2. As moléculas da série TP apresentaram CI_{50} que variaram de 0,98 a 27,3 μM em HL-60; 2,5 a 11 μM em MCF-7; 0,94 a 14 μM em NCIH- 292; 5 a 6 μM em HepG2. As moléculas da série TS apresentaram CI_{50} que variaram de 0,71 a 15,8 μM em HL-60; 0,62 a 36,2 μM em MCF-7; 0,96 a 38,6 μM em NCIH- 292 e maior que 50 μM em HepG2. Os compostos de TZ não foram citotóxicos ou apresentaram baixa atividade antiproliferativa em células cancerosas apresentando CI_{50} que variaram de 5 a 18 $\mu M/mL$ em HL-60; maior que 21 $\mu M/mL$ em MCF-7; maior que 18 $\mu M/mL$ em NCIH- 292 e maior que 50 μM em HepG2. A doxorubicina usada como controle positivo, também apresentou citotoxicidade em todas as linhagens tumorais testadas.

Uma vez que as substâncias testadas apresentaram citotoxicidade contra linhagens tumorais, foi avaliado os efeitos citotóxicos em células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC - *peripheral blood mononuclear cell* – linfócitos e monócitos) pelo método MTT com 72 horas de incubação. Em relação a essa toxicidade, a maioria dos compostos TAP foram citotóxicos para PBMC, com exceção de TAP-07 que não foi citotóxica em concentrações testadas ($IC_{50} > 30 \mu M$), tornando TAP-07 o composto com o Índice de seletividade mais favorável (SI). Entre os compostos pertencentes ao grupo TP, apenas TP-02 e TP-07 foram ativos em todas as linhagens celulares testadas. Por outro lado, apenas o composto TP-02 foi citotóxico para PBMC (IC_{50} de $5,8 \mu M$) quando comparado ao TP-07 que não era citotóxico na concentração testada ($IC_{50} > 30 \mu M$). Para as moléculas TS os valores de CI_{50} encontrados foram de $9,5$ a $20,9 \mu M$ e por fim o grupo TZ apresentaram CI_{50} menor que $3,5 \mu M$ em todas as moléculas testadas. Compostos que causam morte celular não específica visando a membrana plasmática celular são muito tóxicos. A CI_{50} das moléculas em HL-60 obteve-se o índice de seletividade que será utilizada como modelo nos demais testes biológicos, com a CI_{50} em PBMC após 72h de incubação (**Tabela 5 até 8**), observou-se que a citotoxicidade foi maior em células HL-60 do que em PBMC.

Tabela 5: Atividade citotóxica das moléculas da série TAP (Tiazolilmetilpiridina).

Compostos	HL-60	MCF-7	NCI-H292	HepG2	PBMC
IC ₅₀ (Intervalo de confiança) μM					
TAP-01	0.91 (0.71 - 1.2)	1.01 (0.7 - 2.2)	1.8 (1.3 - 2.4)	>50	<3.5
TAP-02	0.64 (0.42 - 1.0)	2.1 (0.77 - 5.1)	2.4 (1.9 - 3.1)	>50	6.9 (5.5 - 13.6)
TAP-03	0.75 (0.56 - 0.95)	1.1 (0.7 - 1.7)	1.9 (1.5 - 2.3)	>50	13.8 (7.4 - 26.0)
TAP-04	0.51 (0.43 - 0.64)	1.61 (0.75 - 3.22)	1.4 (1.0 - 1.8)	>50	3.7 (2.3 - 6.6)
TAP-05	0.70 (0.57 - 0.89)	1.5 (1.1 - 1.8)	2.6 (1.5 - 4.7)	>50	13.1 (7.3 - 22.9)
TAP-06	0.8 (0.58 - 1.07)	1.3 (1.1 - 1.6)	3.0 (1.5 - 5.8)	>50	<3.5
TAP-07	0.98 (0.82 - 1.15)	3.5 (1.4 - 9.1)	3.1 (2.7 - 4.9)	2.2 (1.5 - 3.3)	>30
TAP-08	1.62 (1.40 - 1.90)	1.5 (0.44 - 5.2)	3.6 (1.8 - 4.3)	>50	<3.5
TAP-09	0.66 (0.44 - 0.93)	3.9 (1.8 - 8.5)	2.7 (2.4 - 3.1)	>50	<3.5

TAP-10	0.58 (0.41 - 0.85)	1.2 (0.91 - 1.5)	3.0 (1.9 - 4.7)	>50	<3.5
TAP-11	0.85 (0.67 - 0.94)	1.01 (0.85 - 1.15)	1.7 (1.4 - 2.5)	>50	4.0 (2.3 - 6.7)
TAP-12	1.4 (1.10 - 1.80)	2.7 (1.4 - 5.4)	2.7 (2.2 - 3.4)	>50	6.6 (4.6 - 9.3)
Dox	0.02 (0.02-0.04)	0.37 (0.18 – 0.92)	0.55 (0.37 – 0.92)	0.6 (0.51-0.81)	1.4 (0.9-2.6)

Os dados são apresentados como valores de IC50 em μM e seu respectivo intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não linear através do programa GraphPad Prism de pelo menos dois experimentos independentes realizados em duplicata ou triplicata, medidos pelo teste de redução de MTT após 72 h de incubação. Células tumorais: HL-60 (leucemia promielocítica humana); MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano); NCI-H292 (carcinoma do pulmão humano); E HepG2 (carcinoma hepatocelular humano). Células não tumorais: PBMC (células mononucleares de sangue periférico humano). A doxorubicina (DOX) foi utilizada como controle positivo.

Tabela 6: Atividade citotóxica das moléculas da série TP (Tiazolilpiridina).

Compostos	HL-60	MCF-7	NCI-H292	HepG2	PBMC
IC50 (Intervalo de confiança) μM					
TP-01	1.7 (1.4 - 2.4)	11.0 (5.7 - 21.5)	10.7 (6.4 - 17.8)	>50	6.6 (13.9 - 33.3)
TP-02	1.3 (1.1 - 1.5)	3.8 (3.0 - 4.9)	7.5 (5.1 - 11.0)	6.1 (4.3 - 8.6)	<3.5
TP-03	27.3 (20.9 - 35.5)	4.4 (1.6 - 11.2)	2.2 (1.1 - 3.1)	>50	9.0 (7.5 - 8.6)
TP-04	1.3 (1.0 - 1.7)	2.5 (2.2 - 3.2)	6.4 (4.1 - 10.0)	>50	<3.5
TP-05	1.9 (1.6 - 2.2)	4.6 (3.7 - 5.7)	14.6 (8.3 - 25.4)	>50	7.9 (3.2 - 18.8)
TP-06	8.7 (5.0 - 14.8)	5.7 (2.6 - 12.4)	2.8 (1.5 - 5.0)	>50	<3.5
TP-07	1.0 (0.85 - 1.2)	4.7 (3.2 - 6.8)	3.2 (2.7 - 3.8)	5.8 (4.2 - 7.9)	>30
TP-08	0.57 (0.22-0.97)	2.5 (1.9 - 3.3)	0.94 (0.45 - 2.0)	>50	12.3 (7.7 - 19.0)
TP-09	1.2 (0.17 - 9.1)	2.9 (1.4 - 5.7)	2.4 (1.8 - 2.8)	>50	13.0 (6.6 - 25.5)
TP-10	0.98 (0.67 - 1.4)	4.3 (2.2 - 7.9)	3.3 (3.0 - 3.6)	>50	>30
TP-11	2.7 (2.2 - 3.4)	>50	>50	>50	>30
TP-12	3.1 (2.4 - 4.0)	7.2 (5.7 - 9.0)	>50	>50	19.3 (12.7 - 29.0)

Dox	0.02 (0.02-0.04)	0.37 (0.18 – 0.92)	0.55 (0.37 – 0.92)	0.6 (0.51-0.81)	1.4 (0.9-2.6)
-----	---------------------	-----------------------	-----------------------	--------------------	------------------

Os dados são apresentados como valores de IC50 em μM e seu respectivo intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não linear através do programa GraphPad Prism de pelo menos dois experimentos independentes realizados em duplicata ou triplicata, medidos pelo teste de redução de MTT após 72 h de incubação. Células tumorais: HL-60 (leucemia promielocítica humana); MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano); NCI-H292 (carcinoma do pulmão humano); E HepG2 (carcinoma hepatocelular humano). Células não tumorais: PBMC (células mononucleares de sangue periférico humano). A doxorubicina (DOX) foi utilizada como controle positivo.

Tabela 7: Atividade citotóxica das moléculas da série TS (Tiossemicarbazona).

Compostos	HL-60	MCF-7	NCI-H292	HepG2	PBMC
IC50 (Intervalo de confiança) μM					
TS-01	12.3 (8.2 -18.6)	>50	38.6 (28.4 - 54.4)	>50	19.9 (12 - 32.01)
TS-02	>50	2.2 (1.9 - 2.6)	>50	>50	10.2 (7.9 -12.9)
TS-03	3.0 (2.8 - 3.3)	18.1 (14.8 - 22.4)	9.6 (6.2 - 14.8)	>50	<3.5
TS-04	0.71 (0.58 - 0.83)	0.62 (0.46 - 0.87)	0.96 (0.50 - 1.8)	>50	<3.5
TS-05	1.4 (1.2 - 1.6)	4.5 (1.8 - 10.1)	2.01 (1.0 - 3.8)	>50	>30
TS-06	0.84 (0.53 - 1.3)	2.5 (1.3 - 4.6)	2.8 (0.6 - 12.6)	>50	<3.5
TS-07	10.81 (4.8 -24.8)	36.2 (26.1 - 50.5)	26.6 (20.1 - 35.2)	>50	20.9 (14.7 - 29.8)
TS-08	8.8 (5.1 -15.0)	>50	>50	>50	11.9 (7.52 -19.6)
TS-09	15.86 (8.1 -30.8)	>50	>50	>50	9.5 (7.52 - 11.9)
TS-10	>50	>50	>50	>50	>30
TS-11	>50	22.2 (7.7 - 63.6)	29.6 (26.5 - 32.9)	>50	10.5 (8.9 - 12.5)
TS-12	1.72 (1.3 - 2.0)	1.3 (1.1 - 1.6)	4.1 (4.0 - 4.3)	>50	<3.5
TS-13	8.78 (5.9 -12.8)	23.7 (13.9 - 40.2)	21.7 (10.8 - 42.9)	>50	<3.5
DOX	0.02 (0.02-0.04)	0.37 (0.18 – 0.92)	0.55 (0.37 – 0.92)	0.6 (0.5-0.8)	1.4 (0.9-2.6)

Os dados são apresentados como valores de IC50 em μM e seu respectivo intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não linear através do programa GraphPad Prism de pelo menos dois experimentos independentes

realizados em duplicata ou triplicata, medidos pelo teste de redução de MTT após 72 h de incubação. Células tumorais: HL-60 (leucemia promielocítica humana); MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano); NCI-H292 (carcinoma do pulmão humano); E HepG2 (carcinoma hepatocelular humano). Células não tumorais: PBMC (células mononucleares de sangue periférico humano). A doxorubicina (DOX) foi utilizada como controle positivo.

Tabela 8: Atividade citotóxica das moléculas da série TZ (Tiazolil da tiossemicarbazona).

Compostos	HL-60	MCF-7	NCI-H292	HepG2	PBMC
IC50 (Intervalo de confiança) μ M					
TZ-01	>50	> 50	>50	>50	<3.5
TZ-02	>50	>50	>50	>50	<3.5
TZ-03	>50	> 50	>50	>50	<3.5
TZ-04	>50	> 50	>50	>50	<3.5
TZ-05	>50	> 50	>50	>50	<3.5
TZ-06	>50	> 50	>50	>50	<3.5
TZ-07	>50	> 50	>50	>50	<3.5
TZ-08	>50	> 50	>50	>50	<3.5
TZ-09	>50	> 50	>50	>50	<3.5
TZ-10	18.4 (10 - 33.8)	21.9 (15.2 - 31.5)	>50	>50	<3.5
TZ-11	> 50	> 50	>50	>50	<3.5
TZ-12	5.3 (4.6 - 6.1)	21.4 (13.8 - 33.0)	18.6 (16 - 21.8)	>50	<3.5
Dox	0.02 (0.02-0.04)	0.37 (0.18 – 0.92)	0.55 (0.37 – 0.92)	0.6 (0.51-0.81)	1.4 (0.9-2.6)

Os dados são apresentados como valores de IC50 em μ M e seu respectivo intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não linear através do programa GraphPad Prism de pelo menos dois experimentos independentes realizados em duplicata ou triplicata, medidos pelo teste de redução de MTT após 72 h de incubação. Células tumorais: HL-60 (leucemia promielocítica humana); MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano); NCI-H292 (carcinoma do pulmão humano); E HepG2 (carcinoma hepatocelular humano). Células não tumorais: PBMC (células mononucleares de sangue periférico humano). A doxorubicina (DOX) foi utilizada como controle positivo.

Um teste hemolítico positivo exclui que o composto seja usado como medicamento terapêutico. Nenhum dos compostos testados foi tóxico para eritrócitos humanos ($EC_{50} > 250\mu$ M). Este ensaio permite avaliar o potencial das substâncias em causar lesões na membrana plasmática da célula, seja pela formação de poros ou pela ruptura total, por meio da utilização de eritrócitos desta forma, pode-se inferir que a atividade citotóxica não é dependente de lise imediata

da membrana plasmática, podendo estar relacionado com um mecanismo de morte celular mais específico. A ausência de atividade hemolítica sugere que o efeito citotóxico das amostras testadas independe de uma dano específico à membrana plasmática da célula. A citotoxicidade de TAP-07 e TP-07 destacou-se em relação à outra série de compostos sintetizados, em particular devido ao seu potencial citotóxico para células HL-60 e HepG2 e a ausência de citotoxicidade para PBMC (Tabela 5 e 6). Assim, TAP-07 e TP-07 foram selecionados para experiências adicionais.

5.2. Avaliação de morte celular na linhagem HepG2 e HL60 pelos compostos 2-piridil-2,3-tiazol pelo método de exclusão do corante azul de tripan

HepG2 é uma linhagem celular de tumor de fígado aderente que forma tumor sólido quando implantado no animal. Para verificar se os compostos são capazes de atuar sobre células cancerosas em suspensão, uma linha celular leucêmica (HL60) também foi tratada com TAP-07 e TP-07. As células HL-60 e HepG2 foram tratadas com TAP-07 e TP-07 durante 24 e 48 h e a viabilidade celular foi avaliada utilizando o método de exclusão de corante azul de tripan.

Ambos os compostos reduziram a viabilidade celular (Fig. 11). Nas células HepG2, TAP-07 causou inibição significativa do crescimento celular ($p < 0,05$) a 7,5 (69%) e 15 μ M (82%) após 24 h, enquanto o número viável de células diminuiu 42% e 55% após o tratamento com TP-07 a 16 μ M e 32 μ M, respectivamente. Após 48 h, o TAP-07 causou inibição significativa do crescimento celular ($p < 0,05$) a 8 μ M (85%) e 16 μ M (93%) e TP-07, a 16 μ M e 32 μ M, reduzida em 68% e 80%, respectivamente.

Nas células HL-60, o número de células viáveis tratado durante 24h com TAP-07 a 0,8 μ M e 1,6 μ M foi reduzido em 79% e 89%, respectivamente. O número de células HL60 também foi reduzido após o tratamento com TP-07 a 6 μ M (46% de inibição) e 12 μ M (53,7% de inibição). Após 48h de incubação, o TAP-07 causou inibição significativa do crescimento celular ($p < 0,05$) a 0,8 μ M (87%) e 1,6 μ M (91%) e TP-07, a 6 μ M e 12 μ M, reduzida em 57% e 63%, respectivamente. A doxorrubicina, a 2 μ M, reduziu o número de células HepG2 em 59% e 67% e as células HL-60 reduziram 72,2% e 79% após 24h e 48 h, respectivamente.

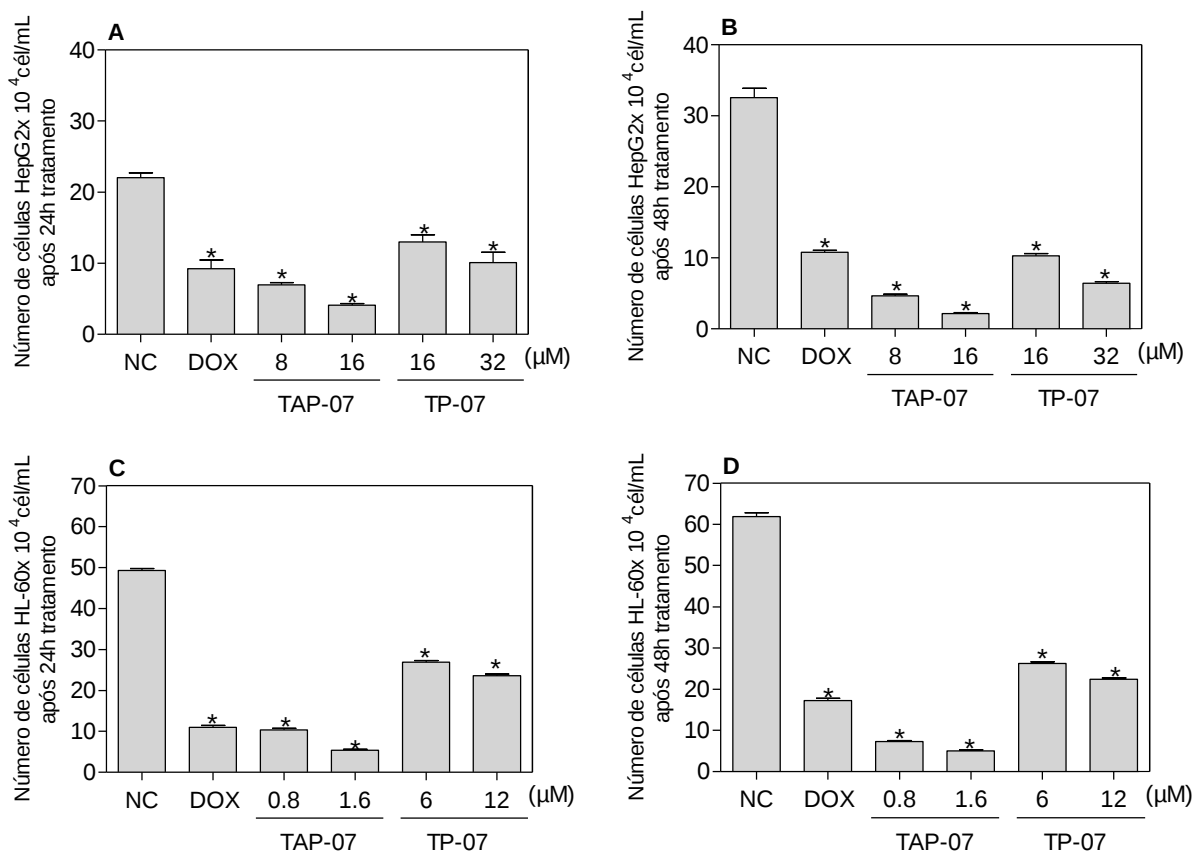


Figura 11: Viabilidade celular determinada por coloração com azul de tripan de células HepG2 (A e B) e HL-60 (C e D) tratadas com TAP-07 e TP-07 após 24 (A e C) e 48 (B e D) horas de incubação. O controle negativo (NC) foi tratado com o veículo (0,1% de DMSO) usado para diluir a substância testada. A doxorubicina (DOX, 2 μ M) foi utilizada como controle positivo. Os dados são apresentados como a média $\pm$ S.E.M. De pelo menos três experimentos independentes realizadas em duplicata. * $P < 0,05$ em comparação com o controle negativo por ANOVA seguido do teste de comparação múltipla da Dunnett.

5.3 Indução de morte celular por apoptose na linhagem celular HepG2 e HL60 pelos compostos 2-piridil-2,3-tiazol

A análise morfológica realizada após a coloração de may-grunwald-giemsa mostrou que ambas as linhagens celulares HepG2 e HL-60 tratadas com TAP-07 e TP-07 durante 24h e 48h apresentaram fragmentação dos núcleos que se tornaram mais evidentes em concentrações mais elevadas. Uma redução no volume celular foi frequentemente verificada em células com núcleos alterados (Fig. 12).

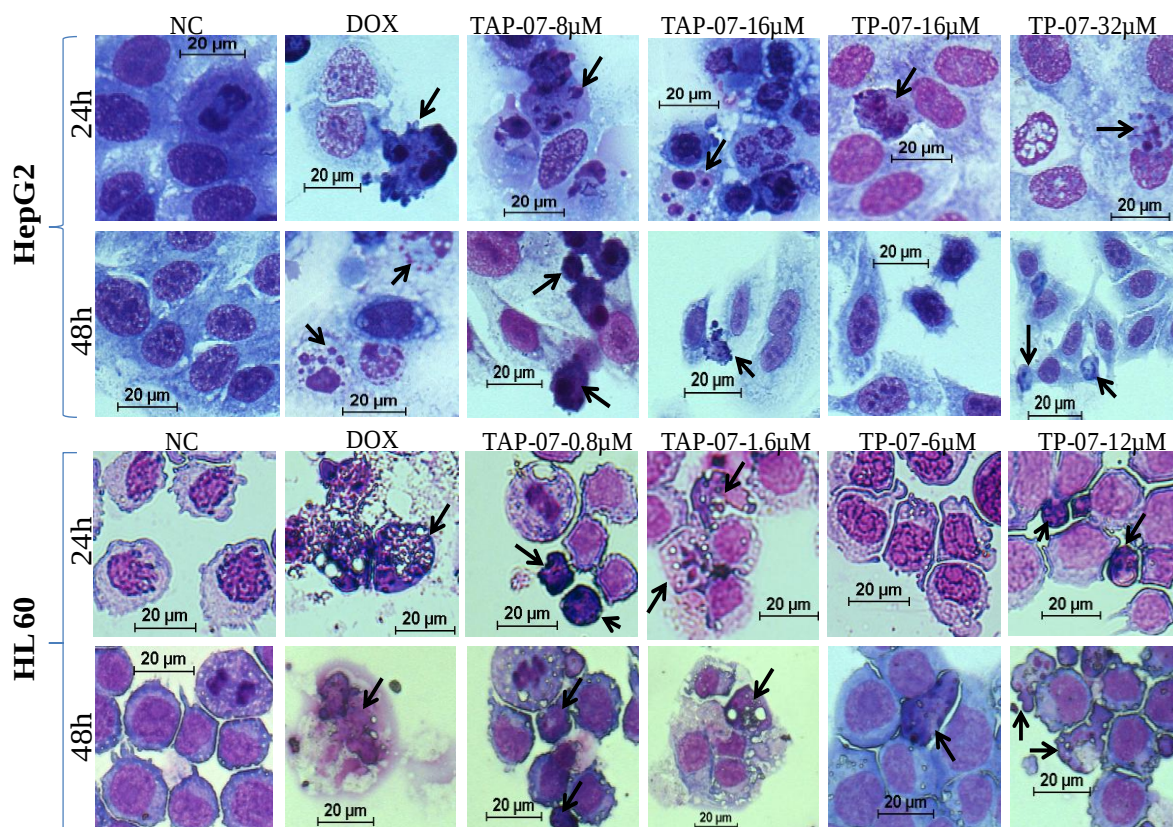
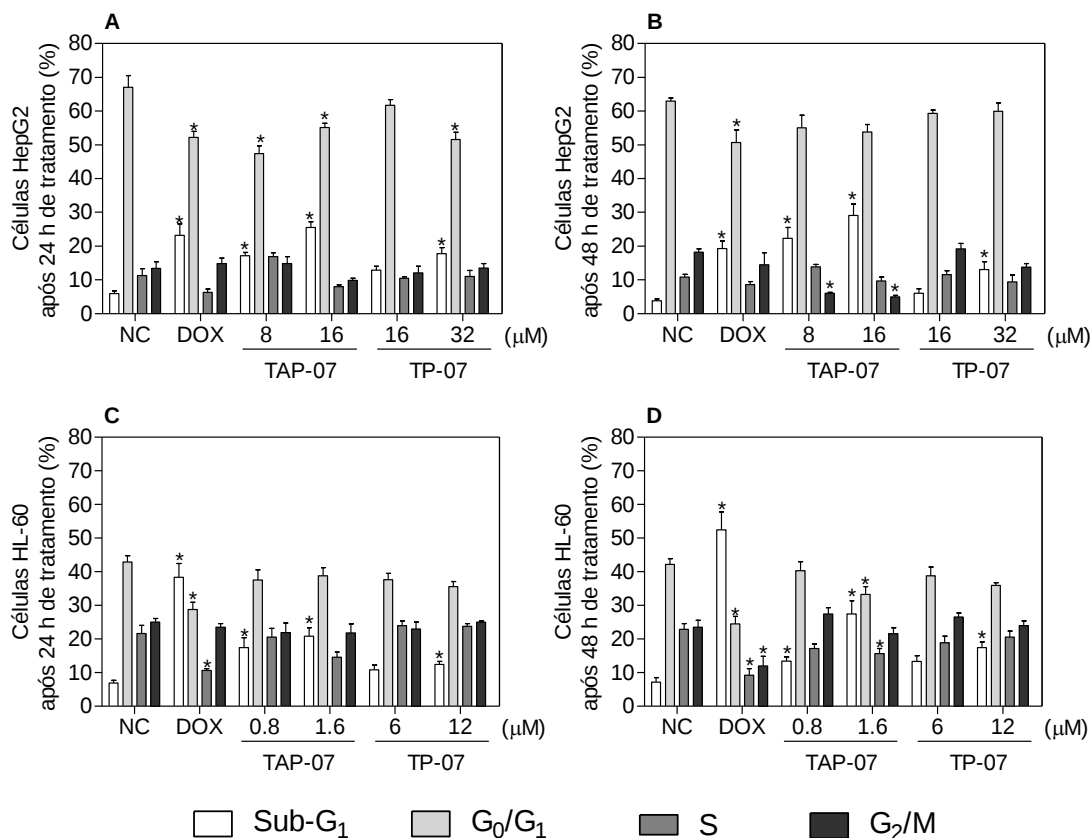


Figura 12: Análise microscópica de células HepG2 e HL-60 coradas com may-grunwald-giemsa após 24h e 48 h de incubação. O controle negativo (NC) foi tratado com o veículo (0,1% de DMSO) usado para diluir a substância testada. A doxorubicina (DOX, 2 µM) foi utilizada como controle positivo. As setas indicam células com DNA fragmentado.

Nos controles negativos, descobriram-se células mitóticas que indicam o estado proliferativo das linhagens celulares, bem como o núcleo da célula interfase em forma redonda. As análises da distribuição de DNA por citometria de fluxo também foram incluídas no estudo. Foi encontrada fragmentação de DNA internucleossomal significativa ($p < 0,05$) de $17,2 \pm 2,4\%$, $25,5 \pm 4,0\%$ e $17,8 \pm 4,4\%$ em células HepG2 após 24h de tratamento com TAP-07 a 8µM e 16µM e TP-07 a 32µM, Respectivamente, em comparação com o controle ($5,9 \pm 2,0\%$) (Fig. 13).

**Figura**

13: Conteúdo de DNA analisado por citometria de fluxo de células HepG2 (A e B) e HL-60 (C e D) tratadas com TAP-07 e TP-07 após 24h (A e C) e 48 h (B e D) de incubação. O controle negativo (NC) foi tratado com o veículo (0,1% de DMSO) usado para diluir a substância testada. A doxorubicina (DOX, 2 μM) foi utilizada como controle positivo. Os dados são apresentados como a média ± S.E.M. de pelo menos três experimentos independentes realizadas em duplicata. Foram avaliados dez mil eventos por experimento e os detritos celulares foram omitidos na análise. * P < 0,05 em comparação com o controle negativo por ANOVA seguido do teste de comparação múltipla da Dunnett.

O tratamento de células HepG2 com TAP-07 (8μM e 16μM) e TP-07 (32μM) reduziu o número de células em G₀ / G₁ (p < 0,05). A fase S e as fases G₂ / M do ciclo celular não foram afetadas pelo tratamento TAP-07 nem TP-07. Após 48h de tratamento, observou-se aumento (p < 0,05) da fragmentação do DNA internucleosomal em células HepG2 após o tratamento com TAP-07 a 8μM e 16μM (22 e 29% da população sub-G₁, respectivamente, em comparação com 3,8% do controle negativo). TAP-07 significativamente (p < 0,05) reduziu o número de células HepG2 em G₂/M após 48h de tratamento. A população G₂/M do controle negativo foi 18,2 ± 2,4%, enquanto que para as células tratadas com TAP-07 a 8μM e 16μM, a porcentagem de células em G₂/M foi de 6,0 ± 0,6 e 4,9 ± 1,1, respectivamente. As análises quantitativas por citometria de fluxo revelaram um aumento no conteúdo de DNA fragmentado de células HL-60 tratadas com TAP-07 a 0,8μM e 1,6μM e TP-07 a 12μM (a população sub-G₁ foi de 6,9 ± 2,0% no controle negativo e aumentou para 17,5 ± 7,0%, 20,8 ± 6,0% e 12,4 ± 2,0 após 24h do

tratamento com TAP-07 a 0,8 μ M, 1,6 μ M e TP-07 a 12 μ M, respectivamente. Quando as células HL60 foram tratadas com TAP-07 e TP-07 durante 48h, o efeito de TAP-07 e TP-07 na indução fragmentada do DNA foi mais potente.

A externalização da fosfatidilserina foi avaliada pela marcação com anexina V/iodeto de propídio. A porcentagem de células positivas de HepG2 anexina V (apoptose) foi significativamente maior após 24h de tratamento com TAP-07 e TP-07 a 16 μ M ($7,9 \pm 0,6\%$) e 32 μ M ($9,0 \pm 3,3\%$), respectivamente, em comparação com a Controle ($4,3 \pm 0,8\%$). Observou-se um aumento significativo nas células necróticas de HepG2 para o tratamento TP-07 a 32 μ M ($4,7 \pm 0,4$) e doxorrubicina ($88,7 \pm 5,3$) em comparação com o controle negativo (0,9%) (Fig.14).

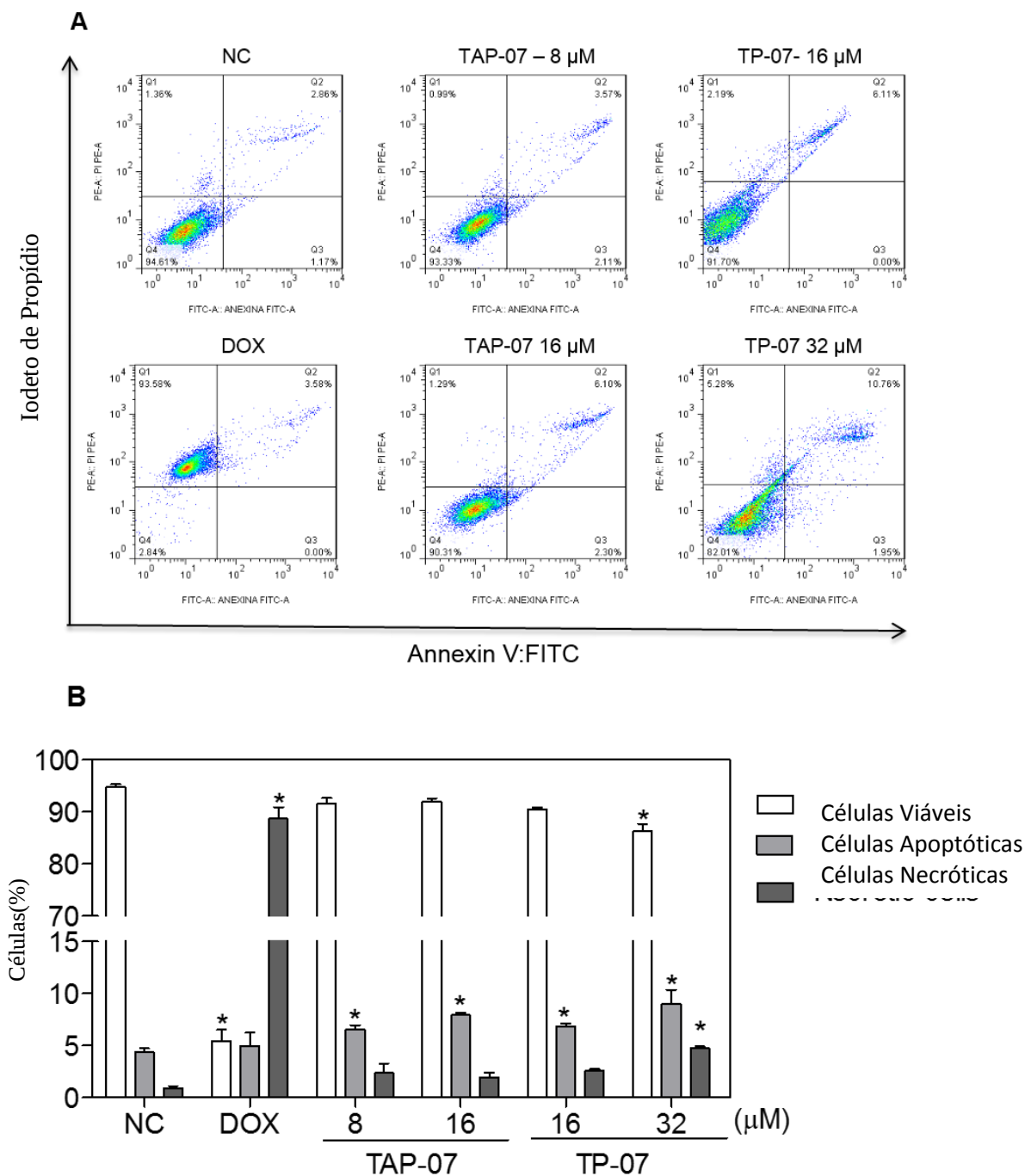


Figura 14: Efeito dos compostos TAP-07 e TP-07 na indução da apoptose na linha celular HepG2 após 24 h de incubação. A - Partes de pontos de citometria de fluxo representativas mostrando a porcentagem de células em estágios viáveis, apoptóticos e necróticos. B - Quantificação da viabilidade celular determinada por citometria de fluxo usando anexina V / PI. O controle negativo (NC) foi tratado com o veículo (0,1% de DMSO) usado para diluir a substância testada. A doxorrubicina (DOX, 2 μM) foi utilizada como controle positivo. Os dados são apresentados como a média ± S.E.M. de pelo menos três experiências independentes realizadas em duplicata. Foram avaliados dez mil eventos por experimento e os detritos celulares foram omitidos na análise. * P < 0,05 em comparação com o controle negativo por ANOVA seguido do teste de comparação múltipla da Dunnett.

As células positivas para anexina V não foram observadas para células HL60, após 24h de tratamento com TAP-07 (1,6 μM) e TP-07 (12 μM) (dados não mostrados).

5.4 Ensaios *in vivo*

5.4.1 Avaliação da redução do desenvolvimento do tumor de células HepG2 pelos compostos 2-piridil-2,3-tiazol em modelo xenográfico

Para investigar se os compostos 2-piridil-2,3-tiazol têm atividade antitumoral *in vivo*, os camundongos SCID C.B-17 foram enxertados com células HepG2 e tratados com TAP-07 e TP-07 por via intraperitoneal uma vez por dia durante 21 dias consecutivos. TAP-07 e TP-07 foram capazes de inibir o crescimento de células HepG2 em camundongos. (Fig. 15A) mostra a inibição obtida. No 21º dia, o peso médio do tumor dos camundongos de controle negativo foi de $0,60 \pm 0,08$ g. Na presença de TAP-07 e TP-07 (40 mg / kg), os pesos médios do tumor foram $0,19 \pm 0,03$ e $0,32 \pm 0,04$ g, respectivamente. A massa tumoral foi significativamente reduzida em animais tratados com TAP-07 em 73,0%, enquanto o tratamento com TP-07 inibiu o crescimento do tumor em 47,0%. O controle positivo (5-FU, 10 mg / Kg) reduziu o peso do tumor em 41,4%.

Nas análises histológicas, observamos em todos os grupos um tumor de padrão sólido hipervascularizado que mostra células tumorais poligonais, apresentando pleomorfismo, citoplasma grão eosinofílico, núcleos arredondados e nucleolos proeminentes. Figuras mitóticas, poucas estruturas pseudoglandulares e áreas esteatóticas estavam presentes. As células tumorais foram cercadas por estroma fibroso. Embora a necrose tenha sido frequente em todos os grupos, esse aspecto foi muito mais evidente no grupo TAP-07, quando comparado aos demais, especialmente no controle negativo (Fig. 15B).

5.4.2 Avaliação dos parâmetros toxicológicos de animais tratados com os compostos 2-piridil-2,3-tiazol em modelo xenográfico de HepG2

Os parâmetros toxicológicos sistêmicos foram examinados em camundongos tratados com 2-piridil-2,3-triazol. Não houve diferença na massa corporal dos camundongos CB-17 SCID com tumor de células HepG2 após 21 dias de tratamento com TAP-07 (40mg/kg) ou TP-07 (40mg/kg), nem no fígado, nos rins, nos pulmões e massa do coração, quando comparado ao controle negativo ($p > 0,05$) (Tabela 9). O peso do fígado dos animais tratados com o controle positivo (5-FU, 10 mg / kg) foi reduzido, quando comparado ao controle negativo ($p < 0,05$).

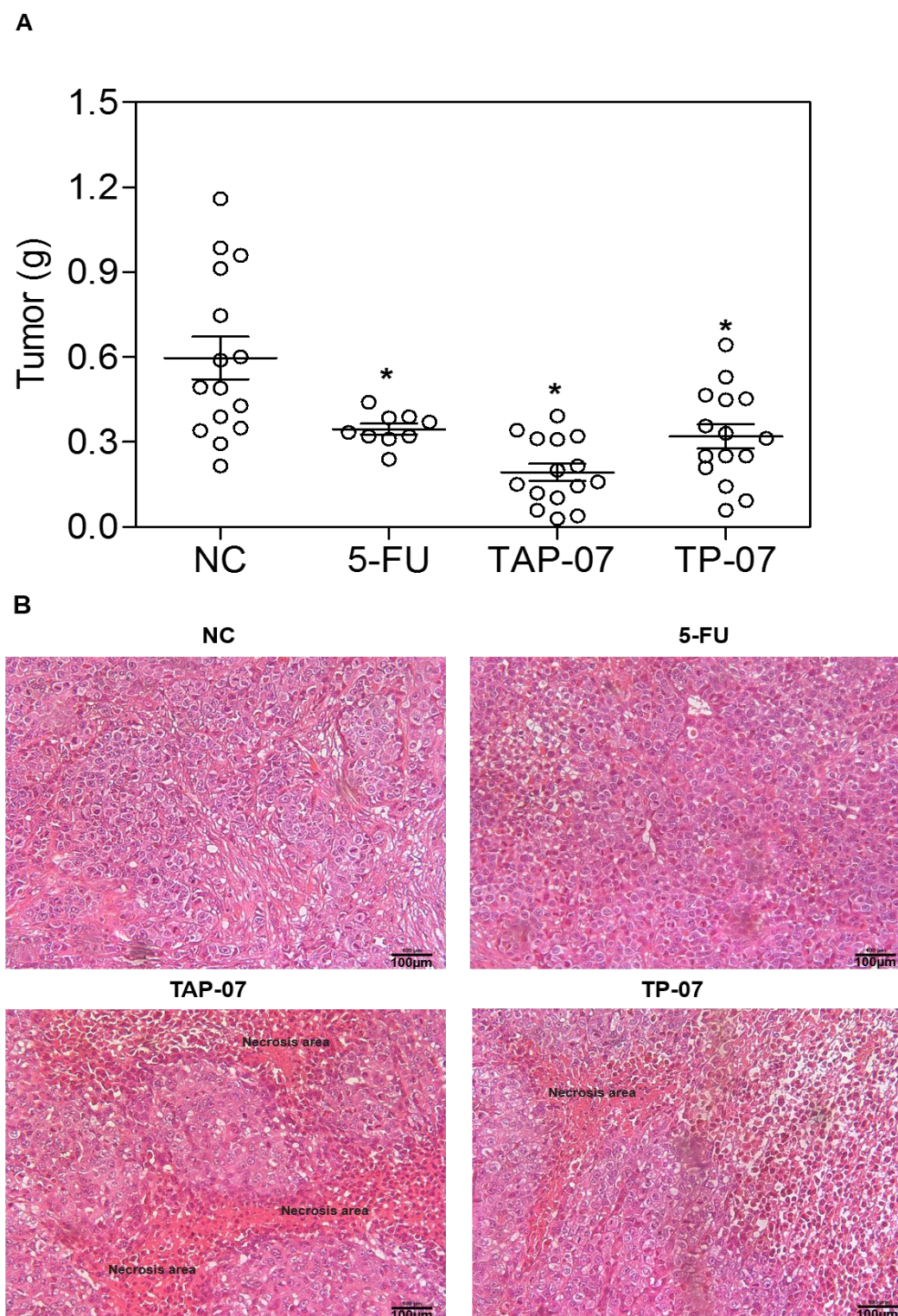


Figura 15: Atividade antitumoral in vivo de TAP-07 (40 mg / kg) e TP-07 (40 mg / kg) em camundongos SCID C.B-17 portadores de células HepG2. A - Quantificação do peso do tumor. B - Análises histológicas representativas dos tumores. O controle negativo (NC) foi tratado com o veículo (5% de DMSO) usado para diluir a substância testada. O 5-Fluorouracil (5-FU, 10 mg / kg) foi utilizado como o controle positivo. A partir de 1 dia após a implantação do tumor, os animais foram tratados através da via intraperitoneal por 21 dias consecutivos. Os dados são apresentados como a média $\pm$ S.E.M. de 9-15 animais. * $P < 0,05$ em comparação com o controle negativo por ANOVA seguido do teste de comparação múltipla da Dunnett.

Tabela 9: Efeito de TAP-07 e TP-07 no corpo e massa do órgão relativo de camundongos SCID C.B-17 portadores de células HepG2

Parametros	NC	5-FU	TAP-07	TP-07
Dose (mg/kg)	-	10	40	40
Peso corporeo final (g)	27.1±1.3	26.1±1.7	26.6±1.6	26.9±1.7
Peso corporeo inicial (g)	26.2±1.9	26.2±1.0	25.47±1.9	26.9±1.9
Fígado (g/100g massa)	4.16±0.8	3.37±0.74*	3.65±0.66	4.38±1.0
Rins (g/100g massa)	1.47±0.37	1.15±0.4	1.13±0.38	1.59±0.37
Coração (g/100g massa)	0.51±0.19	0.50±0.19	0.48±0.10	0.46±0.16
Pulmão (g/100g massa)	0.71±0.29	0.62±0.19	0.69±0.20	0.61±0.19

O controle negativo (NC) foi tratado com o veículo (5% de DMSO) usado para diluir a substância testada. O 5-Fluorouracil (5-FU, 10 mg / kg) foi utilizado como o controle positivo. A partir de 1 dia após a implantação do tumor, os animais foram tratados através da via intraperitoneal por 21 dias consecutivos. Os dados são apresentados como a média ± S.E.M. De 9-15 animais. * P <0,05 em comparação com o controle negativo por ANOVA seguido do teste de comparação múltipla da Dunnett.

Os animais também foram analisados em relação à contagem de células brancas e de eritrócitos (Tabela 10).

Tabela 10: Efeito de TAP-07 e TP-07 em parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos C.B-17 SCID portadores de células HepG2

Parameters	Non-tumor	NC	5-FU	TAP-07	TP-07
Dose (mg/kg)	-	-	10	40	40
Eritrocitos (10^6 cel/ μ L)	2.87 $\pm$ 0.6	3.32 $\pm$ 1.6*	2.2 $\pm$ 1.91*	2.17 $\pm$ 1.35*	2.15 $\pm$ 1.8*
Leucocitos Totais (10^3 cel/ μ L)	1.0 $\pm$ 0.2	5.3 $\pm$ 0.9	1.9 $\pm$ 0.4*	1.9 $\pm$ 0.8*	4.9 $\pm$ 1.1
Leucocitos diferenciais (%)					
Neutrofilos	41.0 $\pm$ 4.9	74.0 $\pm$ 6.9	65.0 $\pm$ 9.7	91.1 $\pm$ 2.2*	86.3 $\pm$ 3.8*
Linfócitos	53.8 $\pm$ 5.3	22.0 $\pm$ 4.7	32.8 $\pm$ 9.3*	6.6 $\pm$ 2.3*	11.3 $\pm$ 3.0*
Monocitos	3.2 $\pm$ 0.7	1.0 $\pm$ 0	1.3 $\pm$ 0.5	1.0 $\pm$ 0	1.3 $\pm$ 0.8
Eosinofilos	1.2 $\pm$ 0.4	1.3 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 0	1.1 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 0

O grupo não tumoral representa camundongos SCB C.B-17 sem inoculação do tumor ou qualquer tratamento. O controle negativo (NC) foi tratado com o veículo (5% de DMSO) usado para diluir a substância testada. O 5-Fluorouracil (5-FU, 10 mg / kg) foi utilizado como o controle positivo. A partir de 1 dia após a implantação do tumor, os animais foram tratados através da via intraperitoneal por 21 dias consecutivos. Os dados são apresentados como a média $\pm$ S.E.M. De 6 animais. * P <0,05 em comparação com o controle negativo (NC) por ANOVA seguido do Teste de comparação múltipla da Dunnett.

Verificou-se uma diminuição do número total de leucócitos nos grupos TAP-07 e 5-FU em comparação com o grupo tratado com DMSO (p <0,05). Se compararmos os leucócitos totais de animais tratados com TAP-07 ($1,9 \pm 0,410^3/\mu$ L) com os animais sem tumor ($1,0 \pm 0,2 10^3/\mu$ L), não é encontrada diferença significativa entre os grupos. O número de eritrócitos também foi reduzido nos grupos TAP-07, TP-07 e 5-FU. Os parâmetros bioquímicos clínicos (Tabela 11) que foram medidos para investigar as alterações da função hepática foram alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP), albumina (ALB), colesterol e bilirrubina total. ALT, AST e ALP foram significativamente (p <0,05) reduzidos após o tratamento com TAP-07 e TP-07 40mg/Kg quando comparado ao controle negativo; No entanto, os níveis de enzimas estavam

no intervalo normal. ALB, colesterol e bilirrubina total não foram afetados pelo tratamento. O 5-FU não alterou os parâmetros bioquímicos descritos acima. Como indicador da função renal, mediu-se a creatinina (CREA) e o nitrogênio ureico no sangue (BUN). Não houve alteração no BUN de animais tratados com TAP-07, TP-07 e 5-FU, enquanto que para os níveis de CREA, apenas os animais tratados com TP-07-40 mg/Kg apresentaram redução no sangue. A amilase, uma enzima pancreática, foi medida para verificar o dano do pâncreas. Não foi observada alteração na amilase sanguínea em nenhum grupo de animais tratados com TAP-09, TP-07 e 5-FU. A creatina quinase com correlação com a lesão do músculo cardíaco e esquelético foi reduzida em todos os grupos tratados em comparação com ao controle ($p < 0,05$). Os níveis de glicose, cálcio e fosfato não foram alterados entre os grupos (Tabela 11).

Tabela 11: Efeito de TAP-07 e TP-07 em parâmetros bioquímicos clínicos de sangue periférico de camundongos SCID C.B-17 portadores de células HepG2

Parametros	NC	5-FU	TAP-07	TP-07
Dose (mg/kg)	-	10	40	40
ALT (U/L)	8.8±2.1	10.2±1.2	2.2±0.5*	5.5±0.5*
AST (U/L)	57.0±3.7	64.0±32.6	11.2±3.2*	19.0±2.1*
ALP (U/L)	49.6±10.0	44.5±6.7	12.0±3.1*	11.7±2.1*
ALB (mg/dl)	3.1±0.4	3.0±0.9	3.2±0.6	1.8±0.4
GLU (mg/dl)	203.0±83.9	244.3±45.2	281.0±29.9	205.8±4.4
CREA (mg/L)	0.6±0.1	0.7±0.1	0.6±0.08	0.3±0.1*
CK (U/L)	77.6±7.5	53.5±2.3*	22.2±3.3*	47.7±1.7*
AML (U/ml)	1.243±208	1.140±444	1.078±144	1.364±261
Colesterol (mg/dl)	123.0±33.1	195.5±28.0	182.0±12.8	72.0±18.9
BUN (mg/dl)	45.6±21.1	36.2±7.2	33.9±2.8	39.0±8.9
BIL Total (mg/dl)	0.1±0.05	0.1±0.05	0.1±0.05	0.2±0.2
CÁLCIO (mg/dl)	8.3±1.3	8.6±2.9	6.1±0.7	6.9±1.1
FOSFATO (mg/dl)	16.7±2.9	19.0±1.0	17.3±1.5	16.3±0.7

O controle negativo (NC) foi tratado com o veículo (5% de DMSO) usado para diluir a substância testada. O 5-Fluorouracil (5-FU, 10 mg / kg) foi utilizado como o controle positivo. A partir de 1 dia após a implantação do tumor, os animais foram tratados através da via intraperitoneal por 21 dias consecutivos. ALT: alanina aminotransferase. AST: aspartato aminotransferase; ALP: fosfatase alcalina; ALB: albumina; CREA: creatinina; CK: creatina quinase; AML: amilase; BUN: nitrogênio uréico no sangue. BIL Total: Bilirrubina total. Os dados são apresentados como a média ± S.E.M. De 4-5 animais. * P <0,05 em comparação com o controle negativo por ANOVA seguido do teste de comparação múltipla da Dunnett.

5.4.3 Avaliação histopatológica dos órgãos de camundongos portadores do tumor de células HepG2 tratados pelos compostos 2-piridil-2,3-tiazol

A análise histopatológica foi realizada no fígado, rins, pulmões e corações de todos os grupos (Fig. 16).

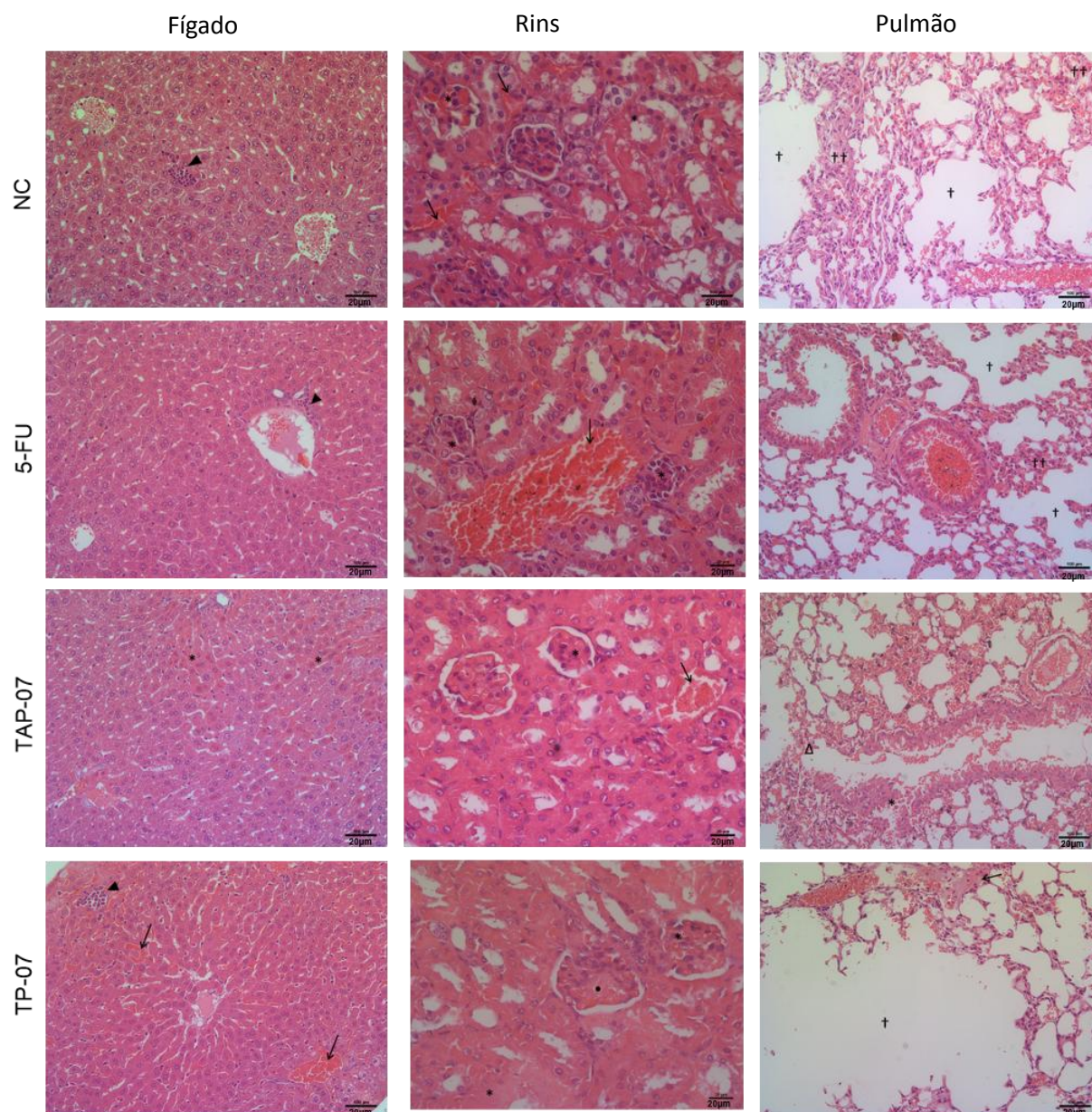


Figura 16: Análise histopatológica de órgãos de camundongos SCID C.B-17 portadores de células HepG2 tratadas com TAP-07 (40 mg / kg) e TP-07 (40 mg / kg) coradas com hematoxilina e eosina e analisadas por microscopia óptica. O controle negativo (NC) foi tratado com o veículo (5% de DMSO) usado para diluir a substância testada. O 5-Fluorouracil (5-FU, 10 mg / kg) foi utilizado como o controle positivo. A partir de 1 dia após a implantação do tumor, os animais foram tratados através da via intraperitoneal por 21 dias consecutivos. Símbolos: congestionamento; inflamação; * Necrose; † enfisema; †† atelectasia; • hialinização.

A análise histopatológica dos fígados revelaram degeneração hidrópica, áreas dispersas de necrose de coagulação e inflamação em todos os grupos experimentais. Deve-se notar que essas

características histopatológicas foram mais pronunciadas no grupo TP-07, em comparação com os demais grupos (controle negativo, 5-FU e TAP-07). Nos rins, observaram-se congestão, hemorragia, esclerose glomerular, dilatação e inflamação tubulares, bem como a necrose tubular focal em todos os grupos. Nos pulmões, atelectasias, enfisema, hemorragia focal, inflamação aguda e congestionamento vascular foram observados em todos os animais. A necrose bronquiolar foi observada nos grupos TP-07 e TAP-07. A análise histopatológica dos corações não apresentou alterações em nenhum grupo.

6. DISCUSSÃO

A química medicinal faz o aproveitamento do esqueleto ativo destas moléculas, modificando, através de modelagem molecular ou outras técnicas de síntese, pequenos radicais, que podem ser adicionados ou retirados da estrutura, a fim de melhorar as propriedades farmacológicas do composto, aumentando sua eficácia e segurança, diminuindo os efeitos colaterais (QIAN, *et al*, 2007; ORTHOLAND; GANESAN, 2004).

Os novos agentes estudados podem ser utilizados como protótipos para a síntese de análogos mais promissores. A obtenção de análogos é um processo comumente utilizado para descobrir os grupamentos essenciais à atividade biológica, e isso pode ser feito através de estudos da relação entre a estrutura e atividade biológica servindo de base para a otimização molecular (WILSON; DANISHEFSKY, 2007). A atividade citotóxica *in vitro* e a avaliação antitumoral *in vivo* dos compostos TAP e TP foram estudadas pela primeira vez nesta comunicação. A maioria dos compostos era citotóxica para pelo menos três linhas celulares, com exceção de TP-11, que se mostrou citotóxico para apenas uma linhagem celular (HL-60).

Pequenas mudanças nas moléculas podem significar alteração do efeito biológico de um composto, sendo favorável, portanto, a produção de derivados por técnicas químicas de semi-síntese na pesquisa de novos fármacos, inclusive para drogas anticâncer (LEE, 2013). A modelagem molecular ou outras técnicas de síntese podem melhorar as propriedades farmacológicas do composto, aumentando sua eficácia e diminuindo os efeitos tóxicos (ORTHOLAND; GANESAN, 2004). A citotoxicidade dos compostos TAP e TP em HL-60, MCF-7 e NCI-H292 não mudou significativamente, sendo ambos os grupos de compostos altamente potentes. No entanto, para a linhagem celular HepG2, alguns compostos apresentaram citotoxicidade, sendo TAP-07 e TP-07 compostos mais potentes. Vale ressaltar que o câncer de fígado é a segunda causa mais comum de morte por câncer em todo o mundo (SIEGEL *et al.*, 2016). Derivados de piridil 1,3-tiazole foram descritos para apresentar citotoxicidade para câncer de cólon HT29 e células de leucemia Jurkat com valores de IC₅₀ de 25,22 e 16,2 µM, respectivamente (dos Santos *et al.*, 2016). Além disso, os derivados de piridil-1,3-tiazol induziram a produção de TNF em macrófagos (DOS SANTOS *et al.*, 2016).

O maior desafio na descoberta de drogas no combate ao câncer passa por este dilema de desenvolver uma molécula potencialmente tóxica às células tumorais e inerte às normais (ANAZETTI *et al.*, 2003). Embora sejam potentes citotóxicas para células tumorais, alguns dos compostos TAP e TP também foram citotóxicos para células não tumorais (PBMC) com baixo índice seletivo resultante. Por outro lado, TAP-07 e TP-07 não foram citotóxicos para células não tumorais (PBMC) nas concentrações testadas e apresentaram uma citotoxicidade potente ao crescimento das células tumorais. Desta maneira o estudo do potencial citotóxico de uma substância, é de fundamental importância à utilização de células normais, tais como os linfócitos, para avaliar a seletividade do fármaco teste para células normais ou tumorais (ZUCO *et al.*, 2002; ANAZETTI *et al.*, 2003). O método da citotoxicidade eritrocitária é um ótimo indicador para averiguar agressão *in vitro*, por causa da estabilidade mecânica característica da membrana da hemácia (SHARMA; SHARMA, 2001). As EC_{50} da TAP 07 e TP 07 mostraram-se acima de 250µg/mL indicando que não houve hemólise. De acordo com (COSTA *et al.*, 2014) as moléculas que não causam lise das hemácias humanas sugerem que o mecanismo de ação citotóxico dos compostos não é devido a um dano direto sobre a membrana plasmática da célula, podendo ser relacionando-se a um mecanismo de morte mais específico, como por exemplo, uma possível interferência com os mecanismos intracelulares.

Devido à citototoxicidade seletiva em relação às células cancerosas, TAP-07 e TP-07 foram selecionados para mais experimentos em duas linhagens celulares, HepG2 e HL-60. O tratamento com TAP-07 e TP-07 indicou redução do número de células, alterações nas características morfológicas das células e aumento da fragmentação do DNA internucleosomal. Estes efeitos foram observados tanto para as células HL-60 como as células HepG2, sendo HL-60 mais sensível a ambos os compostos que as células HepG2.

A apoptose é caracterizada pela externalização da fosfatidilserina, vazamento do citocromo c da mitocôndria e ativação de caspases que inicialmente leva a condensação nuclear e citoplasmática e, finalmente, a ruptura da célula em vários fragmentos bem conservados (KERR *et al.*, 1972); (LEIST e JÄÄTTELÄ, 2001). Foi observado um aumento nas células apoptóticas de HepG2 caracterizadas pela externalização da fosfatidilserina. No entanto, o número de células apoptóticas HL60

não aumentou após 24h. Os compostos de piridil-tiazóis induziram a morte celular por apoptose em células HT-29 após 72h de tratamento, enquanto que para a linhagem celular Jurkat foi observado um elevado nível de células marcadas com iodeto de propídio (necrosis) (DOS SANTOS *et al.*, 2016). Até agora, o TAP-07 foi mais potente do que a avaliação citotóxica *in vitro* TP-07. TAP-07 difere de TP-07 apenas pelo metil em C6. Para a atividade tripanocida, foram importantes algumas características da estrutura, como o presente de um grupo metil em C6, o anel de piridina e o anel de tiazol (CARDOSO *et al.*, 2014).

TAP-07 e TP-07 também foram testados em um modelo de xenográfico de carcinoma hepatocelular. Os tumores de animais tratados com TAP-07 e TP-07 foram reduzidos. Além disso, a área de necrose nos tumores foi maior quando os animais foram tratados com TAP-07 em comparação com outros grupos. A avaliação do tumor *in vivo* confirma a atividade *in vitro* de compostos de piridil-tiazol.

A perda de peso é um sinal significativo de toxicidade em animais sob tratamento com quimioterapia contra o câncer. O ganho de peso corporal e a pesagem de órgãos de animais tratados com TAP-07 e TP-07 não foram diferentes do controle negativo, sugerindo a ausência de toxicidade grave. As enzimas hepáticas foram reduzidas após o tratamento com TAP-07 e TP-07. No entanto, um aumento nas enzimas sugerem lesão ao fígado, em vez da redução encontrada (Giannini *et al.*, 2005).

Além disso, bilirrubina, albumina e colesterol estavam em níveis normais. A redução da atividade enzimática do fígado pode estar relacionada à presença de farmacóforos com função inibitória enzimática conhecida. As moléculas que apresentam uma piridina-tiosemicarbazonas ou a sua ciclização em tiazóis como farmacóforos são descritas como inibidores enzimáticos. A triapina, um composto de piridina-tiosemicarbazona com propriedades anticancerígenas, apresenta atividade inibidora de ribonucleótido redutase (NIU *et al.*, 1995). Alguns derivados de hidrazina-tiazole apresentaram inibição de dihidroorotate desidrogenase humana com atividade anti-artrítica *in vivo* e inibição mitocondrial de monoamina oxidase de fígado de rato (LI *et al.*, 2015); (RACITI *et al.*, 1995).

Os parâmetros bioquímicos do rim, pulmão e coração estavam no intervalo normal. A análise histopatológica de órgãos não mostrou lesão permanente após o tratamento com derivados de pildril 1,3-tiazol. Algumas características histopatológicas deste estudo (degeneração hidrópica, congestionamento vascular e áreas focais de

inflamação) são respostas celulares agudas ao estímulo não relacionado ao tratamento e as células lesadas podem retornar a um estado homeostático quando a agressão termina. Os leucócitos totais não foram reduzidos após o tratamento com TAP-07 quando comparados com animais sem tumor. A leucocitose é freqüentemente encontrada em pacientes com tumor sólido e, em alguns casos, está associada a pior prognóstico (SCHERNBERG *et al.*, 2017); (MABUCHI *et al.*, 2011). O tratamento com TAP-07 trouxe de volta ao intervalo normal o número de leucócitos, que foram aumentados pela presença do tumor (grupo tratado com DMSO). Na verdade, nenhum dos sintomas de toxicidade foi percebido em animais tratados com TAP-07 por 21 dias consecutivos.

O desenvolvimento de novos fármacos sem efeito secundário é um grande desafio. Aqui, apresentamos dois novos compostos com atividade anti-câncer de fígado e baixa toxicidade. Em conclusão, o TAP-07 e o TP-07 apresentaram efeitos tumorais anti-hepáticos *in vitro* e *in vivo* sem sinais importantes de toxicidade, sendo o TAP-07 que difere do TP-07 apenas pelo metil em C6, mais potente como composto antitumoral.

7. CONCLUSÕES

Dentre todos os resultados obtidos neste estudo, podemos evidenciar que as moléculas obtidas a partir da série das TAP, TP, TS e TZ, as: TAP- 07, TP -07 foram as que melhor apresentaram melhor atividade anticâncer, devido capacidade de produzir baixa toxicidade quando expostas a células mononucleares do sangue periférico humano de doadores saudáveis (Linfócitos) indicando segurança nas concentrações testadas. Adicionalmente os compostos não foram capazes de causar hemólise em células do sangue periférico humano (hemácias). Além da série de moléculas TZ não apresentarem hemólise, elas também não mostraram considerável ação citotóxica. Os tumores sólidos da linhagem HepG2 em animais tratados com TAP-07 e TP-07 foram reduzidos. O ganho de peso corporal e a pesagem de órgãos dos animais tratados, com TAP-07 e TP-07, assim como as dosagens bioquímicas e hematológicas não sugerem toxicidade grave. Esses resultados ressaltam as propriedades antitumorais das séries tiossemicarbazonas, tiazóis e piridinas evidenciando que eles podem ser considerados como protótipos para o desenvolvimento de novos agentes anticâncer.

REFERENCIAS

AFRASIABI, Z.; Sinn, E.; Chen, J. N.; Ma, Y. F.; Rheingold, A. L.; Zakharov, L. N.; Rath, N.; Padhye, S. **Inorg. Chim. Acta** 2004, 357, 271.

AFRASIABI, Z.; Sinn, E.; Padhye, S.; Dutta, S.; Padhye, S.; Newton, C.; Anson, C. E.; Powell, A. K. J. **Inorg. Biochem.** 2003, 95, 306.

ALIABADI, A. *et al.* **European Journal of Medicinal Chemistry.** v. 45, p. 5384-5389. 2010.

ALMEIDA, Vera Lúcia de et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, Belo Horizonte, v. 28, n. 1, p.118-129, 2005.

ANA I. MATESANZ; PILAR SOUZA, -n-heterocyclic thiosemicarbazone derivatives as potential antitumor agents: a structure-activity relationships approach. **Mini-reviews in medicinal chemistry**, 9, 1389-1396, 2009.

ANAZETTI, M.C.; MELO, P.S.; DURAN, N.; HAUN, M. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL-60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology**, v.188, 261-274p., 2003.

BERNARDI, A.; JACQUES-SILVA, M. C.; LENZ, G. Abordagem molecular no desenvolvimento de fármacos anti-tumorais. **Infarma** : v. 15(9-10), p. 61-64. 2003.

BERNHARDT, P. V; Chin, P.; Sharpe, P. C.; Richardson, D. R. Dalton transactions (**Cambridge, England** : 2003) 2007, 9226, 3232-44.

BERNHARDT, P. V; Sharpe, P. C.; Islam, M.; Lovejoy, D. B.; Kalinowski, D. S.; Richardson, D. R. **Journal of medicinal chemistry** 2009, 52, 407-15.

BHARTI, N.; Athar, F.; Maurya, M. R.; Azam, A. **Bioorganic & medicinal chemistry** 2004, 12, 4679-84.

BHARTI, N.; Husain, K.; Gonzalez Garza, M. .; Cruz-Vega, D. E.; Castro-Garza, J.; Mata-Cardenas, B. D.; Naqvi, F.; Azam, A. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 2002, 12, 3475-3478.

BHARTI, Shailendra, N.; Naqvi, F.; Azam, A. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 2003, 13, 689-692.

BOENTE, P. C.; SAMPAIO, C.; DEL GIGLIO, A. Agentes Antineoplásicos. *In*: SILVA, P. Farmacologia. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 8 ed. 2010.

BONASSA, E.M.A. & SANTANA, T.R. **Enfermagem em Terapêutica Oncológica**. Atheneu, 3ª Ed., 3-15p., 2005.

BRANNON-PEPPAS, L. & BLANCHETTE, J.O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. **Adv. Drug Deliv. Ver.**, v.56, 1649-1659p., 2004.

BRASIL. Instituto Nacional do Câncer -INCA. Estatísticas do Câncer. Vigilância do Câncer e de Fatores de Risco. [Acesso em Janeiro de 2017]. **Disponível em:** <http://www1.inca.gov.br/vigilancia/>

BRASIL. Instituto Nacional do Câncer -INCA. Fisiopatologia do câncer. [Acesso em 4 de Janeiro de 2017]. **Disponível em:** <http://www.inca.gov.br/enfermagem/docs/cap2.pdf>

BRASIL. Instituto Nacional do Câncer -INCA..[Acesso em fevereiro de 2017]. **Disponível em:** http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=335.

BRASIL. Instituto nacional do Câncer-INCA. Estimativa 2016/2017. Incidência de câncer no Brasil. [acesso em jan 2017]. **Disponível em** <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016>.

BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br>. Acesso em: 08 de março de 2017.

BRASILEIRO-FILHO, G. **Bogliolo Patologia**. Guanabara Koogan, 7ª Ed., Rio de Janeiro, 43 236p., 2006.

BREDESEN, D.E. Toward a mechanistic taxonomy for cell death programs. **Stroke**, v.38, 652 660p., 2007.

BUTLER, M.S. The role of natural products in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v.67, 2141–2153p., 2004.

CALABRESI, P.; CHABNER, B.A. Quimioterapia das doenças neoplásicas. In: GILMAN, A.G.. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9ª edição. McGraw-Hill Interamericana, Rio de Janeiro, p. 903-949, 1997.

CAPUTTO, M. E.; Ciccarelli, A.; Frank, F.; Moglioni, A. G.; Moltrasio, G. Y.; Vega, D.; Lombardo, E.; Finkielstein, L. M. **European journal of medicinal chemistry** 2012, 55, 155–63.

CARDOSO, M. V. O.. Síntese e Avaliação da Atividade Antichagásica de Novas Hidrazonas. 2012. **Tese (Doutorado em Inovação Terapêutica)** - Universidade Federal de Pernambuco, coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior. orientador: Ana Cristina Lima Leite.

CARDOSO, M.V. O., Siqueira, L.R.P. de, Silva, E.B. da, Costa, L.B., Hernandez, M.Z., Rabello, M.M., Ferreira, R.S., Cruz, L.F. da, Moreira, D.R.M., Pereira, V.R.A., Castro, M.C.A.B. de, Bernhardt, P. V., Leite, A.C.L., 2014. 2-Pyridyl thiazoles as novel anti-Trypanosoma cruzi agents: Structural design , synthesis and pharmacological evaluation. **Eur. J. Med. Chem.** 86, 48–59. doi:10.1016/j.ejmech.2014.08.012

CHANDRA, S.; Gupta, L. K. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy* 2005, 62, 1089–94.

CORY, JG (1989) Role of ribonucleotide reductase in cell division (Chapter 1). In: Cory JG, Cory AM (eds) *International encyclopedia of pharmacology and therapeutics – inhibitors of ribonucleotide diphosphate reductase activity*. **Pergamon**, NY, Section 128, pp 1–16

COSTA, Aline et al. Apoptotic effect of synthetic 2',4',5'-trimethoxychalcones in human K562 and Jurkat leukemia cells. **Medicinal Chemistry Research**, [s.l.], v. 23, n. 10, p.4301-4319, 1 abr. 2014. Springer Science + Business Media.

COSTA-LOTUFO, Letícia V. et al. The Contribution of Natural Products as Source of New Anticancer Drugs: Studies Carried Out at the National Experimental Oncology Laboratory from the Federal University of Ceará. **Revista Virtual de Química**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.47-58, 2010. GN1 Genesis Network.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T.; ROBBINS pathologic Basis of Disease. 6th. WB Saunders International. **Chapters** v. 1,2,4,6 e 8. 1999.

DA S. MAIA, P.I., Pavan, F.R., Leite, C.Q.F., Lemos, S.S., de Sousa, G.F., Batista, A.A., Nascimento, O.R., Ellena, J., Castellano, E.E., Niquet, E., Deflon, V.M., 2009. Vanadium complexes with thiosemicarbazones: Synthesis, characterization, crystal structures and anti-Myco bacterium tuberculosis activity. **Polyhedron** 28, 398–406. doi:10.1016/j.poly.2008.11.017

DA SILVA, J.B.P., Navarro, D.M. do A.F., da Silva, A.G., Santos, G.K.N., Dutra, K.A., Moreira, D.R., Ramos, M.N., Espíndola, J.W.P., de Oliveira, A.D.T., Brondani, D.J., Leite, A.C.L., Hernandez, M.Z., Pereira, V.R.A., da Rocha, L.F., de Castro, M.C.A.B., de Oliveira, B.C., Lan, Q., Merz, K.M., 2015. Thiosemicarbazones as Aedes aegypti larvicial. **Eur. J. Med. Chem.** 100, 162–175. doi:10.1016/j.ejmech.2015.04.061

DONNICI, C. L.; Araújo, M. H.; Oliveira, H. S.; Moreira, D. R. M.; Pereira, V. R. A.; De Assis Souza, M.; De Castro, M. C. A. B.; Leite, A. C. L. **Bioorganic & medicinal chemistry** 2009, 17, 5038–43.

DOS SANTOS, T.A.R., da Silva, A.C., Silva, E.B., Gomes, P.A.T. de M., Espíndola, J.W.P., Cardoso, M.V. de O., Moreira, D.R.M., Leite, A.C.L., Pereira, V.R.A., 2016. Antitumor and immunomodulatory activities of thiosemicarbazones and 1,3-Thiazoles in Jurkat and HT-29 cells. **Biomed. {&} Pharmacother.** 82, 555–560. doi:10.1016/j.biopha.2016.05.038

EASMON, J.; Purstinger, G.; Heinisch, G.; Roth, T.; Fiebig, H. H.; Holzer, W.; Jager, W.; Jenny, M.; Hofmann, J. **J. Med. Chem.** 2001, 44, 2164.

EGEBLAD, M., Werb, Z., 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nat. Rev. Cancer** 2, 161–174. doi:10.1038/nrc745

EIGLER, A., Sinha, B., Hartmann, G., Endres, S. **Immunology Today**.1997; 10: 487-492.

ELTING, L.S.; COOKSLEY, C.; CHAMBERS, M.; CANTOR, S.B.; MANZULLO, E.; RUBENSTEIN, E.B. The burdens of cancer therapy. Clinical and economic outcomes of chemotherapy-induced mucositis. **Cancer**, v.98, n.7, p.1531–1539, 2003.

FARHANULLAH, F.; Agarwal, N.; Goel, A.; Ram, V. J. **The Journal of organic chemistry** 2003, 68, 2983–5.

FISCHER, P. M., GLOVER, D. M., LANE, D. P. Targeting the cell cycle. **Drug Disc. Today**, v.1, n.4, 417-423p., 2004.

FORTES, M.P., da Silva, P.B.N., da Silva, T.G., Kaufman, T.S., Militão, G.C.G., Silveira, C.C., 2016. Synthesis and preliminary evaluation of 3-thiocyanato-1H-indoles as potential anticancer agents. **Eur. J. Med. Chem.** 118, 21–26. doi:10.1016/j.ejmech.2016.04.039

FUNAKOSHI, T.; Chaki, S.; Kawashima, N.; Suzuki, Y.; Yoshikawa, R.; Kumagai, T.; Nakazato, A.; Kameo, K.; Goto, M.; Okuyama, S. **Life Sciences** 2002, 71, 1371–1384.

GALLUZZI L, MAIURI MC, VITALE I, ZISCHKA H, CASTEDO M, ZITVOGEL L, KROEMER G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. **Cell Death Diff**, v.14,1237-1266p., 2007.

GARCIA, C. C.; Brousse, B. N.; Carlucci, M. J.; Moglioni, A. G.; Alho, M. M.; Moltrasio, G. Y.; D'Accorso, N. B.; Damonte, E. B. **Antiviral Res.** 2003, 57, 161.

GIANNINI, E.G., Testa, R., Savarino, V., 2005. Liver enzyme alteration: A guide for clinicians. **Cmaj** 172, 367–379. doi:10.1503/cmaj.1040752

GLISONI, R. J.; Cuestas, M. L.; Mathet, V. L.; Oubiña, J. R.; Moglioni, A. G.; Sosnik, A. **European journal of pharmaceutical sciences** : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences 2012, 47, 596–603.

GOTTESMAN, M. M.; FOJO, T.; BATES, S. E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. **Nature reviews/Cancer**, v.2, n.1, p.48-58, 2002.

H. BERALDO, B.S.P., D. Gambinob, B.S.P., 2004. The Wide Pharmacological Versatility of Semicarbazones, Thiosemicarbazones and Their Metal Complexes. **Mini-Reviews Med. Chem.** 4, 31–39. doi:10.2174/1389557043487484

HAHN, William C.. Cancer. **Cancer Cell**, [s.l.], v. 6, n. 3, p.215-222, set. 2004. Elsevier BV.

HALL, I. H.; Lackey, C. B.; Kistler, T. D.; Durham, R.W.; Jouad, E. M.; Khan, M.; Thanh, X. D.; Djebbar-Sid, S.; Benali-Baitich, O.; Bouet, G. M. **Pharmazie** 2000, 55, 937.

HANAHAH, Douglas; WEINBERG, Robert a.. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, [s.l.], v. 144, n. 5, p.646-674, mar. 2011. Elsevier BV.

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v.407, 770-776p., 2000.

HERNANDES, M. Z.; Rabello, M. M.; Leite, A. C. L.; Cardoso, M. V. O.; Moreira, D. R. M.; Brondani, D. J.; Simone, C. A.; Reis, L. C.; Souza, M. A.; Pereira, V. R. A.; Ferreira, R. S.; McKerrow, J. H. **Bioorganic & medicinal chemistry** 2010, 18, 7826–35.

HERR, H.W.; MORALES, A. History of bacillus Calmette-Guerin and bladder cancer: an immunotherapy success story. **Journal of Urology**, v.179, 53–56p., 2008.

HETZHEIM, A.; Möckel, K. **Advances in Heterocyclic Chemistry** Volume 7; Elsevier, 1967; Vol. 7.

HILL, P. H.; TANNOCK, I. F. Introduction: Cancer as a Cellular Disease. In: **The Basic Science of Oncology**. Tannock, I.F.; Hill, R.P. 2nd ed. USA: McGraw-Hill. 2013

HOCHEGGER, Helfrid; TAKEDA, Shunichi; HUNT, Tim. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all?. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s.l.], v. 9, n. 11, p.910-916, 24 set. 2008. Nature Publishing Group.

HUANG, J.; WANG, X.-J.; YU, D.; JIN, Y.-N.; ZHEN, L.-Z.; XU, N.; LIU, W.; DENG, Y.-C.; WU, S.-X.; HE, J. The effect of palonosetron hydrochloride in the prevention of chemotherapy-induced moderate and severe nausea and vomiting. **Experimental and therapeutic medicine**, v.5, n.5, p.1418–1426, 2013.

INCA. Incidência de Câncer no Brasil <www.inca.gov.br/estimativa/2010>. Acessado em 26 de Maio de 2017, 100p.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Ministério da Saúde. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/inca_inisterio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2017 Acesso em: 08 de jan. 2017

ISMAEL, G.F.V.; ROSA, D.D.; MANO, M.S.; AWADA, A. Novel cytotoxic drugs: Old challenges, new solutions. **Cancer Treatment Reviews**, v.34, 81-91 p, 2008.

JANSSON, P.J., Kalinowski, D.S., Lane, D.J.R., Kovacevic, Z., Seebacher, N.A., Fouani, L., Sahni, S., Merlot, A.M., Richardson, D.R., 2015. The renaissance of polypharmacology in the development of anti-cancer therapeutics: Inhibition of the “Triad of Death” in cancer by Di-2-pyridylketone thiosemicarbazones. **Pharmacol. Res.** 100, 255–260. doi:10.1016/j.phrs.2015.08.013

JOULE, J. .; Smith, G.; Mills, K. Heterocyclic chemistry; 3rd ed.; **Chapman and Hall**: London, 1995; pp. 72–119.

KAMATH, K.; Jordan, M. A. **Cancer research** 2003, 63, 6026–31.

KARAKÜÇÜK-İYİDOĞAN, A.; Taşdemir, D.; Oruç-Emre, E. E.; Balzarini, J. **European journal of medicinal chemistry** 2011, 46, 5616–24.

KASUGA, N. C.; Sekino, K.; Ishikawa, M.; Honda, A.; Yokoyama, M.; Nakano, S.; Shimada, N.; Koumo, C.; Nomiya, K. **J. Inorg. Biochem.** 2003, 96, 298.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. p. 991. 2006.

KERR, JF, WYLLIE, AH, CURRIE, AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**. 26: 239-257, 1972.

KHODJAKOV, A.; RIEDER, C. L. The nature of cell-cycle checkpoints: facts and fallacies. **Journal of Biology**. v. 8 (10) p. 88. 2009.

KIM SS, WON SJ, KIM NJ, YOO JK, BAE K, LEE KT. 3-Oxoolean-12-en-27-oic acid isolated from *Aceriphyllum rossii* induces caspase-8-dependent apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. **Biol Pharm Bull**. V. 32(1):91-8. 2009.

KOVALA-DEMERTZI, D.; Demertzis, M. A.; Miller, J. R.; Frampton, C. S.; Jasinski, J. P.; West, D. X. **J. Inorg. Biochem**. 2002, 92, 137.

KOVALA-DEMERTZI, D.; Galani, A.; Miller, J. R.; Frampton, C. S.; Demertzis, M. a. **Polyhedron** 2012, 16–18.

KRYSKO, D.V., BERGHE, T. V., D'HERDE, K., VANDENABEEL, P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. **Methods**, v.44, 205-221p., 2008.

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; COTRAN. **Patologia - bases Patológicas das doenças**. 7ed. Rio de Janeiro, Elsevier. 2005.

KUSUZAKI, K.; MURATA, H.; MATSUBARA, T.; SATONAKA, H.; WAKABAYASHI, T.; MATSUMINE, A.; UCHIDA, A. Review. Acridine orange could be an innovative anticancer agent under photon energy. **In Vivo**. v.21, 205–214p., 2007.

LAFRANC, F. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 63, p. 213-223. 2013

LAM, K.S. New aspects of natural products in drug discovery. **Trends in Microbiology**, v.15, n.6, 279-289p., 2007.

LEE, In Hye; FINKEL, Toren. Metabolic regulation of the cell cycle. **Current Opinion In Cell Biology**, [s.l.], v. 25, n. 6, p.724-729, dez. 2013. Elsevier BV.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M.. **Principles of Biochemistry**, 5rd ed., Worth Publishning: New York. 2011.

LEIST, M., Jäättelä, M., 2001. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol**. 2, 589–598. doi:10.1038/35085008

LEITE, A. C. L.; De Lima, R. S.; Moreira, D. R. D. M.; Cardoso, M. V. D. O.; Gouveia de Brito, A. C.; Farias Dos Santos, L. M.; Hernandez, M. Z.; Kiperstok, A. C.; De Lima, R. S.; Soares, M. B. P. **Bioorganic & medicinal chemistry** 2006, 14, 3749–57.

LEITE, A. C. L.; Moreira, D. R. de M.; Cardoso, M. V. de O.; Hernandes, M. Z.; Alves Pereira, V. R.; Silva, R. O.; Kiperstok, A. C.; Lima, M. da S.; Soares, M. B. P. **ChemMedChem** 2007, 2, 1339–45.

LI, A. H.; Moro, S.; Forsyth, N.; Melman, N.; Ji, X. D.; Jacobson, K. A. **Journal of medicinal chemistry** 1999, 42, 706–21.

LI, S., Luan, G., Ren, X., Song, W., Xu, L., Xu, M., Zhu, J., Dong, D., Diao, Y., Liu, X., Zhu, L., Wang, R., Zhao, Z., Xu, Y., Li, H., 2015. Rational Design of Benzylidenehydrazinyl-Substituted Thiazole Derivatives as Potent Inhibitors of Human Dihydroorotate Dehydrogenase with in Vivo Anti-arthritic Activity. **Sci. Rep.** 5, 14836. doi:10.1038/srep14836

LIMA LEITE, A. C.; Santos, L. M. F.; Barbosa, F. F.; De Oliveira Cardoso, M. V.; Moreira, D. R. M.; De Souza, I. A. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomédecine & pharmacothérapie** 2006, 60, 121–6.

LIU, T. et al. Study on synergic and decreasing toxic effects of mineral water and Chinese herbal compound preparation on cisplatin. **China Journal of Chinese Materia Medica**, v.36, n.10, p.1358-1361, 2011.

LORD, Christopher J.; ASHWORTH, Alan. The DNA damage response and cancer therapy. **Nature**, [s.l.], v. 481, n. 7381, p.287-294, 18 jan. 2012. Nature Publishing Group.

LU, X.; Liu, X.; Wan, B.; Franzblau, S. G.; Chen, L.; Zhou, C.; You, Q. **European journal of medicinal chemistry** 2012, 49, 164–71.

LUO, Ji; SOLIMINI, Nicole L.; ELLEDGE, Stephen J.. Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. **Cell**, [s.l.], v. 136, n. 5, p.823-837, mar. 2009. Elsevier BV.

MABUCHI, S., Matsumoto, Y., Isohashi, F., Yoshioka, Y., Ohashi, H., Morii, E., Hamasaki, T., Aozasa, K., Mutch, D.G., Kimura, T., 2011. Pretreatment leukocytosis is an indicator of poor prognosis in patients with cervical cancer. **Gynecol. Oncol.** 122, 25–32. doi:10.1016/j.ygyno.2011.03.037

MACCIONI, E.; Cardia, M. .; Bonsignore, L.; Plumitallo, A.; Pellerano, M. .; De Logu, A. **Il Farmaco** 2002, 57, 809–817.

MALUMBRES, M.; BARBACID M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Natural Revist of Cancer**. v. 9 (3) p. 153-166. 2009.

MCGAHON, A.J.; MARTIN, S.J.; BISSONNETTE, R.P.; MAHBOUBI, A.; SHI, Y.; MOGIL, R.J. NISHIOKA, W.K.; GREEN, D.R. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. **Meth. Cell Biol.**, v.46, 153–185p., 1995.

MELINO G. The Sirens' song. **Nature**. v.412, 23p., 2001.

MIWATASHI, S., Arikawa, Y., Naruo, K.-I., Igaki, K., Watanabe, Y., Kimura, H., Kawamoto, T., Ohkawa, S., 2005. Synthesis and biological activities of 4-phenyl-5-pyridyl-1,3-thiazole derivatives as p38 MAP kinase inhibitors. **Chem. Pharm. Bull.**

(Tokyo). 53, 410–8.

MOIR, Robert D. et al. Review: The Dynamics of the Nuclear Lamins during the Cell Cycle— Relationship between Structure and Function. **Journal Of Structural Biology**, [s.l.], v. 129, n. 2-3, p.324-334, abr. 2000. Elsevier BV. DOI: 10.1006/jsbi.2000.4251.

MORIGI, R., Locatelli, A., Leoni, A., Rambaldi, M., 2015. Recent Patents on Thiazole Derivatives Endowed with Antitumor Activity. Recent Pat. **Anticancer. Drug Discov.** 10, 280–297.

MOSMANN, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods** 65, 55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI) 2015. Disponível em:<<http://www.cancer.gov/researchandfunding/priorities/global-research-activities>>. Acesso em: 10/01/2016.

NAVARRETE-VAZQUEZ, G.; Chávez-Silva, F.; Argotte-Ramos, R.; RodríguezGutiérrez, M. D. C.; Chan-Bacab, M. J.; Cedillo-Rivera, R.; Moo-Puc, R.; Hernández-Nuñez, E. **Bioorganic & medicinal chemistry letters** 2011, 21, 3168– 71.

NICOLETTI, I. et al. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v.139, n.2, p.271-279, 1991.

NIU CHUANSHENG, Cheshire; Jun Li, Hamden; Xiuyan Li, NeW Haven; Terrence W. Doyle, KillingWorth; Shu-Hui Chen, H., 1995. **United States Patent [19] [11] Patent** Number : [45] Date of Patent : doi:10.1074/JBC.274.42.30033.(51)

OKADA H. & MAK, TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumor cells. **Nat Rev Cancer**, v.4, 592-603p., 2004.

ORTHOLAND, J.Y. & GANESAN, A. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, 271-280p., 2004.

PARKING, D.M.; BRA, Y.F.I.; DEVESA, S.S. Cancer burden in the year 2000. The global picture. **European Juornal of cancer**. v.37, suppl 8, p.4-66. 2001

PAVAN, F. R.; Da S Maia, P. I.; Leite, S. R. A.; Deflon, V. M.; Batista, A. A.; Sato, D. N.; Franzblau, S. G.; Leite, C. Q. F. **European journal of medicinal chemistry** 2010, 45, 1898–905.

PESSOA, C. **Determinação do mecanismo de ação citotóxica de alguns compostos extraídos de plantas do nordeste brasileiro**. Tese de Doutorado. Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, UFC, 2000.

PONDER, B.A.J.; JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L.; WEATHERALL, D.J. Direct examination of the clonality of carcinogen-induced ephitelial dysplasia in chimeric mice. **Journal of Natural Câncer Institute**. v. 77 p. 967. 1986.

POPSAVIN, M.; pać, .; virćev, M.; Kojić, V.; Bogdanović, G.; Popsavin, V. **Bioorganic & medicinal chemistry letters** 2012, 22, 6700–4.

PULVERER, Bernd et al. Cancer. **Nature**, [s.l.], v. 411, n. 6835, p.335-335, 17 maio 2001. Nature Publishing Group.

QIAN, K., NAKAGAWA-GOTO, K., YU, D., MORRIS-NATSCHKE, S. L., NITZ, T. J., KILGORE, N., ALLAWAY, G. P. AND LEE, K. H. Anti-AIDS agents 73: structure-activity relationship study and asymmetric synthesis of 3-O-monomethylsuccinyl-betulinic acid derivatives. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** V.17, 6553– 6557, 2007.

QUACH, P.; Gutierrez, E.; Basha, M. T.; Kalinowski, D. S.; Sharpe, P. C.; Lovejoy, D. B.; Bernhardt, P. V; Jansson, P. J.; Richardson, D. R. **Molecular pharmacology** 2012, 82, 105–14.

RACITI, G., Mazzone, P., Raudino, A., Mazzone, G., Cambria, A., 1995. Inhibition of rat liver mitochondrial monoamine oxidase by hydrazine-thiazole derivatives: structure-activity relationships. **Bioorg. Med. Chem.** 3, 1485–1491. doi:10.1016/0968-0896(95)00137-6

RANG, H.P.; RITTER, J.M.; DALE, M.M. In: **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Elsevier; p. 904. 2012.

REBOLLEDO, A. P.; de Lima, G. M.; Gambi, L. N.; Speziali, N. L.; Maia, D. F.; Pinheiro, C. B.; Ardisson, J. D.; Cortes, M. E.; Beraldo, H. **Appl. Organomet. Chem.** 2003, 17, 945.

RIBEIRO, L. R., SALVADORI, D. M. F. MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Editora da ULBRA, 356p., 2003.

RICCI, M.S.; ZONG, W.X. Chemotherapeutic for Targeting Cell Death Pathways. **The Oncologist**, v.11, p.342-357, 2006.

RICHARDSON, D. R.; Sharpe, P. C.; Lovejoy, D. B.; Senaratne, D.; Kalinowski, D. S.; Islam, M.; Bernhardt, P. V **Journal of medicinal chemistry** 2006, 49, 6510– 21.

RODRÍGUEZ-ARGÜELLES, M. C.; Tourón-Touceda, P.; Cao, R.; García-Deibe, A. M.; Pelagatti, P.; Pelizzi, C.; Zani, F. **Journal of inorganic biochemistry** 2009, 103, 35–42.

ROTH, H. J.; Kleemann, A. Pharmaceutical Chemistry: **Drug Synthesis**; Europe, P. H., Ed.; 1st ed.; London, 1988; p. 407.

SALGALLER, M.L. & LODGER, P.A. Use of cellular and cytokine adjuvants in the immunotherapy of cancer. **J Surg Oncol. N.**, v.68, 122-138p., 1998.

SANTOS JR, A.R.; WADA, M.L.F. Diferenciação celular. In: **A célula**. São Paulo: Editora Manole Ltda. 2005

SAU, D. K.; Butcher, R. J.; Chaudhuri, S.; Saha, N. **Mol. Cell. Biochem.** 2003, 253, 21.

SCHERNBERG, A., Escande, A., Rivin Del Campo, E., Ducreux, M., Nguyen, F.,

GOERE, D., Chargari, C., Deutsch, E., 2017. Leukocytosis and neutrophilia predicts outcome in **anal cancer**. **Radiother. Oncol.** 122, 137–145. doi:10.1016/j.radonc.2016.12.009

SCRIVEN, E.; Berry, D. **Speciality Chem. Mag.**; 2001.

SHAFI, S.; Alam, M. M.; Mulakayala, N.; Mulakayala, C.; Vanaja, G.; Kalle, A. M.; Pallu, R.; Alam, M. S. **European journal of medicinal chemistry** 2012, 49, 324– 33.

SHAPIRO, H. M. Overture. In: SHAPIRO, H. M. (Org.). **Practical Flow Cytometry**. New York: Wiley-Liss, 3^a ed., 1-32 p., 1995.

SHARMA, P.; SHARMA, J.D. In vitro hemolysis of human erythrocytes by plant extracts with antiplasmodial activity. **J. Ethnopharmacol.**, v.74, n.3, 160-170p., 2009.

SHERR, C. J. Cancer cell cycles. **Science**. v. 274 (5293), p. 1672-1677. 1996.

SIEBER, O. M, HEINIMANN K, TOMLINSON IPM. Genomic instability – the engine of tumorigenesis. **Nature Review**. v. 3 p. 701-708. 2003.

SIEGEL, R.L., Miller, K.D., Jemal, A., 2016. **Cancer statistics**, 2016. CA. Cancer J. Clin. 66, 7–30. doi:10.3322/caac.21332

DA SILVA, E. B. ; OLIVEIRA E SILVA, D. A.; OLIVEIRA, A. R. ; DA SILVA MENDES, C. H. ; DOS SANTOS, T. A. R. ; DA SILVA, A. C.; DE CASTRO, M. C. A.; FERREIRA, R. S.; MOREIRA, D. R. M.; DE OLIVEIRA CARDOSO, M. V. ; DE SIMONE, C. A. ; PEREIRA, V. R. A. ; LEITE, A. C. L . Desing and synthesis of potent anti-Trypanosoma cruzi agents new thiazoles derivatives which induce apoptotic parasite death. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 130, p. 39-50, 2017.

DA SILVA, A. C.; DOS SANTOS, T. A. R.; DA SILVA, I. V. B.; DE OLIVEIRA, M. V. G.; MOREIRA, D. R. M.; LEITE, A. C. L.; PEREIRA, V. R. A. Aryl thiosemicarbazones: in vitro and immunomodulatory activities against l. amazonensis. *experimental parasitology*, v. 177, p. 57-65, 2017.

SILVERMAN, R. B., The Organic Chemistry of Drug design and drug action, **Academic Press**, INC, London, 1992, 422p.

SKEEL, R.T. **Handbook of Cancer Chemotherapy**. 7 Ed., Lippincott Williams Wilkins, 1 50 p., 2007.

SOARES, Bruno Marques. Hellebrigenina, um bufodienolídeo com potencial ação compatível de inibidor catalítico da topoisomerase ii. 2013. 86 f. **dissertação (mestrado) - curso de farmacologia, departamento de fisiologia e farmacologia**, universidade federal do ceará, fortaleza, 2013.

SOUZA, M. V. N. de; Almeida, M. V. de **Química Nova** 2003, 26, 366–372.

SRIVASTAVA, V., NEGI, A. S., KUMAR, J. K., GUPTA, M., KHANUJA, S. P. S. Plant-based anticâncer molecules: A chemical and biological profile of some important leads. **Bioorg. Med. Chem.**, v.13, 5892-5908p., 2013.

STEWART, H.L.; SNEU, K.C.; DUNHAM, L.J.; SCHLYEN, S.M. **Transplantable and Transmissible Tumors of Animals**. Armed Forces Institute of Pathology, WashIngtong, 324–329p., 1959.

STRASSER, A., O'CONNOR, L., DIXIT, V. M. Apoptosis signaling. **Annu. Rev. Biochem.**, v.69, 217-245p., 2000.

TENORIO, R.; Carvalho, C.; Pessanha, C.; de Lima, J.; de Faria, A.; Alves, A.; de Melo, E. J.; Goes, A. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** **2005**, *15*, 2575–2578

THOMAS, G. **Medicinal Chemistry: An Introduction**. John Wiley & Sons, Chichester, 2000.

TINARI, A; GIAMMARIOLI, AM; MANGANELLI, V CIARLO, L; MALORNI, W. **Analyzing Morphological and Ultrastructural Features in Cell Death**. Em: *Methods in Enzymology*. Elsevier Inc., 442p., 2008.

VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. **J. Immunol. Methods**, v.243, p.167-190, 2000.

VERMES, I.; HAANEN, C.; STEFFENS-NAKKEN, H.; REUTELINGSPERGER, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V. **J. Immunol. Methods**, v.184, n.1, 39-51p., 1995.

VERMEULEN, Katrien; VAN BOCKSTAELE, Dirk R.; BERNEMAN, Zwi N.. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, [s.l.], v. 36, n. 3, p.131-149, jun. 2003. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x.

VICINI, P.; Geronikaki, A.; Incerti, M.; Busonera, B.; Poni, G.; Cabras, C. A.; La Colla, P. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** **2003**, *11*, 4785–4789.

WERMUTH, G.; GANELLIN, C.R.; LINDBERG, P.; MITSCHER, L.A.; Glossary of terms used in medicinal chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v.70, 1129–1143p., 1998.

WESTPHAL, M.; HILT, D.C.; BORTEY, E.; DELAVAUULT, P.; OLIVARES, R.; WARNKE, P.C.; RAM, Z. A phase 3 trial of focal chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel® wafers) in patients with primary malignant glioma. **Neuro-oncology**. v. 5(2). 2003.

WHO. **World Health Organization**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 21 março 2017.

WILSON, R.M. & DANISHEFSKY, S.J. Applications of total synthesis toward the discovery of clinically useful anticancer agents. **Chem. Soc. Rev.**, v.36, 1207-1226p., 2007.

World Health Organization. Cancer (WHO). World health statistics 2015 [homepage on the internet]. Geneva: **World Health Organization**; Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/170250/1/9789240694439_eng.pdf?ua=1

YAN ZHANG, Breet Andrew Tounge, Aihua Wang, Michael Hawkins, Kristi Anne Leonard, Joseph Kent Barbay, **U.S.M.M.**, 2011. Pyridyl-thiazolyl inhibitors of pro-matrix metalloproteinase activation.

YEE, K. W. L.; Cortes, J.; Ferrajoli, A.; Garcia-Manero, G.; Verstovsek, S.; Wierda, W.; Thomas, D.; Faderl, .; King, I.; O'brien, . M.; eha, .; Andreeff, M.; Cahill, A.; Sznol, M.; Giles, F. J. **Leukemia research** 2006, 30, 813–22.

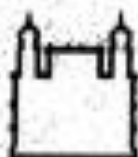
YUSUF, M.; Jain, P. **Arabian Journal of Chemistry** 2011, null.

ZHANG,Y., Tounge, B.A., Wang, A. Hawkins, M., Leonard, K.A., Barbay, J.K., Maharooof, U.S.M. 2011. Pyridyl-thiazolyl inhibitors of pro-matrix metalloproteinase activation. WO 2012068210A1. <http://www.google.com.na/patents/wo20120168210A1?cl=en&hl=pt-BR/>(accessed 13.01.17).

ZIEGLER, U.; GROSCURTH. Morphological features as cell death. **News physiology sciences**, v.19, 124-128p., 2004.

ZUCCO, V.; SUPINO, R.; RICHETTI, S.C.; CLERIS, L.; MARCHESI, E.; GAMBACORTI-PASSERINI, C.; FORMELLI, F. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. **Cancer Letters**, v.175, 17-25p., 2002.

ANEXO A - Protocolo do Comitê de Ética em Animais



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

PROTOCOLO: 088/2015

PROJETO: "Produtos naturais e sintéticos bioativos: Potencial biotecnológico no tratamento do câncer"

COORDENADOR: Dr. Daniel Pereira Bezerra

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie/Linhagem	Nº de Animais
Camundongos C57BL/6J	1.680

Certificamos que na presente versão este projeto, está de acordo com os princípios de ética na pesquisa com animais adotado pela Lei 11.784/2008, foi aprovado e licenciado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-CPqGM) em 02/09/2015, e tem validade até 02/09/2017.

The present version of the above referenced project agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by the Brazilian law 11.784/2008 and was approved and licensed by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of the CPqGM-FIOCRUZ at 09/02/2015, being valid until 09/02/2017.

Salvador, 02 de setembro de 2015.

DEBORAH BITTENCOURT MOTRE FILAGA
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ

ANEXO B - Protocolo do Comitê de Ética em Humanos

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo da atividade citotóxica de compostos sintético e produtos naturais em células tumorais e células mononucleadas do sangue periférico humano

Pesquisador: THIAGO DAVID DOS SANTOS SILVA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 42941015.6.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.020.660

Data da Relatoria: 01/04/2015

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via “Notificação”, pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link “Para enviar Relatório Final”, disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/1

ANEXO C - Artigo Aceito Proveniente da Tese

Toxicology and Applied Pharmacology 329 (2017) 212–223



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology and Applied Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/taap

Anti-liver cancer activity in vitro and in vivo induced by 2-pyridyl 2,3-thiazole derivatives

Thiago David dos Santos Silva ^{a,b}, Larissa Mendes Bomfim ^c, Ana Carolina Borges da Cruz Rodrigues ^c, Rosane Borges Dias ^c, Caroline Brandi Schlaepfer Sales ^d, Clarissa Araújo Gurgel Rocha ^c, Milena Botelho Pereira Soares ^{c,e}, Daniel Pereira Bezerra ^c, Marcos Veríssimo de Oliveira Cardoso ^f, Ana Cristina Lima Leite ^a, Gardenia Carmen Gadelha Militão ^{b,*}

^a Department of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco, 50740-520 Recife, PE, Brazil

^b Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco, 50630-901 Recife, PE, Brazil

^c Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ/PA), 40296-710 Salvador, Bahia, Brazil

^d Department of Biotechnology, Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, 40110-002 Salvador, Bahia, Brazil

^e Center of Biotechnology and Cell Therapy, Hospital São João, 41253-890 Salvador, Bahia, Brazil

^f College of Nutrition, University of Pernambuco, 55030-903 Aracaju, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 March 2017

Revised 15 May 2017

Accepted 5 June 2017

Available online 10 June 2017

Keywords:

2-Pyridyl 2,3-thiazoles

HepG2

Antitumor

Cytotoxicity

Liver Cancer

Toxicity

ABSTRACT

A total of 24 hybrid compounds containing pyridyl and 1,3-thiazole moieties were screened against HL-60 (leukemia), MCF-7 (breast adenocarcinoma), HepG2 (hepatocellular carcinoma), NCI-H202 (lung carcinoma) human tumor cell lines and non-tumor cells (PBMC, human peripheral blood mononuclear cells). Most of them were highly potent in at least one cell line tested (IC_{50} s $< 3 \mu M$), being HL-60 the most sensitive and HepG2 the most resistant cell line. Among them, TAP-07 and TP-07 presented cytotoxic activity in all tumor cell lines, including HepG2 (IC_{50} 2.2 and 5.6 μM , respectively) without antiproliferative effects to normal cells (PBMC) (IC_{50} $> 30 \mu M$), making TAP-07 and TP-07, the compounds with the most favorable selectivity index. TAP-07 and TP-07 induced apoptosis in HepG2 cells and presented in vivo antitumor activity in hepatocellular xenograft cancer model in C57-B17 severe combined immunodeficient mice. Systemic toxicological verified by biochemical and histopathological techniques revealed no major signs of toxicity after treatment with TAP-07 and TP-07. Together the results indicated the anti-liver cancer activity of 2-pyridyl 2,3-thiazole derivatives.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Cancer is the major public health problem worldwide. In the last two decades, improvements in diagnostics and therapeutics have been done, leading to 23% drop in the cancer death rate; however, cancer still is a leading cause of death worldwide. Therefore, basic and clinical research is necessary to reduce the mortality related to cancer (Siegel et al., 2016).

Thiosemicarbazones present many biological activities, such as antibacterial, antifungal (Beraldo and Gambino, 2004), trypanocidal (da S. Mala et al., 2009), larvicidal (da Silva et al., 2015), immunomodulatory and antitumor (dos Santos et al., 2016). Since the development of triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone, a

ribonucleotide reductase inhibitor), much attention has been given to pyridine thiosemicarbazones (Niu et al., 1995). Pyridine, a basic heterocyclic compound with molecular formula C_5H_5N , and its derivatives are compounds with various applications in medicinal area (Altaf et al., 2015). As anticancer drugs, di-2-pyridylketone thiosemicarbazone, 2-benzoylpyridine thiosemicarbazone and 2-acetylpyridine thiosemicarbazone were developed as cytotoxic compounds targeting metal ions, which are essential nutrients for many cellular processes (Jansson et al., 2015).

The derivatization of 2-pyridyl thiosemicarbazone group into thiazole moiety generated novel templates with increased trypanocidal activity. (Cardoso et al., 2014). The thiazole ring acts as pharmacophore with versatile scaffold for the synthesis of new derivatives. In the cancer research, thiazole derivatives can act through the inhibition of kinases, inhibition of matrix metalloproteinases (MMPs) and inhibition of anti-apoptotic BCL2 family proteins (Morigl et al., 2015). In addition, novel thiazole analogues presented antimetastatic properties (Morigl et al., 2015). The strategy to connect pyridyl and thiazole ring into a new series of tricyclic compounds was used to develop molecules targeting the pro domain of the inactive metalloproteinases zymogens, proMMPs.

* Corresponding author at: Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco, Rua Prof. Moraes Rego, Cidade Universitária, CEP 50.670-901 Recife, PE, Brazil.

E-mail addresses: ggadelha@yahoo.com.br, gardenia.militao@ufpe.br (G.C.G. Militão).

Table 1
Structures of 2-pyridyl 2,3-thiazole derivatives.

Cpd	Structure	Cpd	Structure
TP-01		TA07-01	
TP-02		TA07-02	
TP-03		TA07-03	
TP-04		TA07-04	
TP-05		TA07-05	
TP-06		TA07-06	
TP-07		TA07-07	
TP-08		TA07-08	

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Cpd	Structure	Cpd	Structure
TP-09		TAP-09	
TP-10		TAP-10	
TP-11		TAP-11	
TP-12		TAP-12	

For malignant cells, MMPs can regulate the tumor microenvironment, cleavage substrate at the connective tissue and help cancer cells to invade surrounding barriers and metastasize (Egeblad and Werb, 2002). Thus, pyridyl-thiazolyl compounds were developed to inhibiting the proteolytic activation of pro-matrix MMP9 and pro-MMP1 (Zhang et al., 2011). Hybrid compounds containing pyridyl and 1,3-thiazole moieties were described as cytotoxic to cancer cells, immunomodulatory and anti-inflammatory compounds (dos Santos et al., 2016; Miawati et al., 2005). Based on the pyridyl-thiazolyl compounds potential as anticancer agents, we investigated the anticancer activity of 2-pyridyl 1,3-thiazole derivatives, both *in vitro* and *in vivo*.

2. Material and methods

2.1. Compounds

Compounds 2-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-phenyl-1,3-thiazole (TP-01), 2-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(4-tolyl)-1,3-thiazole (TP-02), 2-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(4-bromophenyl)-1,3-thiazole (TP-03), 5-methyl-2-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(4-bromophenyl)-1,3-thiazole (TP-04), 2-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(4-fluorophenyl)-1,3-thiazole (TP-05), 2-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(4-methoxyphenyl)-1,3-thiazole (TP-06), 2-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(4-chlorophenyl)-1,3-thiazole (TP-07), 2-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(2,4-dichlorophenyl)-1,3-thiazole (TP-08), 2-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(3,4-dichlorophenyl)-1,3-thiazole (TP-09), 2-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(3-nitrophenyl)-1,3-thiazole (TP-10), 2-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(4-nitrophenyl)-1,3-thiazole (TP-11), 2-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(naphthalen-1-yl)-1,3-thiazole (TP-12), 2-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-phenyl-1,3-thiazole (TAP-01), 2-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(4-tolyl)-1,3-thiazole (TAP-02),

2-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(4-bromophenyl)-1,3-thiazole (TAP-03), 5-methyl-2-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(4-bromophenyl)-1,3-thiazole (TAP-04), 2-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(4-fluorophenyl)-1,3-thiazole (TAP-05), 2-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(4-methoxyphenyl)-1,3-thiazole (TAP-06), 2-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(4-chlorophenyl)-1,3-thiazole (TAP-07), 2-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(2,4-dichlorophenyl)-1,3-thiazole (TAP-08), 2-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(3,4-dichlorophenyl)-1,3-thiazole (TAP-09), 2-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(3-nitrophenyl)-1,3-thiazole (TAP-10), 2-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(4-nitrophenyl)-1,3-thiazole (TAP-11) and 2-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(naphthalen-1-yl)-1,3-thiazole (TAP-12) were prepared by the methods previously reported by Cardoso et al. (2014) (Table 1). All compounds were chemically characterized by nuclear magnetic resonance (NMR), infrared, and mass spectra and by elemental analysis and presented purity of 95%.

2.2. *In vitro* assays

2.2.1. Cytotoxic assay. Human tumor cell lines HL-60 (promyelocytic leukemia), MCF-7 (breast adenocarcinoma), NCI-H292 (lung carcinoma) and HepG2 (hepatocellular carcinoma), obtained from Rio de Janeiro Cell Bank (Rio de Janeiro, Brazil), were used. In addition, human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from healthy volunteers were also used. The PBMCs were isolated according to the standard method of density-gradient centrifugation over Ficoll-Histopaque. The protocol (number 1020660) was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Pernambuco. The cells were maintained in RPMI 1640 medium or DMEN supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin,

100 µg/mL streptomycin (Gibco™ Life Technologies, USA) at 37 °C with 5% CO₂. To assess the cytotoxicity of the compounds, the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich-USA) reduction assay was used after 72 h incubation. For all experiments, cells were plated in 96-well plates (10⁵ cells/mL for adherent cells or 3 × 10⁴ cells/mL for the leukemia) (Mosmann, 1983). After 24 h, the compounds, diluted in complete medium with 0.5% dimethylsulfoxide (DMSO, Vetec, Brazil), in concentrations ranging from 0.3 to 25 µg/mL were added to each well. Negative control received the same amount of DMSO. Doxorubicin (Sigma-Aldrich, USA) (0.01–5 µg/mL) was used as the positive control. After 60 h of treatment, 20 µL of MTT (5 mg/mL, Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) was added. In the end of the incubation, the MTT formazan product was dissolved in 100 µL of DMSO and the absorbance was measured at 595 nm in a plate spectrophotometer (Varioskan Flash; Thermo Scientific, Finland).

2.2.2. Hemolytic assay. The hemolytic assay was performed with human erythrocytes obtained from peripheral blood of healthy volunteers (Fortes et al., 2016). The protocol (Number 1020660) was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Pernambuco. For the experiment, 100 µL of a 2% erythrocytes suspension in 0.85% NaCl (Alphacel-Brazil) containing 10 mM CaCl₂ (Vetec-Brazil) was added to each well. A solution of Triton X-100 (Vetec, Brazil) (1% w/v) was used as the positive control. Saline solution (0.85% NaCl containing 10 mM CaCl₂) was used as the negative control and the samples were tested in a concentration of 500 µM. After incubation at room temperature for 1 h, the supernatant was removed and the liberated hemoglobin was measured at 540 nm in a plate spectrophotometer (Varioskan Flash; Thermo Scientific, Finland).

2.2.3. Cell viability by trypan blue exclusion assay. Trypan blue exclusion assay was used to determine the direct effect of the drugs in the cell viability. The number of viable cells and non-viable (take up trypan blue) were counted. Briefly, 90 µL was removed from the cell suspension and 10 µL of trypan blue (0.4%) was added. Cell counting was performed using a Leica DM500 microscope (Leica Microsystems, Switzerland) with a hemocytometer filled with an aliquot of the homogenized cell suspension.

2.2.4. Cell morphology. To evaluate alterations in cell morphology, slides were prepared using cytospin. The cells were fixed with 96% ethanol for 5 min and stained with May-Grunwald-Giemsa. Cellular changes were analyzed by light microscope and photographed with NIS-Elements imaging software (Nikon, model Eclipse NI-U, Japan).

2.2.5. Internucleosomal DNA fragmentation and cell cycle distribution. Cells were harvested in a permeabilization solution containing 0.1% Triton X-100 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 2 µg/mL propidium iodide (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 0.1% sodium citrate and 100 µg/mL RNase (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Cell fluorescence was determined by flow cytometry in a BD LSRFortessa cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) using the BD FACSDiva Software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and FlowJo Software 10 (FlowJo LLC, Ashland, OR, USA). Ten thousand events were evaluated per experiment and cellular debris were omitted from the analysis.

2.2.6. Annexin V assay. Phosphatidylserine externalization was analyzed by flow cytometry. A FITC annexin V apoptosis detection kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) was used to determine cell viability (viable, early apoptotic, late apoptotic and necrotic cells). Cells were washed twice with saline and then resuspended in 100 µL of binding buffer with 5 µL of propidium iodide and 5 µL of FITC annexin V. The cells were gently mixed on a vortex and incubated for 15 min at room

temperature in the dark. Afterwards, 400 µL of binding buffer was added to each tube and the cells were analyzed by flow cytometry on a BD LSRFortessa cytometer using the BD FACSDiva Software and FlowJo Software 10. Ten thousand events were evaluated per experiment and cellular debris were omitted from the analysis.

2.3. In vivo assays

2.3.1. Animals. A total of 66 C57BL/6 severe combined immunodeficient (SCID) mice (females, 25–30 g) was obtained and maintained at the animal facilities from Gonçalo Moniz Institute-FIOCRUZ (Salvador, Bahia, Brazil). Animals were housed in cages with free access to food and water. All animals were kept under a 12:12 h light-dark cycle (lights on at 6:00 a.m.). Animals were treated according to the ethical principles for animal experimentation of SBCAL (Brazilian association of laboratory animal science), Brazil. The local Animal Ethics Committee approved the experimental protocol (number 06/2015).

2.3.2. Human tumor xenograft model. HepG2 cells (10⁵ cells per 500 µL in 0.9% NaCl) were implanted subcutaneously into the left flank of the mice. Mice were randomly divided into four groups at the beginning of the experiment: group 1: animals that received injection of the vehicle, 5% DMSO solution (negative control, n = 15); group 2: animals that received injection of 5-fluorouracil (10 mg/kg/day, positive control, n = 9, purity > 99%, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA); group 3: animals that received injection of TAP-07 (40 mg/kg/day, n = 15); group 4: animals that received injection of TP-07 (40 mg/kg/day, n = 15). The treatments were initiated one day after tumor injection. Animals were treated intraperitoneally (200 µL per animal) once daily for 21 consecutive days. On the 22th day, animals were anesthetized, with ketamine/xylazine, and peripheral blood samples were collected from brachial artery. Animals were euthanized by aesthetic overdose and tumors were excised and weighed. The drug effects were expressed as the percent inhibition of control.

2.3.3. Systematic toxicological evaluation. To perform the systematic toxicological effects, mice were weighed at the beginning and end of the experiment. Animals were observed for signs of abnormalities throughout the study. Hematological analyses were performed using light microscopy. Biochemical analyses of serum samples were performed using a Vet-16 rotor and quantified using an Analyst bench-top clinical chemistry system (Hemagen Diagnostics, Inc., Columbia, MD, USA). Livers, kidneys, lungs and hearts were removed, weighed and examined for any signs of gross lesions, colour changes and/or hemorrhage. After gross macroscopic examination, tumors, livers, kidneys, lungs and hearts were fixed in 4% formalin buffer and embedded in paraffin. Tissue sections were stained with hematoxylin and eosin chromogens, and a pathologist performed analyses under light microscopy.

2.4. Statistical analysis

Data are presented as mean ± S.E.M., inhibitory concentration of 50% (IC₅₀) or effective concentration of 50% (EC₅₀) values and their 95% confidence intervals obtained by nonlinear regression from at the least two independent experiments performed in duplicate or triplicate. Differences among experimental groups were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's Multiple Comparison Test ($p < 0.05$). All analyses were carried out using the GRAPHPAD PRISM program (Intuitive Software for Science).

3. Results

3.1. In vitro assays

3.1.1. 2-pyridyl/2,3-thiazole compounds displayed potent cytotoxicity to different tumor cell lines. Twenty-four compounds were evaluated for cytotoxicity toward four cancer cell lines (HL-60, MCF-7, NCI-H292 and HepG2). The compounds were classified into two groups, according to the chemical structure what they are derived: TP compounds are 2-pyridyl/2,3-thiazole compounds and TAP group are 2-pyridyl/2,3-thiazoles with a methyl at C6. Most of TAP and TP compounds presented potent cytotoxicity in at least one cell line tested (Table 2). The most sensitive cell line was HL-60 (promyelocytic leukemia) and the most resistant cell line was HepG2 (hepatocellular carcinoma). Compounds

with $IC_{50} \leq 3 \mu M$ were judged as highly potent, whereas compounds bearing IC_{50} values in the range of 3–6 μM were regarded as potent compounds. On the other hand, compounds with IC_{50} between 6 μM and 12 μM were considered as moderately potent, while molecules displaying IC_{50} values in the range of 12–24 μM were regarded as bearing low potency. Finally, the compounds exhibiting $IC_{50} > 24 \mu M$ were deemed not cytotoxic (Fortes et al., 2016). In TAP group, TAP-07 presented cytotoxic activity at all cell lines tested with IC_{50} ranging from 0.98 to 3.5 μM . Even at HepG2 cell line, which was in general more resistant, TAP-07 was highly potent with IC_{50} of 2.2 μM . In regard to the toxicity in non-tumor PBMC cells, most of the TAP compounds were cytotoxic to PBMC, with exception to TAP-07 that was not cytotoxic at concentrations tested ($IC_{50} > 30 \mu M$), making TAP-07 the compound with the most favorable selectivity index (SI). Among compounds belonging to

Table 2
Cytotoxic activity of TAP and TP compounds.

Compound	IC_{50} in μM (Confidence interval)				
	HL-60	MCF-7	NCI-H292	HepG2	PBMC
TAP-01	0.91 (0.71–1.2)	1.01 (0.7–2.2)	1.8 (1.3–2.4)	> 50	< 3.5
TAP-02	0.64 (0.42–1.0)	2.1 (0.77–5.1)	2.4 (1.9–3.1)	> 50	6.9 (5.5–13.6)
TAP-03	0.75 (0.56–0.95)	1.1 (0.7–1.7)	1.9 (1.5–2.3)	> 50	13.8 (7.4–26.0)
TAP-04	0.51 (0.43–0.64)	1.61 (0.75–3.22)	1.4 (1.0–1.8)	> 50	3.7 (2.3–6.6)
TAP-05	0.70 (0.57–0.89)	1.5 (1.1–1.8)	2.6 (1.5–4.7)	> 50	13.1 (7.3–22.9)
TAP-06	0.8 (0.58–1.07)	1.3 (1.1–1.6)	3.0 (1.5–5.8)	> 50	< 3.5
TAP-07	0.98 (0.82–1.15)	3.5 (1.4–9.1)	3.1 (2.7–4.9)	2.2 (1.5–3.3)	> 30
TAP-08	1.02 (1.40–1.90)	1.5 (0.44–5.2)	3.6 (1.8–4.3)	> 50	< 3.5
TAP-09	0.66 (0.44–0.93)	3.9 (1.8–8.5)	2.7 (2.4–3.1)	> 50	< 3.5
TAP-10	0.58 (0.41–0.85)	1.2 (0.91–1.5)	3.0 (1.9–4.7)	> 50	< 3.5
TAP-11	0.85 (0.67–0.94)	1.01 (0.85–1.15)	1.7 (1.4–2.5)	> 50	4.0 (2.3–6.7)
TAP-12	1.4 (1.10–1.80)	2.7 (1.4–5.4)	2.7 (2.2–3.4)	> 50	6.6 (4.6–9.3)
TP-01	1.7 (1.4–2.4)	11.0 (5.7–21.5)	10.7 (6.4–17.8)	> 50	6.6 (13.9–33.3)
TP-02	1.3 (1.1–1.5)	3.8 (3.0–4.9)	7.5 (5.1–11.0)	6.1 (4.3–8.6)	< 3.5
TP-03	27.3 (20.9–35.5)	4.4 (1.6–11.2)	2.2 (1.1–3.1)	> 50	9.0 (7.5–8.6)
TP-04	1.3 (1.0–1.7)	2.5 (2.2–3.2)	6.4 (4.1–10.0)	> 50	< 3.5
TP-05	1.9 (1.6–2.2)	4.6 (3.7–5.7)	14.6 (8.3–25.4)	> 50	7.9 (3.2–18.8)
TP-06	8.7 (5.0–14.8)	5.7 (2.6–12.4)	2.8 (1.5–5.0)	> 50	< 3.5
TP-07	1.0 (0.85–1.2)	4.7 (3.2–6.8)	3.2 (2.7–3.8)	5.8 (4.2–7.8)	> 30
TP-08	0.57 (0.22–0.97)	2.5 (1.9–3.3)	0.94 (0.45–2.0)	> 50	12.3 (7.7–19.0)
TP-09	1.2 (0.17–9.1)	2.9 (1.4–5.7)	2.4 (1.8–2.8)	> 50	13.0 (6.6–25.5)
TP-10	0.98 (0.67–1.4)	4.3 (2.2–7.8)	3.3 (3.0–3.6)	> 50	> 30
TP-11	2.7 (2.2–3.4)	> 50	> 50	> 50	> 30
TP-12	3.1 (2.4–4.0)	7.2 (5.7–9.0)	> 50	> 50	19.3 (12.7–29.0)
DOX	0.02 (0.02–0.04)	0.37 (0.18–0.92)	0.55 (0.37–0.92)	0.6 (0.51–0.81)	1.4 (0.9–2.6)

Data are presented as IC_{50} values in μM and their respective 95% confidence interval obtained by nonlinear regression from at least two independent experiments performed in duplicate or triplicate, measured by MTT reduction assay after 72 h incubation. Tumor cells: HL-60 (human promyelocytic leukemia); MCF-7 (human breast adenocarcinoma); NCI-H292 (human lung carcinoma); and HepG2 (human hepatocellular carcinoma). Non-tumor cells: PBMC (human peripheral blood mononuclear cells). Doxorubicin (DOX) was used as the positive control.

TP group, only TP-02 and TP-07 were cytotoxic to all cell lines tested. Conversely, only compound TP-02 was cytotoxic to PBMC (IC_{50} of 5.8 μ M) when compared to TP-07, which was not cytotoxic at concentrations tested (IC_{50} > 30 μ M). Compounds that cause non-specific cell death targeting the cell plasmatic membrane are very toxic. A positive hemolytic assay excludes the compound from being used as the therapeutic drug. None of the compounds tested were toxic to human erythrocytes (EC_{50} > 250 μ M). The cytotoxicity of TAP-07 and TP-07 stood out in relation to the other series of compounds synthesized, in particular due to their cytotoxic potential to HL-60 and HepG2 cells and the lack of toxicity to PBMC (Table 2). Thus, TAP-07 and TP-07 were selected for further experiments.

3.1.2. 2-Pyridyl 2,3-thiazole compounds induce apoptotic cell death in HepG2 cell line. HepG2 is an adherent liver tumor cell line which forms solid tumor when implanted to the animal. In order to check if the compounds are capable to act on suspension cancer cells, a leukemic cell line (HL60) was also treated with TAP-07 and TP-07. HL-60 and HepG2 cells were treated with TAP-07 and TP-07 for 24 and 48 h and the cell viability was evaluated using trypan blue dye exclusion method. Both compounds reduced the cell viability (Fig. 1). In HepG2 cells, TAP-07 caused significant ($p < 0.05$) cell growth inhibition at 7.5 (88%) and 15 μ M (82%) after 24 h, while viable cell number reduced by 42 and 55% after treatment with TP-07 at 16 and 32 μ M, respectively. After 48 h, TAP-07 caused significant ($p < 0.05$) cell growth inhibition at 8 (85%) and 16 μ M (93%) and TP-07, at 16 and 32 μ M, reduced by 68 and 80%, respectively. In HL-60 cells, viable cells number treated for 24 h with TAP-07 0.8 and 1.6 μ M were reduced by 79 and 89%, respectively. The HL60 cell number was also reduced after treatment with TP-07 6 (46% of inhibition) and 12 μ M (53.7% of inhibition). After 48 h incubation, TAP-07 caused significant ($p < 0.05$) cell growth inhibition at 0.8 (87%) and 1.6 μ M (91%) and TP-07, at 6 and 12 μ M, reduced by 57 and 63%, respectively. Doxorubicin, at 2 μ M, reduced HepG2 cell number by 59 and 67% and HL-60 cells number by 72.2 and 79% after 24 and 48 h, respectively.

Morphological analysis performed after May-Grunwald-Giemsa staining showed that both HepG2 and HL-60 cell lines treated with TAP-07 and TP-07 for 24 and 48 h presented fragmentation of the nuclei that became more evident at higher concentrations. A reduction on cell volume was frequently verified in cells with altered nuclei (Fig. 2). In the negative controls, mitotic cells were found indicating the proliferative status of the cell lines, as well as round shaped interphase cell nucleus.

Analyses of the DNA distribution by flow cytometry were also included in the study. Significant ($p < 0.05$) internucleosomal DNA fragmentation of $17.2 \pm 2.4\%$, $25.5 \pm 4.0\%$ and $17.8 \pm 4.4\%$ was found in HepG2 cells after 24 h of treatment with TAP-07 at 8 and 16 μ M and TP-07 at 32 μ M, respectively, compared to the control ($5.9 \pm 2.0\%$) (Fig. 3). The treatment of HepG2 cells with TAP-07 (7.5 and 15 μ M) and TP-07 (32 μ M) reduced the number of cells at G_0/G_1 ($p < 0.05$). The S phase and G_2/M phases of the cell cycle were not affected by TAP-07 nor TP-07 treatment. After 48 h of treatment an increase ($p < 0.05$) of the internucleosomal DNA fragmentation in HepG2 cells was also observed after treatment with TAP-07 at 8 and 16 μ M (22 and 29% of sub- G_1 population, respectively, compared to 3.8% of the negative control). TAP-07 significantly ($p < 0.05$) reduced the number of HepG2 cells at G_2/M after 48 h of treatment. The G_2/M population of the negative control was $18.2 \pm 2.4\%$, while for the cells treated with TAP-07 at 8 and 16 μ M, the percentage of cells at G_2/M was 6.0 ± 0.6 and 4.9 ± 1.1 , respectively. Quantitative analyses by flow cytometry revealed an increase on fragmented DNA content of HL-60 cells treated with TAP-07 0.8 and 1.6 μ M and TP-07 12 μ M (sub- G_1 population was $6.9 \pm 2.0\%$ at negative control and increased to $17.5 \pm 7.0\%$, $20.8 \pm 6.0\%$ and 12.4 ± 2.0 after 24 h of treatment with TAP-07 0.8, 1.6 μ M and TP-07 12 μ M respectively). When HL60 cells were treated with TAP-07 and TP-07 for 48 h, the effect of TAP-07 and TP-07 on fragmented DNA induction was more potent.

The externalization of phosphatidylserine was evaluated by annexin V/propidium iodide staining. The percentage of HepG2 annexin V positive cells (apoptosis) was significantly higher after 24 h of treatment with TAP-07 and TP-07 at 16 μ M ($7.9 \pm 0.6\%$) and 32 μ M ($9.0 \pm 3.3\%$)

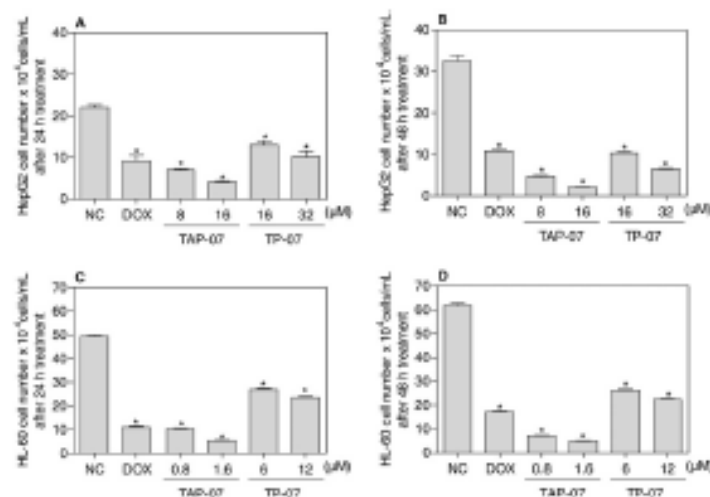


Fig. 1. Cell viability determined by trypan blue stain of HepG2 (A and B) and HL-60 (C and D) cells treated with TAP-07 and TP-07 after 24 (A and C) and 48 (B and D) h incubation. The negative control (NC) was treated with the vehicle (0.1% DMSO) used for diluting the substance tested. Doxorubicin (DOX, 2 μ M) was used as a positive control. Data are presented as the mean $\pm$ S.E.M. of at least three independent experiments performed in duplicate. * $p < 0.05$ compared with the negative control by ANOVA followed by Dunnett's Multiple Comparison Test.

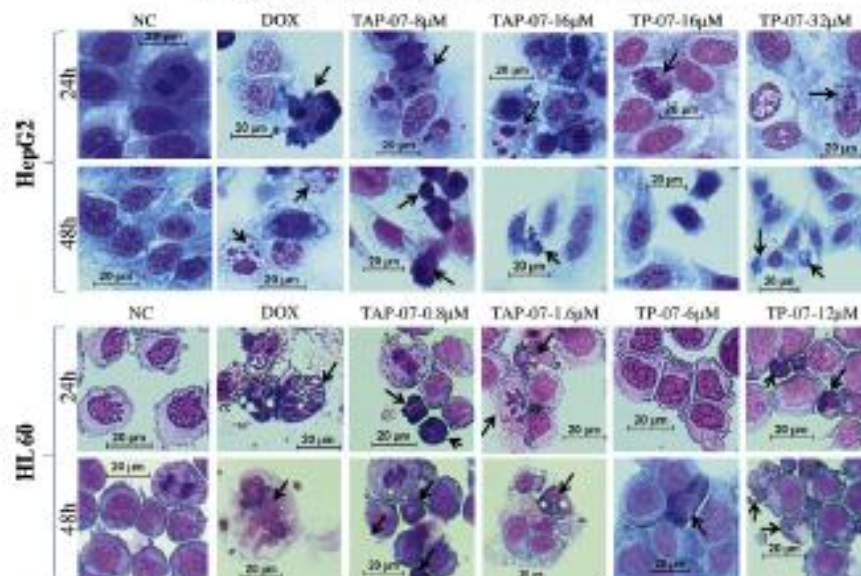


Fig. 2. Microscopic analysis of HepG2 and HL60 cells stained with May-Grunwald-Giemsa after 24 and 48 h incubation. The negative control (NC) was treated with the vehicle (0.1% DMSO) used for diluting the substance tested. Doxorubicin (DOX, 2 μ M) was used as the positive control. Arrows indicated cells with fragmented DNA.

respectively, compared to the control ($4.3 \pm 0.8\%$). An increase on HepG2 necrotic cells was observed for TP-07 3.2 μ M (4.7 ± 0.4) and doxorubicin (88.7 ± 5.3) treatment compared to the control (0.9%) (Fig. 4.) Annexin V positive cells was not observed for HL60 cells, after 24 h of treatment with TAP-07 (1.6 μ M) and TP-07 (12 μ M) (data not shown).

3.2. In vivo assays

3.2.1. 2-Pyridyl-1,2,3-thiazole compounds reduce HepG2 cells development in xenograft model. To investigate whether the 2-pyridyl-1,2,3-thiazole compounds have in vivo antitumor activity, C57-17 SCID mice were engrafted with HepG2 cells and treated with TAP-07 and TP-07 by

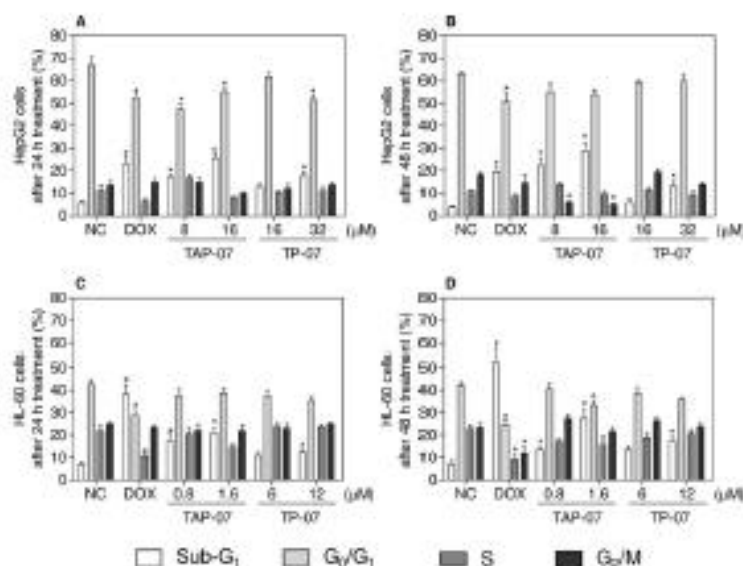


Fig. 3. DNA content analyzed by flow cytometry of HepG2 (A and B) and HL60 (C and D) cells treated with TAP-07 and TP-07 after 24 (A and C) and 48 h (B and D) incubation. The negative control (NC) was treated with the vehicle (0.1% DMSO) used for diluting the substance tested. Doxorubicin (DOX, 2 μ M) was used as the positive control. Data are presented as the mean $\pm$ S.E.M. of at least three independent experiments performed in triplicates. Ten thousand events were evaluated per experiment and cellular debris was omitted from the analysis. * $p < 0.05$ compared with the negative control by ANOVA followed by Dunnett's Multiple Comparison Test.

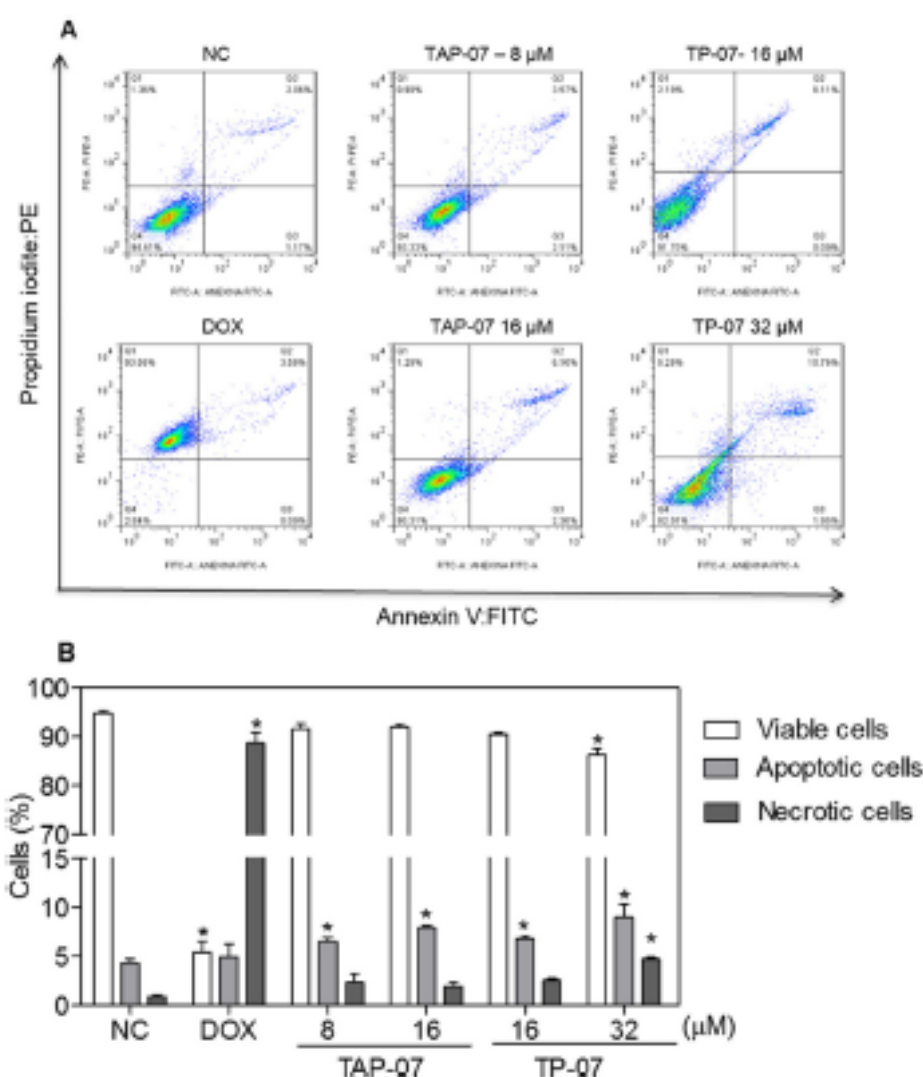


Fig. 4. Effect of TAP-07 and TP-07 compounds in the induction of apoptosis in HepG2 cell line after 24h incubation. A – Representative flow cytometric dot plots showing the percentage of cells in viable, apoptotic and necrotic stages. B – Quantification of the cell viability determined by flow cytometry using annexin V/PI. Then negative control (NC) was treated with the vehicle (0.1% DMSO) used for diluting the substance tested. Doxorubicin (DOX, 2 μ M) was used as the positive control. Data are presented as the mean $\pm$ SEM of at least three independent experiments performed in duplicate. Ten thousand events were evaluated per experiment and cells in debris was omitted from the analysis. * $p < 0.05$ compared with the negative control by ANOVA followed by Dunnett's Multiple Comparison Test.

Intraperitoneal route once a day for 21 consecutive days. Both TAP-07 and TP-07 were able to inhibit HepG2 cells growth in mice. Fig. 5A shows the inhibition obtained. On 22th day, the average tumor weight of the control mice was 0.60 ± 0.08 g. In the presence of TAP-07 and TP-07 (40 mg/kg), the average tumor weights were 0.19 ± 0.03 and 0.32 ± 0.04 g, respectively. Tumor mass was significantly reduced in TAP-07-treated animals by 73.0%, while treatment with TP-07 inhibited the tumor growth by 47.0%. The positive control (5-FU, 10 mg/kg) reduced the tumor weight by 41.4%. In histology analyses, we observed in all groups a hypervascularized solid pattern tumor showing polygonal tumor cells, displaying a pleomorphism, eosinophilic granular cytoplasm, rounded nuclei and prominent nucleoli. Mitotic figures, few pseudoglandular structures and steatotic areas were present. Tumoral cells were

surrounded by fibrous stroma. Although necrosis was a frequent finding in all groups, this aspect was much more evident in TAP-07 group, when compared to the others, especially to the negative control (Fig. 5B).

Systemic toxicological parameters were examined in 2-pyridyl 2,3-thiazole compounds-treated mice. There was no difference on body weight of C57BL/6J mice bearing HepG2 cells tumor after 21 days of treatment with TAP-07 (40 mg/kg) or TP-07 (40 mg/kg), neither on liver, kidney, lung and heart wet weight, when compared to the negative control ($p > 0.05$) (Table 3). The liver weight of animals treated with the positive control (5-FU, 10 mg/kg) was reduced, when compared to the negative control ($p < 0.05$).

The animals were also analyzed regarding to the white and erythrocytes blood cells' counting (Table 4). It was found a decrease in the total

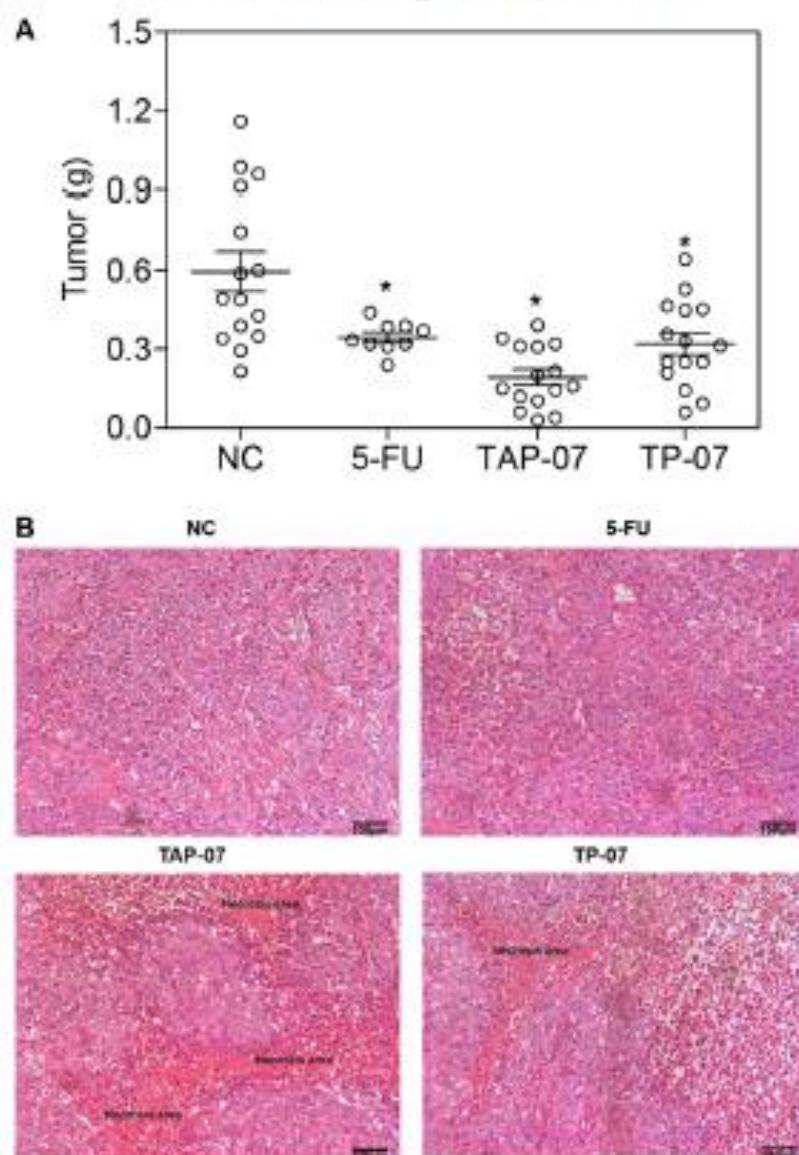


Fig. 5. In vivo antitumor activity of TAP-07 (40 mg/kg) and TP-07 (40 mg/kg) in C58-17 SCID mice bearing HepG2 cells. A – Quantification of tumor weight. B – Representative histology analysis of the tumors. The negative control (NC) was treated with the vehicle (5% DMSO) used for diluting the substance tested. 5-Fluorouracil (5-FU, 10 mg/kg) was used as the positive control. Beginning 1 day after tumor implantation, the animals were treated through the intraperitoneal route for 21 consecutive days. Data are presented as the mean $\pm$ SEM of 9–15 animals. * $p < 0.05$ compared with the negative control by ANOVA followed by Dunnett's Multiple Comparison Test.

Table 3

Effect of TAP-07 and TP-07 on body and relative organ weight from C58-17 SCID mice bearing HepG2 cells.

Parameters	NC	5-FU	TAP-07	TP-07
Dose (mg/kg)	–	10	40	40
Final body weight (g)	27.1 $\pm$ 1.3	26.1 $\pm$ 1.7	26.6 $\pm$ 1.6	26.9 $\pm$ 1.7
Initial body weight (g)	26.2 $\pm$ 1.9	26.2 $\pm$ 1.0	25.47 $\pm$ 1.9	26.9 $\pm$ 1.9
Liver (g/100 g body weight)	4.16 $\pm$ 0.8	3.37 $\pm$ 0.74*	3.65 $\pm$ 0.66	4.38 $\pm$ 1.0
Kidney (g/100 g body weight)	1.47 $\pm$ 0.37	1.15 $\pm$ 0.4	1.13 $\pm$ 0.38	1.59 $\pm$ 0.37
Heart (g/100 g body weight)	0.51 $\pm$ 0.19	0.50 $\pm$ 0.19	0.48 $\pm$ 0.10	0.46 $\pm$ 0.16
Lung (g/100 g body weight)	0.71 $\pm$ 0.29	0.62 $\pm$ 0.19	0.69 $\pm$ 0.20	0.61 $\pm$ 0.19

The negative control (NC) was treated with the vehicle (5% DMSO) used for diluting the substance tested. 5-Fluorouracil (5-FU, 10 mg/kg) was used as the positive control. Beginning 1 day after tumor implantation, the animals were treated through the intraperitoneal route for 21 consecutive days. Data are presented as the mean $\pm$ SEM of 9–15 animals.

* $p < 0.05$ compared with the negative control (NC) by ANOVA followed by Dunnett's Multiple Comparison Test.

Table 4

Effect of TAP-07 and TP-07 on hematological parameters of peripheral blood from C57BL/6 mice bearing HepG2 cells.

Parameters	Non-tumor	NC	5-FU	TAP-07	TP-07
Dose (mg/kg)	–	–	10	40	40
Erythrocytes (10^6 cells/ μ L)	2.87 $\pm$ 0.6	3.32 $\pm$ 1.6*	2.2 $\pm$ 1.91*	2.17 $\pm$ 1.35*	2.15 $\pm$ 1.8*
Total leukocytes (10^3 cells/ μ L)	1.0 $\pm$ 0.2	5.3 $\pm$ 0.9	1.9 $\pm$ 0.4*	1.9 $\pm$ 0.8*	4.9 $\pm$ 1.1
Differential leukocyte (%)					
Neutrophil	41.0 $\pm$ 4.9	74.0 $\pm$ 6.9	65.0 $\pm$ 9.7	91.1 $\pm$ 2.2*	86.3 $\pm$ 3.8*
Lymphocyte	53.8 $\pm$ 5.3	22.0 $\pm$ 4.7	32.8 $\pm$ 9.3*	6.6 $\pm$ 2.3*	11.3 $\pm$ 3.0*
Monocyte	3.2 $\pm$ 0.7	1.0 $\pm$ 0	1.3 $\pm$ 0.5	1.0 $\pm$ 0	1.3 $\pm$ 0.8
Eosinophil	1.2 $\pm$ 0.4	1.3 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 0	1.1 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 0

Non-tumor group represents C57BL/6 mice without tumor inoculation or any treatment. The negative control (NC) was treated with the vehicle (5% DMSO) used for diluting the substance tested. 5-Fluorouracil (5-FU, 10 mg/kg) was used as the positive control. Beginning 1 day after tumor (mp) inoculation, the animals were treated through the intraperitoneal route for 21 consecutive days. Data are presented as the mean $\pm$ S.E.M. of 6 animals.

* $p < 0.05$ compared with the negative control (NC) by ANOVA followed by Dunnett's Multiple Comparison Test.

number of leukocytes in TAP-07 and 5-FU groups compared to DMSO treated group ($p < 0.05$). If we compare the total leukocytes of TAP-07 treated animals ($1.9 \pm 0.4 \times 10^3/\mu$ L) with the animals without tumor ($1.0 \pm 0.2 \times 10^3/\mu$ L), no significant difference between groups is found. The erythrocytes number was also reduced in TAP-07, TP-07 and 5-FU groups.

The clinical biochemical parameters (Table 5) that were measured to investigate liver function alterations were alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), albumin (ALB), cholesterol and total bilirubin. ALT, AST and ALP were significantly ($p < 0.05$) reduced after treatment with TAP-07 and TP-07 40 mg/kg when compared to the control; nonetheless, the enzymes levels were at normal range. ALB, cholesterol and total bilirubin were not affected by the treatment. 5-FU did not change any biochemical parameters described above. As an indicator of kidney function, creatinine (CREA) and blood urea nitrogen (BUN) were measured. No alteration was found on BUN of animals treated with TAP-07, TP-07 and 5-FU, while for CREA levels, only animals treated with TP-07 40 mg/kg presented a reduction on blood. Amylase, a pancreatic enzyme, was measured to verify pancreas damage. No alteration on blood amylase at any groups of animal treated with TAP-07, TP-07 and 5-FU was observed. Creatine Kinase with its correlated with cardiac and skeletal muscle lesion was reduced at all treated groups compared to the control ($p < 0.05$). Glucose, calcium and phosphate levels were not changed among the groups (Table 5).

Table 5

Effect of TAP-07 and TP-07 on clinical biochemical parameters of peripheral blood from C57BL/6 mice bearing HepG2 cells.

Parameters	NC	5-FU	TAP-07	TP-07
Dose (mg/kg)	–	10	40	40
ALT (U/L)	8.8 $\pm$ 2.1	10.2 $\pm$ 1.2	2.2 $\pm$ 0.5*	5.5 $\pm$ 0.5*
AST (U/L)	57.0 $\pm$ 3.7	64.0 $\pm$ 32.6	11.2 $\pm$ 3.2*	18.0 $\pm$ 2.1*
ALP (U/L)	49.6 $\pm$ 10.0	44.5 $\pm$ 6.7	12.0 $\pm$ 3.1*	11.7 $\pm$ 2.1*
ALB (mg/dL)	3.1 $\pm$ 0.4	3.0 $\pm$ 0.9	3.2 $\pm$ 0.6	1.8 $\pm$ 0.4
GLU (mg/dL)	203.0 $\pm$ 83.9	244.3 $\pm$ 45.2	281.0 $\pm$ 29.9	205.8 $\pm$ 4.4
CREA (mg/dL)	0.6 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.08	0.3 $\pm$ 0.1*
CK (U/L)	77.6 $\pm$ 7.5	53.5 $\pm$ 2.3*	22.2 $\pm$ 3.3*	47.7 $\pm$ 1.7*
AME (U/ml)	1.243 $\pm$ 208	1.140 $\pm$ 444	1.078 $\pm$ 144	1.364 $\pm$ 361
Cholesterol (mg/dL)	123.0 $\pm$ 33.1	195.5 $\pm$ 28.0	182.0 $\pm$ 12.8	72.0 $\pm$ 18.9
BUN (mg/dL)	45.6 $\pm$ 21.1	36.2 $\pm$ 7.2	33.9 $\pm$ 2.8	39.0 $\pm$ 8.9
BIL Total (mg/dL)	0.1 $\pm$ 0.05	0.1 $\pm$ 0.05	0.1 $\pm$ 0.05	0.2 $\pm$ 0.2
CALCIUM (mg/dL)	8.3 $\pm$ 1.3	8.6 $\pm$ 2.9	6.1 $\pm$ 0.7	6.9 $\pm$ 1.1
PHOSPHATE (mg/dL)	16.7 $\pm$ 2.9	19.0 $\pm$ 1.0	17.3 $\pm$ 1.5	16.3 $\pm$ 0.7

The negative control (NC) was treated with the vehicle (5% DMSO) used for diluting the substance tested. 5-Fluorouracil (5-FU, 10 mg/kg) was used as the positive control. Beginning 1 day after tumor (mp) inoculation, the animals were treated through the intraperitoneal route for 21 consecutive days. ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; ALP: alkaline phosphatase; ALB: albumin; CREA: creatinine; CK: creatine kinase; AME: amylase; BUN: blood urea nitrogen; BIL Total: Total bilirubin. Data are presented as the mean $\pm$ S.E.M. of 4–5 animals.

* $p < 0.05$ compared with the negative control by ANOVA followed by Dunnett's Multiple Comparison Test.

Morphological analysis was performed in the liver, kidneys, lungs and hearts of all groups (Fig. 6). Histopathological analysis of the livers revealed hydropic degeneration, dispersed areas of coagulation necrosis and inflammation in all experimental groups. It should be noted that these histopathological characteristics were more pronounced in the group TP-07, when compared to the other groups (negative control, 5-FU and TAP-07). In the kidneys, congestion, hemorrhage, glomerular sclerosis, tubular dilation and inflammation, as well as focal tubular necrosis at all groups were observed. In lungs, atelectasis, emphysema, focal hemorrhage, acute inflammation and vascular congestion were observed in all animals. Bronchiolar necrosis was observed in the groups TP-07 and TAP-07. Histopathological analysis of hearts did not present alterations in any group. Some histopathological features of this study (hydropic degeneration, vascular congestion and focal areas of inflammation) are acute cellular responses to the stimulus unrelated to the treatment and the injured cells can return to a homeostatic state when the aggression ends.

4. Discussion

The *in vitro* cytotoxic activity and *in vivo* antitumor evaluation of TAP and TP compounds were studied for the first time at this communication. Most of the compounds were cytotoxic to at least three cell lines, with exception to TP-11, which was cytotoxic to only one cell line (HL-60). The cytotoxicity of TAP and TP compounds at HL-60, MCF-7 and NC-H292 did not changed significantly, being both groups of compounds highly potent. However, for HepG2 cell line, a few compounds presented cytotoxicity, being TAP-07 and TP-07 the most potent compounds.

Pyridyl 1,3-thiazole derivatives were described for presenting cytotoxicity to HT29 colon cancer and Jurkat leukemia cells with IC_{50} values of 25.22 and 16.2 μ M, respectively (dos Santos et al., 2016). In addition, pyridyl 1,3-thiazole derivatives induced TNF production on macrophages (dos Santos et al., 2016). Although being potent cytotoxic to tumor cells, some of TAP and TP compounds were also cytotoxic to non-tumor cells (PBMC) with resulting low selective index. Conversely, TAP-07 and TP-07 were not cytotoxic to non-tumor cells (PBMC) at concentrations tested and presented potent cytotoxicity to tumor cells growth. Due to selective cytotoxicity toward cancer cells, TAP-07 and TP-07 were selected for more experiments in two cell lines, HepG2 and HL-60.

Treatment with TAP-07 and TP-07 indicated reduction of the cell number, changes in morphological characteristics of the cells and increase in internucleosomal DNA fragmentation. These effects were observed for both HL-60 and HepG2 cells, being HL-60 more sensitive to both compounds than HepG2 cells. Apoptosis is characterized by externalization of phosphatidylserine, cytochrome c leakage from mitochondria and activation of caspases which initially leads to nuclear and cytoplasmic condensation and ultimately the breaking up of the cell into a number of well-preserved fragments (Kerr et al., 1972); (Leist and Jätsch, 2001). An increase in apoptotic HepG2 cells characterized

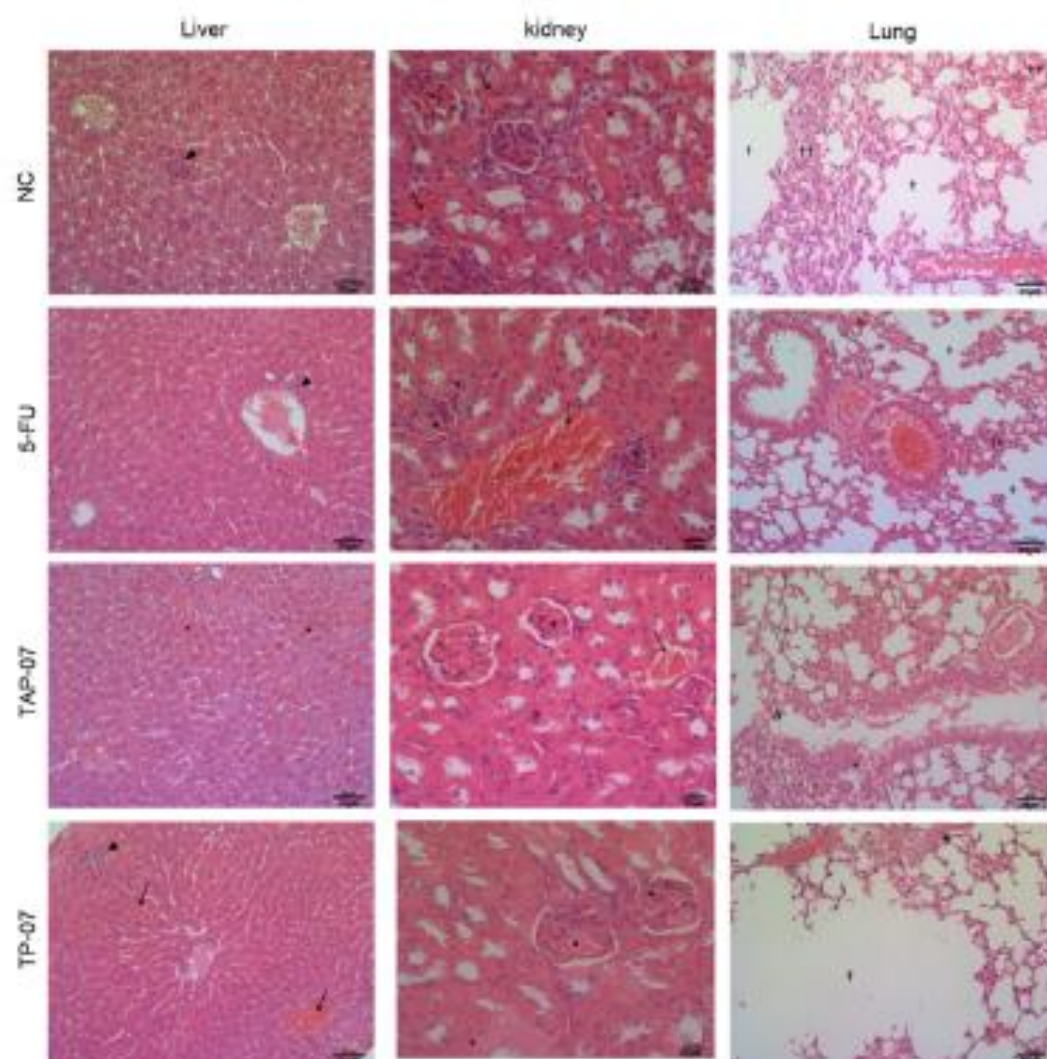


Fig. 6. Histopathological analysis of organs of C-57BL/6 mice bearing HepG2 cells treated with TAP-07 (40 mg/kg) and TP-07 (40 mg/kg) stained with hematoxylin and eosin and analyzed by light microscopy. The negative control (NC) was treated with the vehicle (5% DMSO) used for diluting the substance tested. 5-Fluorouracil (5-FU) 10 mg/kg was used as the positive control. Beginning 1 day after tumor implantation, the animals were treated through the intraperitoneal route for 21 consecutive days. Symbols: → digestion; ▲ inflammation; * necrosis; † emphysema; ‡ atrophic; § hyaline.

by externalization of phosphatidylserine was observed. However, the number of HLE60 apoptotic cells was not increased after 24 h. Pyridyl-thiazoles compounds induced cell death by apoptosis in HT-29 cells after 72 h of treatment, while for Jurkat cell line a high level of propidium iodide labeled (necrosis) cells were observed (dos Santos et al., 2016). So far, TAP-07 was more potent than TP-07 in *in vitro* cytotoxic evaluation. TAP-07 differs from TP-07 only by the methyl at C6. For trypanocidal activity, some features of the structure, such as the presence of a methyl group at C6, the pyridine ring and the thiazole ring, were important (Cardoso et al., 2014).

Both TAP-07 and TP-07 were also tested in a hepatocellular carcinoma xenograft model. The tumors of animals treated with TAP-07 and TP-07 were reduced. In addition, necrosis area in the tumors was higher when animals were treated with TAP-07 compared to the other groups. *In vivo* tumor evaluation confirms the *in vitro* activity of pyridyl-thiazole compounds. It is worthwhile to emphasize that liver cancer

is the second most common cause of death from cancer worldwide (Siegel et al., 2015; Theise, 2014).

Weight loss is a significant sign of toxicity on animals under treatment with cancer chemotherapy. Body weight gain and organ weight of animals treated with TAP-07 and TP-07 was not different from the negative control suggesting the lack of severe toxicity. Liver enzymes were reduced after treatment with TAP-07 and TP-07. However, an increase on enzymes would suggest injury to the liver, rather than the reduction found (Glennini et al., 2005). Moreover, bilirubin, albumin and cholesterol were at normal levels. The reduction of enzyme liver activity may be related to the presence of pharmacophores with known enzymatic inhibitory function. Molecules presenting a pyridine-thione/thiosemicarbazones or its cyclization into thiazoles as pharmacophores are described as enzymatic inhibitors. Triapine, a pyridine-thione/thiosemicarbazone compound with anticancer properties, presents ribonucleotide reductase inhibitor activity (Niu et al., 1995). Some

hydrazine-thiazole derivatives displayed Human dihydromotate dehydrogenase inhibition with *in vivo* anti-arthritis activity and rat liver mitochondrial monoamine oxidase inhibition (U et al., 2015; Ració et al., 1995). Kidney, lung and heart biochemical parameters were at normal range. The histopathological analysis of organs did not show any permanent lesion after treatment with pyridyl 1,3-thiazole derivatives. Total leukocytes were not reduced after treatment with TAP-07 when compared to animals without tumor. Leukocytosis is frequently found in patients with solid tumor and in some cases is associated to worse prognosis (Scherberg et al., 2017; Mabuchi et al., 2011). The treatment with TAP-07 brought back to the normal range the number of leukocytes, which were increased by presence of the tumor (DMSO-treated group). In fact, no symptoms of toxicity was perceived in animal treated with TAP-07 for 21 consecutive days. The development of new drugs with no or less side effect is a great challenge. Herein, we presented two novel compounds with anti-liver cancer activity and weak toxicity. In conclusion, TAP-07 and TP-07 presented anti-liver tumor effects both *in vitro* and *in vivo* with no major signs of toxicity, being TAP-07 which differs from TP-07 only by the methyl at C6, more potent as anti-tumor compound.

Funding

This work was financially supported by the Brazilian agencies CAPES, CNPq, FAPESP and FAPCE. (APQ-0213-2.1/13; AMD-0050-4.03/16)

Conflict of interest

The authors have declared that there is no conflict of interest.

Acknowledgment

The authors are grateful to the histotechnology and flow cytometry platforms of IGM/ROCRUZ-Bahia for the performance of histological techniques and flow cytometric data acquisition, respectively.

References

- Abul AA, Shaheed A, Gai Z, Ramel M, Balchuk A, Lai B, Khan E, 2015. A review on the medicinal importance of pyridine derivatives. *J. http://www.sciencepublishinggroup.com*.1, doi:10.11568/jscmc.201501.11.
- Beraldo, H., Gambinho, D., 2004. The wide pharmacological versatility of aromatic bases, thiosemicarbazones and their metal complexes. *Mini-Rev. Med. Chem.* 4:31–39. <http://dx.doi.org/10.2174/156955704087484>.
- Cardoso, M.V. de O., Siqueira, L.R.P. de, Silva, E.B. da, Costa, L.B., Hernandez, M.Z., Rabello, M.M., Almeida, R.S., Cruz, L.F. da, Moreira, D.R.M., Pereira, V.R.A., Castro, M.C.A.B. de, Bernhardt, P.V., Leite, A.C.L., 2014. 3-Pyridyl thiazoles as novel anti-trypanosoma cruzi agents: structural design, synthesis and pharmacological evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* 85:48–59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.08.032>.
- Niu, ChuanSheng Chenlin; Ju n Li, Hander; Xinyun Li RenW, Haver; Terence W. Doyle Killingworth; Shu-Hui Chen, H., 1995. United States Patent [19] [11] Patent Number: [45] Date of Patent: doi: <http://dx.doi.org/10.1074/JBC274.42.30030> [51].
- Eybl, M., Werb, Z., 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* 2:161–174. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc745>.
- Forde, M.P., da Silva, P.B.N., da Silva, T.G., Kaufman, T.S., Milillo, G.C.G., Oliveira, C.C., 2016. Synthesis and preliminary evaluation of 3-thioxyan-1H-indole as potential anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* 118:21–26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.04.039>.
- Giannini, E.G., Tetta, R., Savarino, V., 2005. Over enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ* 172:367–379. <http://dx.doi.org/10.1503/cmaj.1040752>.
- Janson, P.J., Kalinowski, D.S., Jane, D.J.R., Kosarovic, Z., Seebacher, R.A., Rouzi, L., Sahni, S., Merlot, A.M., Richardson, D.R., 2015. The resurgence of polypharmacology in the development of anti-cancer therapeutics: inhibition of the “red of death” in cancer by di-3-pyridylketone thiosemicarbazones. *Pharmacol. Rev.* 100:255–269. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2015.08.013>.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26:239–257.
- Leav, M., Jilka, M., 2001. Four deaths and a funeral: from capsules to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:589–598. <http://dx.doi.org/10.1038/1308500a>.
- Li, S., Luan, G., Ren, X., Song W., Xu, L., Xu, M., Zhu, J., Dong, D., Diao, Y., Liu, X., Zhu, L., Wang, R., Zhao, Z., Xu, Y., Qi, H., 2015. Rational design of benzylidenehydrazinyl-substituted thiazole derivatives as potent inhibitors of human dihydromotate dehydrogenase with *in vivo* anti-arthritis activity. *Sci Rep* 5, 14036. <http://dx.doi.org/10.1038/srep14036>.
- Mabu, S., Matsumoto, Y., Iachuki, F., Yoshida, Y., Chushi, H., Mori, E., Hamada, T., Aoyama, K., Much, D.C., Kimura, T., 2011. Posttreatment leukocytosis is an indicator of poor prognosis in patients with cervical cancer. *Gynecol. Oncol.* 122:25–32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2011.03.035>.
- Miyawaki, S., Arakawa, Y., Nara, K.-I., Igaki, K., Watanabe, Y., Kimura, H., Kawamoto, T., Ohkawa, S., 2005. Synthesis and biological activities of 4-phenyl-5-pyridyl-1,3-thiazole derivatives as p38 MAP kinase inhibitors. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 53, 410–418.
- Mongi, R., Lorain, A., Lenzi, A., Rambaldi, M., 2015. Recent patents on Thiazole derivatives endowed with anticancer activity. *Recent Pat. Anticancer. Drug Discov.* 10, 280–297.
- Morimoto, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65:55–63. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90030-4](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(83)90030-4).
- Ració, G., Marzoni, R., Rasin, A., Marzoni, G., Cambria, A., 1995. Inhibition of rat liver mitochondrial monoamine oxidase by hydrazine-thiazole derivatives: structure-activity relationships. *Bioorg. Med. Chem.* 3:1485–1491. [http://dx.doi.org/10.1016/0958-0609\(95\)00137-6](http://dx.doi.org/10.1016/0958-0609(95)00137-6).
- da Silva, P.B., Pinho, F.R., Leite, C.Q.F., Gomes, S.S., de Sousa, C.F., Batista, A.A., Nascimento, O.R., Elena, J., Carriello, E.E., Nogueira, E., Deleon, V.M., 2008. Vanadium complexes with thiosemicarbazones: synthesis, characterization, crystal structure and anti-mycobacterium tuberculosis activity. *Polyhedron* 28:998–1005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.poly.2008.11.012>.
- dos Santos, T.A.R., da Silva, A.C., Silva, E.B., Gomes, P.A.T. de M., Espíndola, J.W.P., Cardoso, M.V. de O., Moreira, D.R.M., Leite, A.C.L., Pereira, V.R.A., 2016. Antitumor and immunomodulatory activities of thiosemicarbazones and 1,3-Thiazoles in Jurkat and HT-29 cells. *Biomol. Pharmacol.* 82:555–569. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.05.038>.
- Scherberg, A., Grande, A., Rivin Del Campo, E., Ducreux, M., Nguyen, E., Goens, D., Chugan, C., Deutsch, E., 2017. Leukocytosis and neutrophilia predicts outcome in anal cancer. *Radiother. Oncol.* 122 (1):137–145. <http://dx.doi.org/10.1016/j.radonc.2016.12.009>.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A., 2016. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J. Clin.* 66:7–30. <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21332>.
- da Silva, J.B.P., Navarro, D.M. de A.F., da Silva, A.G., Santos, G.K.N., Dutra, K.A., Moreira, D.R., Ramos, M.N., Espíndola, J.W.P., de Oliveira, A.D.T., Bonfanti, D.J., Leite, A.C.L., Hernandez, M.Z., Pereira, V.R.A., da Rocha, L.F., de Castro, M.C.A.B. de Oliveira, B.C., Liu, Q., Merz, K.M., 2015. Thiosemicarbazones as Andes angiotensin receptor II. *Eur. J. Med. Chem.* 100:162–175. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.051>.
- Theras, R.D., 2014. Over Cancer. In: Stewart, B.W., Wild, C.P. (Eds.), *World Cancer Report. International Agency for Research on Cancer, Distributed by World Health Organization*, pp. 403–412.
- Zhang, Y., Young, R.A., Wang, A., Hawkins, M., Leonard, K.A., Barby, J.C., Mahmood, U.S.M., 2011b. Pyridyl-thiazolyl inhibitors of pro-matrix metalloproteinase activation. WO 2012060210A1. <http://www.google.com/patents/wo2012060210A1?d=an&id=pt-08&cc=us&as=13.01.17>.