



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA
LABORATÓRIO DE IMUNOMODULAÇÃO E NOVAS ABORDAGENS
TERAPÊUTICAS

RAQUEL VASCONCELOS DA SILVA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE RADIOPROTETORA DE NOVOS DERIVADOS
THIAZOLIDÍNICOS

Recife

2020

RAQUEL VASCONCELOS DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE RADIOPROTETORA DE NOVOS DERIVADOS
TIAZOLIDÍNICOS.**

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

Orientador: Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Coorientadores: Prof^ª. Dr^ª. Mariana Brayner Cavalcanti Freire Bezerra

Prof^ª. Dr^ª. Marina Galdino da Rocha Pitta

Recife

2020

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Silva, Raquel Vasconcelos da
Avaliação da atividade radioprotetora de novos derivados tiazolidínicos / Raquel
Vasconcelos da Silva – 2020.

99 f.: il., fig., tab.

Orientador: Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo
Coorientadores: Mariana Brayner Cavalcanti Freire Bezerra e Marina
Galdino da Rocha Pitta

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica,
2020.

Inclui referências e anexos.

1. Radioterapia 2. Cancer 3. Citocinas I. Rêgo, Moacyr de Jesus de Melo
(orient.) II. Freire, Mariana Brayner Cavalcanti (coorient.) III. Pitta, Marina
Galdino da Rocha (coorient.) IV. Título

615.842

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2021-115

RAQUEL VASCONCELOS DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE RADIOPROTETORA DE NOVOS DERIVADOS
TIAZOLIDÍNICOS.**

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

Aprovada em: 25/08/2020

Banca Examinadora

Assinatura: _____

Dra. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro

Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Dra. Lucianna Rabelo Pessoa de Siqueira

Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Dra. Jeyce Kelle Ferreira de Andrade

Universidade Federal Rural de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, pelo dom da sabedoria e por ter me dado forças para seguir com os meus objetivos, mesmo quando tudo pareceu impossível.

Aos meus pais, Terezinha de Jesus e José Carlos, que sempre me deram total apoio. Me ensinando, com amor e paciência, a importância da educação e me incentivando a sempre querer mais, não desistindo diante de obstáculos.

Ao meu marido, Paulo Victor, que está comigo desde a graduação, mas que esteve integralmente ao meu lado durante a trajetória do mestrado. Sempre presente e de braços abertos, para me apoiar em qualquer decisão. Com as palavras certas nos momentos certos.

Ao meu filho, Nicolas, que ainda nem nasceu e já é fonte de força e amor para mim.

Aos meus orientadores, Moacyr Rêgo e Mariana Brayner, que me acolheram nessa jornada e que sempre demonstraram disponibilidade para elucidar minhas dúvidas, contribuindo para o meu crescimento e amadurecimento acadêmico. Agradeço também a credibilidade em mim depositada, quando muitas vezes eu duvidei de mim mesma, eles me mostraram o contrário.

Aos meus amigos do Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), que me acolheram como um membro da família e que participaram direta e indiretamente do andamento da pesquisa, seja dividindo bancada ou nos momentos de descontração. Em especial a: Valécia, Lília, Wiviane, Antônio, Eduardo, Lidiane, Lucas e Renata.

Ao Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF), em especial a Marina Pitta e Douglas Viana, pelo apoio no aprendizado na área da química medicinal e disponibilização dos compostos.

À coordenação, secretaria e docentes do Programa de PósGraduação em Inovação Terapêutica, que foram singulares nesse processo de aprendizado.

Ao órgão de fomento, Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia (FACEPE), pelo financiamento dessa pesquisa.

RESUMO

O câncer é uma patologia multifatorial e de alta incidência no Brasil e no mundo, configurando-se como um grave problema de saúde pública, tornando-se indispensável a busca pelo desenvolvimento e aprimoramento de métodos terapêuticos para tentar reverter este cenário. A radioterapia (RT) é um método capaz de destruir células neoplásicas localmente, através de deposição de energia das radiações ionizantes. No entanto, pacientes submetidos à RT podem apresentar efeitos adversos, tais como: radiodermites, mucosite e xerostomia. Portanto, a busca por drogas que atuem como radioprotetoras e/ou mitigadoras de tais efeitos é importante para a promoção da qualidade de vida para os pacientes submetidos a tal procedimento. Os derivados tiazolidínicos vêm sendo amplamente estudados quanto às suas diferentes propriedades, podendo ser estas antibacterianas, hipoglicemiantes, anticancerígenas, entre outras. Assim, esse estudo visou avaliar a atividade radioprotetora de novos derivados tiazolidínicos hibridizados com grupamentos análogos aos agentes radioprotetores já existentes, como a amifostina. Através da coleta do sangue periférico de voluntários saudáveis, foi possível avaliar a citotoxicidade dos novos derivados tiazolidínicos, JB10, JB16, JB17, JB18, JB19, JB23, JB24 e o JB25, nas concentrações de 10uM, 50uM e 100uM. A quantificação de citocinas séricas do perfil inflamatório, diante do tratamento das células irradiadas e não irradiadas com os compostos, foi realizada através de citometria de fluxo, através do método de CBA. A avaliação de geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi realizada utilizando a técnica de citometria de fluxo, tendo como indicador o superóxido dihidroetídio (DHE), após 48 horas de tratamento com os compostos e 24 horas após a exposição à radiação ionizante. No ensaio de citotoxicidade, todos os compostos em todas as suas concentrações obtiveram viabilidade $\geq 90\%$. Dentre os compostos avaliados, o JB18 demonstrou um papel diferenciado na imunomodulação, reduzindo os níveis das citocinas IL-6, IL-10, TNF e IL-12p70 nas amostras irradiadas. Na avaliação de espécies reativas de oxigênio, os compostos JB18 e JB19 demonstraram resultados significativos, na redução da produção de ROS, principalmente nas amostras irradiadas. Na análise por docking molecular, os resultados do JB18 mostraram-se bastante consistentes com os resultados de outros agonistas parciais da PPAR γ , destacando a interação com os resíduos CYS285, ILE281, LEU330. Diante dos parâmetros biológicos investigados, o JB18 apresentou resultados mais eficazes em comparação aos outros compostos, reduzindo os níveis de espécies reativas de oxigênio e modulação das citocinas inflamatórias.

Palavras-chave: Tiazolidinas. Câncer. Radiação Ionizante. Citocinas. Espécies Reativas de Oxigênio. Docking Molecular.

ABSTRACT

Cancer is a multifactorial pathology with high incidence in Brazil and in the world, becoming a serious public health problem, making the search for the development and improvement of therapeutic methods indispensable to try to reverse this scenario. Radiotherapy (RT) is a method capable of destroying neoplastic cells locally, through the deposition of energy from ionizing radiation. However, patients undergoing RT may experience adverse effects, such as: radiodermatitis, mucositis and xerostomia. Therefore, the search for drugs that act as radioprotective and / or mitigating such effects is important for the promotion of quality of life for patients undergoing such a procedure. Thiazolid derivatives have been widely studied for their different properties, which may be antibacterials, hypoglycemic agents, anticancer agents, among others. Thus, this study aimed to evaluate the radioprotective activity of new hybridized thiazolidine derivatives with groups analogous to existing radioprotective agents, such as amifostine. Through the collection of peripheral blood from healthy volunteers, it was possible to evaluate the cytotoxicity of the new thiazolidine derivatives, JB10, JB16, JB17, JB18, JB19, JB23, JB24 and JB25, in concentrations of 10uM, 50uM and 100uM. The quantification of serum cytokines of the inflammatory profile, in the face of the treatment of irradiated and non-irradiated cells with the compounds, was performed through flow cytometry, using the CBA method. The evaluation of the generation of reactive oxygen species (ROS) was performed using the flow cytometry technique, using the superhydroxydehyde (DHE) as an indicator, after 48 hours of treatment with the compounds and 24 hours after exposure to ionizing radiation. In the cytotoxicity assay, all compounds in all their concentrations achieved viability $\geq 90\%$. Among the compounds evaluated, JB18 demonstrated a differentiated role in immunomodulation, reducing the levels of cytokines IL-6, IL-10, TNF and IL-12p70 in irradiated samples. In the evaluation of reactive oxygen species, the compounds JB18 and JB19 demonstrated significant results, in the reduction of ROS production, mainly in the irradiated samples. In the analysis by molecular docking, the results of JB18 were shown to be quite consistent with the results of other partial PPAR γ agonists, highlighting the interaction with residues CYS285, ILE281, LEU330. Given the biological parameters investigated, JB18 showed more effective results compared to other compounds, reducing the levels of reactive oxygen species and modulation of inflammatory cytokines.

Keywords: Thiazolidines. Cancer. Ionizing radiation. Cytokines. Oxygen-reactive species.
Molecular docking.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020	15
Figura 2 – Tipos de radioterapia: teleterapia e braquiterapia	18
Figura 3 – Efeito Compton	19
Figura 4 – Efeitos diretos e indiretos da radiação ionizante na célula	20
Figura 5 – Cascata de eventos do ciclo celular após interação com a radiação ionizante	21
Figura 6 – Estrutura química da Amifostina e via de formação do seu metabólito primário...	24
Figura 7 – Estrutura química da Indralina	25
Figura 8 – Estrutura química da Mexamina	25
Figura 9 – Estrutura molecular da Tiazolidina-2,4-diona	26
Figura 10 – Estrutura química das moléculas de Rosiglitazona e Pioglitazona	28
Figura 11 – Rota de síntese dos derivados tiazolidínicos	30
Figura 12 – Irradiação da placa de cultura no aparelho de Colbato-60	36
Figura 13 – Estratégia de gate utilizada na seleção das populações	39
Figura 14 – Gráfico BOILED-Egg	42
Figura 15 – Resultado dos ensaios de citotoxicidades dos JBs em PBMCs.	43
Figura 16 – Perfil comportamental da IL-6	45
Figura 17 – Perfil comportamental da IL-10	46
Figura 18 – Perfil comportamental do TNF	47
Figura 19 – Perfil comportamental da IL-12p70	48
Figura 20 – Análise individual dos compostos no papel antioxidante	50
Figura 21 – Posição de acoplamento do composto JB18 na Cadeia A da Proteína PPAR γ	52
Figura 22 – Sítio ativo da enzima onde houve uma ancoragem com o composto JB18	52
Figura 23 – Ligação de Hidrogênio entre o JB18 e o resíduo da proteína PPAR γ	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estrutura molecular dos derivados tiazolidínicos avaliados	31
Tabela 2 – Características físico-químicas dos compostos	33
Tabela 3 – Limite de detecção para citocinas do perfil inflamatório.	37
Tabela 4 – Predição teórica da biodisponibilidade oral dos derivados tiazolidínicos.....	41
Tabela 5 – Docking molecular entre o composto LPSF/JB-18 e a proteína PPAR γ	51

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	CÂNCER: UMA VISÃO GERAL	15
2.2	RADIOTERAPIA.....	17
2.3	EFEITOS BIOLÓGICOS DAS RADIAÇÕES IONIZANTES	19
2.3.1	Efeitos das radiações ionizantes no sistema imunológico.....	22
2.4	DROGAS RADIOPROTETORAS	23
2.5	TIAZOLIDINEDIONAS.....	26
3	OBJETIVO GERAL	29
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1	DERIVADOS TIAZOLIDÍNICOS	30
4.2	ANÁLISE <i>IN SÍLICO</i> – REGRA DE CINCO DE LIPINSKI.....	33
4.3	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	33
4.4	TIPO E CRITÉRIO DO ESTUDO	34
4.4.1	Critérios de inclusão.....	34
4.4.2	Critérios de exclusão	34
4.5	COLETA DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	34
4.6	OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES.....	35
4.7	PROCESSO DE IRRADIAÇÃO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	35
4.8	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DAS CÉLULAS MONONUCLEARES.....	36
4.9	CBA (CITOMETRIC BEAD ARRAY)	37
4.10	DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS).....	38
4.11	DOCKING MOLECULAR DO COMPOSTO JB18 E PPAR γ	39
5	RESULTADOS	41
5.1	ANÁLISE <i>IN SÍLICO</i> – REGRA DE LIPINSKI	41
5.2	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS DERIVADOS TIAZOLIDÍNICOS	43
5.3	AVALIAÇÃO DA AÇÃO DOS COMPOSTOS NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS	44
5.4	AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	49
5.5	ANÁLISE DO DOCKING MOLECULAR DO JB18 E PPAR γ	51
6	DISCUSSÃO.....	54
	CONCLUSÃO.....	57
	REFERÊNCIAS	58

ANEXO 1 71

ANEXO 2 76

ANEXO 3 79

ANEXO 4 80

ANEXO 5 84

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença multifatorial, que pode envolver causas genéticas, ambientais, comportamento alimentar, exposição a drogas, sedentarismo, entre outros. Sendo considerado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um grave problema de saúde pública em todo o mundo. Dados recentes estimam que só em 2018 houve 18,1 milhões de novos casos e que aproximadamente 9,6 milhões de pessoas morreram em decorrência do câncer; e que até 2030 esse número de possa chegar a 24,1 milhões. (GLOBOCAN, 2018). No Brasil, estima-se que para cada ano do triênio 2020 a 2022 haverá uma incidência de cerca de 625 mil novos casos, entre homens e mulheres, tendo como localização primária majoritária o tumor na próstata e na mama, respectivamente para cada sexo (INCA, 2020).

Entre as principais intervenções terapêuticas utilizadas no tratamento do câncer, estão: a ressecção cirúrgica, a quimioterapia, a imunoterapia e a radioterapia (RT), podendo ser utilizados de forma isolada ou em combinação, a depender da necessidade clínica do paciente (INCA, 2018). A RT como tratamento do câncer, pode ser aplicada de diferentes formas: curativa, quando utilizada para eliminar todo o tumor; de forma neoadjuvante, quando sua função é reduzir o volume tumoral para sua posterior ressecção cirúrgica; paliativo, quando seu objetivo é melhorar a qualidade de vida do paciente, reduzindo seus sintomas; e adjuvante, sendo a radioterapia complementar a quimioterapia ou a cirurgia (LÔBO, 2009). No entanto, cerca de 10% dos pacientes manifestam reações adversas graves à radioterapia nos tecidos sadios, diminuindo a qualidade de vida do paciente e limitando a eficácia do tratamento (POPANDA et al., 2008). Este fato demonstra a importância de se desenvolver novas drogas que minimizem os efeitos radioinduzidos acentuados.

Pacientes submetidos à radioterapia apresentam os sinais característicos de um quadro inflamatório agudo, decorrente de uma cascata de transdução de sinais celulares induzida pela interação da radiação ionizante com o tecido sadio adjacente ao tumor. A instalação deste quadro inflamatório apresenta-se de forma singular em cada indivíduo (SCHAUE et al., 2015). As citocinas estão intimamente associadas ao grau de lesão tecidual e são expressas em quantidades discretas no estado fisiológico basal, no entanto, a perturbação desse estado de equilíbrio por um agente agressor estimula a produção em cadeia dessas proteínas.

A radiação ionizante é um agente físico capaz de estimular a produção de citocinas anti e pró-inflamatórias, sendo possível mensurá-las, qualitativamente e quantitativamente. Os níveis de citocinas de pacientes expostos às radiações ionizantes podem ser associadas ao grau de inflamação tecidual de cada indivíduo, portanto, podem ser relacionados com a

radiossensibilidade individual do paciente (DI MAGGIO et al., 2015). Neste contexto, fármacos com potencial anti-inflamatório e imunomodulador se inserem como possíveis alternativas para a minimização de efeitos adversos de indivíduos radiossensíveis do ponto de vista de resposta inflamatória.

As tiazolidinedionas (TZD) são agentes químicos sintéticos, ligantes às PPARs (Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma) e possuem propriedades anti-inflamatórias. Os PPARs, membro da família de receptores de hormônios nucleares, atuam na regulação da expressão de vários genes e processos metabólicos no controle da resposta inflamatória (MANGONI, et al., 2017).

As TZDs apresentam um agonismo, principalmente pela isoforma gama dos Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma (PPAR γ) (NANJAN; MOHAMMED; KUMAR; CHANDRASEKAR, 2018). Desempenha papel importante na proteção contra o estresse oxidativo e inflamação, através da regulação negativa dos níveis de NFK β nuclear, diminuindo o nível plasmático de fatores estimulantes da inflamação (KAUR; NAG; SINGH; SHARMA, 2018). Estudos relatam ainda, um efeito radioprotetor das TDZs em cérebros de ratos quando expostos às radiações ionizantes (ZHAO et al., 2007).

No momento, o único medicamento aprovado pelo FDA (*Food And Drug Administration*) com atividade radioprotetora foi a Amifostina, da família dos aminotióis. No Brasil, a amifostina apresenta-se registrada na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), desde o ano de 2007 e sua principal é o papel citoprotetor. Sugere-se que seu principal mecanismo de ação está relacionado com a eliminação de radicais livres e na modulação do estresse oxidativo (OSHIMA, et al., 2015). No entanto, apesar do seu desempenho significativo, a droga apresenta limitações devido a sua alta toxicidade mesmo em baixas dosagens, provocando consequentes distúrbios no trato gastrointestinal superior e inferior, além de uma súbita hipotensão arterial no indivíduo (VARGHESE, et al., 2018).

Portanto, considerando o relevante papel das tiazolidinedionas, foi utilizada a estratégia de hibridizar o anel tiazolidínico com substituintes análogos aos radioprotetores já disponíveis.

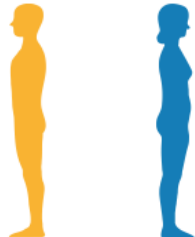
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÂNCER: UMA VISÃO GERAL

O câncer é considerado um grupo de mais de cem doenças, que tem como característica principal sua capacidade de proliferação descontrolada, e ao mesmo tempo sistematizada, de células anormais dos seus limites habituais, capazes de se espalhar por outros órgãos, estabelecendo a metástase. É a segunda principal causa de morte em todo o mundo e foi responsável por aproximadamente 9,6 milhões de mortes em 2018 (WHO, 2018). Ainda segundo a OMS, os tipos de câncer mais comuns são: pulmão, mama, colorretal, próstata, pele e estômago, exceto os de pele não melanoma. O uso do tabaco, consumo de bebidas alcoólicas, sedentarismo, alimentação inadequada e obesidade estão entre os principais fatores de risco (GHARAKHANI, et al., 2019; PETRICK, et al., 2018).

No Brasil, estima-se que para cada ano do triênio 2020 a 2022 haverá uma incidência de cerca de 625 mil novos casos, entre homens e mulheres, tendo como localização primária majoritária o tumor na próstata e na mama, respectivamente para cada sexo. Na Figura 1 é possível ver a distribuição dos dez principais tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto o câncer de pele não melanoma. Desse total, 23.620 novos casos serão registrados em Pernambuco: 9.570 em homens e 10.980 em mulheres (INCA, 2020). Dados de 2017 trazem números preocupantes sobre a taxa de mortalidade no Brasil, foram aproximadamente 220 mil mortes relatadas, sendo o câncer de traqueia, brônquios e pulmões o mais frequente em homens e o câncer de mama em mulheres (INCA, 2018).

Figura 1. Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma.

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

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA, 2020.

A partir do diagnóstico, o tratamento é mais bem direcionado para uma boa resposta do paciente, sendo este baseado na localização do tumor e do seu grau de diferenciação. De acordo com o *National Cancer Institute* os procedimentos terapêuticos mais comuns são, a cirurgia, quimioterapia, imunoterapia, medicina nuclear e a radioterapia que podem ser empregados de forma isolada ou concomitantemente. Além destes tratamentos, ainda existem outras opções como, terapias fotodinâmicas, transplante de medula (em casos de tumores do tecido hematopoiético), entre outros. Diferenças biológicas do tecido normal e do tumoral tornam a terapia do câncer uma tarefa multidisciplinar. A terapia direcionada baseada em diferentes tipos de tumores, visando maximizar a eficácia no tumor e minimizar a toxicidade nos tecidos circunvizinhos, permanece extremamente desafiadora (MITRA et al., 2015).

A cirurgia, juntamente com a quimioterapia e a radioterapia, forma o tripé da base do tratamento oncológico, tendo sua indicação, várias finalidades no decorrer do curso do tratamento de um paciente. Inicialmente, pode ser realizado para efeito diagnóstico, na retirada de uma parte do tumor para biópsia; no estadiamento, onde o médico poderá avaliar o grau do tumor e se já possui metástase, e; curativa, quando o tumor é retirado por completo e há a probabilidade de cura do câncer (GABRIEL LEE, et al., 2017).

A maioria dos quimioterápicos citotóxicos e citostáticos, atuam de forma inespecíficas, provocando lesões tanto em células malignas quanto em células normais (MITRA, et al., 2015). Essas drogas atuam baseadas no conceito da cinética celular, que envolve: o ciclo de vida celular, o tempo do ciclo, a fração de crescimento (SCHULZE, 2007). Atualmente, muitos estudos estão voltados para a terapia alvo-molecular, onde há um direcionamento da ação das drogas a moléculas específicas. O Imatinib, por exemplo, é um inibidor de tirosina quinase de primeira geração (TKI), utilizado com sucesso no tratamento da leucemia mieloide crônica, onde muitos pacientes não necessitam mais do transplante de células-tronco (SHIMADA, 2019).

Na imunoterapia são utilizadas drogas que podem manipular constituintes do sistema imunológico e métodos capazes de modificar geneticamente linfócitos T de pacientes para reconhecer e atacar seus próprios tumores (KELLY, 2018). Um exemplo da técnica, é a utilização de anticorpos monoclonais que conseguem bloquear a ligação do receptor inibitório PD-1 com o seu ligante PDL-1, tendo sido aprovado pela FDA, para ter seu uso em diversos tipos de tumores (ZITVOGEL, et al., 2018). É uma terapia que vem revolucionando o tratamento do câncer no mundo e aumentando consideravelmente o tempo de sobrevivência dos pacientes (SANTINI et al., 2018).

Na medicina nuclear, o termo teranóstico vem sendo bastante empregado, onde há a utilização da mesma molécula ou moléculas similares marcadas com radiomarcadores diferentes, para o diagnóstico e o tratamento de uma doença específica (DRUDE et al., 2017). Tendo como prever o impacto terapêutico no tumor, o princípio teranóstico ganhou valor na terapia personalizada, principalmente no ramo da oncologia, onde os tumores podem ser tratados com baixos efeitos colaterais ao paciente (LANGBEIN et al., 2019).

A radioterapia, tem como principal finalidade expor o tumor às radiações ionizantes, produzindo danos irreversíveis ao DNA que causem a morte de células tumorais, diminuindo sua clonogenicidade até sua total eliminação (REE e REDALEN, 2015).

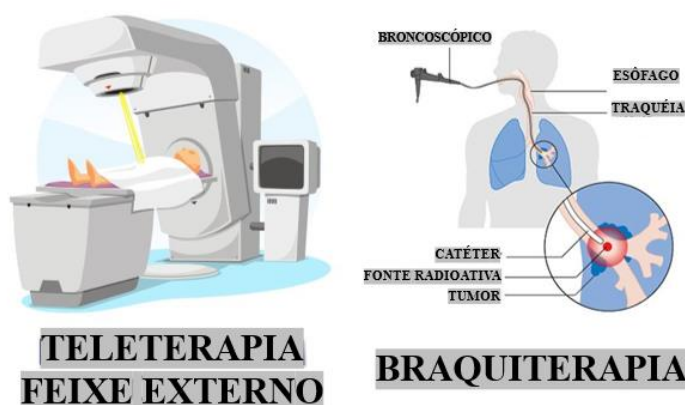
2.2 RADIOTERAPIA

Desde a descoberta dos Raios X, por Wilhelm Conrad Röntgen em 1895, o uso das radiações ionizantes foi seguido de grande avanço na clínica médica, inicialmente foi amplamente utilizado no diagnóstico por imagem e em seguida teve sua utilização ampliada também no tratamento oncológico (ALLEN; HER; JAFFRAY, 2017). A radioterapia é aplicada tendo como objetivo alcançar um índice terapêutico favorável, levando as células neoplásicas a perderem sua clonogenicidade e preservando os tecidos saudáveis adjacentes ao tumor (INCA, 2019).

A radioterapia pode ser aplicada posicionando a fonte de radiação externamente (teleterapia) e internamente (braquiterapia) (Figura 2). A técnica mais comumente utilizada é a teleterapia com emissão de fótons, na qual o paciente é exposto à uma dose de radiação proveniente de fonte de radiação (gama ou Raios-X) posicionada fora e a uma certa distância do corpo do paciente. As modalidades de teleterapia incluem a 2D (convencional ou bidimensional), 3D (conformacional ou tridimensional), a radiocirurgia de dose única, estereotáxica fracionada, a IMRT (radioterapia com intensidade modulada do feixe) e a radioterapia intra-operatória (LOPES, CHAMMAS e IYAYASU, 2013). Ao paciente, são administradas doses de radiação, que são estabelecidas de acordo com o tipo e estadiamento do tumor, seguindo um protocolo. Esta dose de radiação é denominada de Dose Absorvida, que é definida pela energia média (E) depositada pela radiação em um volume elementar de matéria de massa (dm), sendo expressa em gray (Gy) ($1 \text{ Gy} = 1 \text{ J} / \text{Kg}$) (ICRP 60, 1990).

A teleterapia é comumente utilizada no tratamento do câncer de pulmão, de cabeça e pescoço, de melanomas, entres outros (RAGHAVAN et al., 2016; MERNA et al., 2016; KALIKI, SHIELDS, 2016).

Figura 2. Tipos de radioterapia: teleterapia e braquiterapia.



Fonte: (Online - <https://www.iaea.org/newscenter/multimedia/photoessays/world-cancer-day-safe-cancer-treatment-with-radiotherapy>)

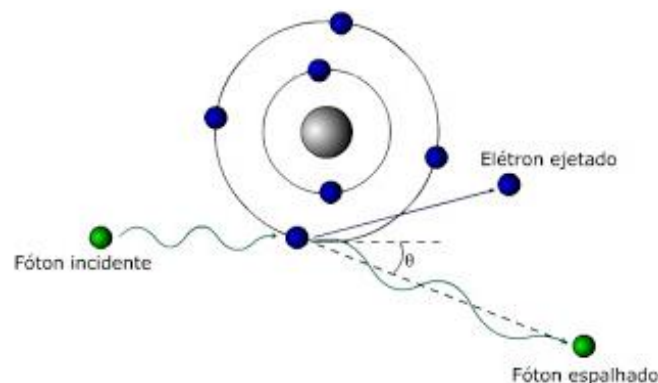
A braquiterapia utiliza fontes de radiação posicionadas interna e/ou inseridas o mais próximo do tumor, através de implante ou injeção intravenosa. Na clínica, ela pode ser dividida em três tipos principais de acordo com a taxa de dose de radiação: baixa taxa de dose, alta taxa de dose e taxa de dose pulsada. Adicionalmente, de acordo com a duração do isótopo radioativo na área alvo, a braquiterapia compreende duas categorias: braquiterapia permanente e braquiterapia temporária (TANDERUP; MÉNARD; POLGAR; LINDEGAARD; KIRISITS; PÖTTER, 2017). A radioterapia preferencialmente afeta as células cancerígenas que se dividem rapidamente, sendo essas mais sensíveis que as saudáveis. Atualmente, o iodo-125 é o radioisótopo mais usado na braquiterapia. A braquiterapia é frequentemente utilizada no tratamento de tumores de próstata, colo do útero, mama, endométrio, esôfago, pulmão e vários outros (DENG, et al., 2017).

Com o avanço da tecnologia, a radioterapia moderna é favorecida por técnicas mais precisas que atendem a pré-requisitos essenciais para uma melhor eficácia do tratamento permitindo o fracionamento da dose individualizada, delineamento ideal do alvo e orientação por imagem, como por exemplo, na Radioterapia com Intensidade Modulada (IMRT), Radioterapia Guiada por Imagem (IGRT) e Radiocirurgia Estereotática (OWADALLY e STAFFURTH 2015) (ORTH, et al., 2014).

2.3 EFEITOS BIOLÓGICOS DAS RADIAÇÕES IONIZANTES

A radiação é qualquer propagação de energia através do espaço (vácuo) ou matéria, sendo normalmente dividida em dois grupos: corpusculares e eletromagnéticas. A radiação corpuscular, propagada através de partículas; já na radiação eletromagnética, não há necessidade de um meio material para sua propagação, na qual se encaixa a radiação ionizante, utilizada na radioterapia (SCAFF, 1997). Além da radiação eletromagnética, na radioterapia, também se utiliza a energia proveniente das partículas beta, prótons, entre outros. Há pelo menos quatro mecanismos de interações possíveis entre a radiação ionizante e a matéria, são eles: Efeito Rayleigh, Efeito Fotoelétrico, Efeito Compton e a produção de pares elétron-pósitron. O efeito Compton é a interação mais comum na faixa dos raios X e Gama, correspondendo a um espalhamento de um fóton por uma partícula carregada em uma faixa de energia maior ao efeito fotoelétrico. Consequentemente, há uma diminuição da energia do fóton e a criação de inúmeras ionizações por ejeção de elétrons (Figura 3), (SÁ, et al., 2017).

Figura 3. Efeito Compton.

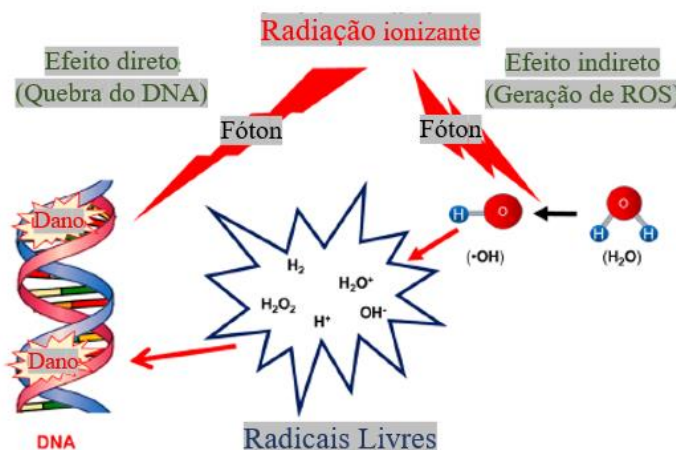


Fonte: http://blogtecrad.blogspot.com/2010_08_17_archive.html

O principal alvo celular da radiação é a molécula do DNA, essa interação pode acontecer de forma: direta ou indireta (PALLACIOS, et al., 2013). Os efeitos diretos da radiação, ocorrem com menos frequência, e de forma que a radiação danifica diretamente a molécula de DNA. Na sua forma de interagir indiretamente com a matéria, a radiação interage com moléculas e os produtos resultantes dessa interação são os que ocasionarão os danos ao DNA. Dentre os efeitos indiretos, a radiólise da água é a mais comumente ocasionada. Ao ser

irradiada, a molécula da água é quebrada resultando na formação de radicais livres, espécies reativas de oxigênio (ROS) e peróxido de hidrogênio, que são tóxicos à molécula do DNA (GAUBEUR, et al., 2015). A Figura 4 apresenta de forma esquemática os efeitos diretos e indiretos (radiólise da água) da radiação ionizante.

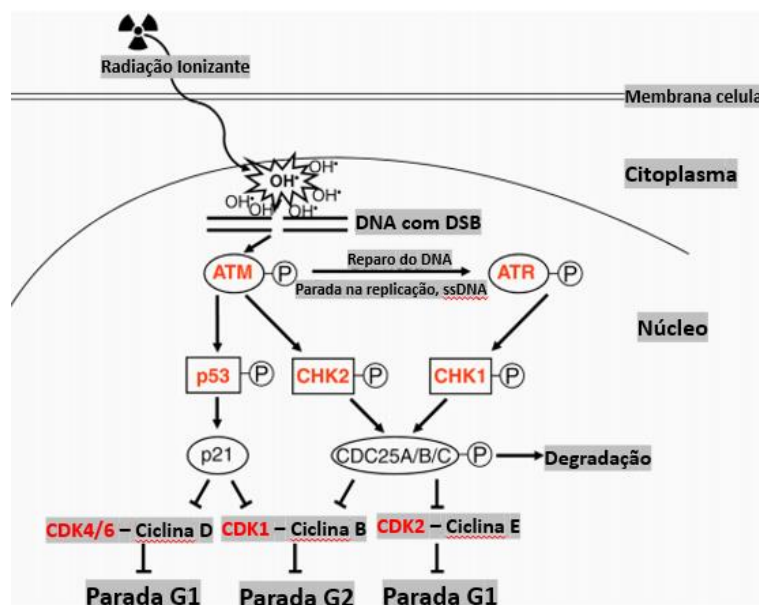
Figura 4. Efeitos diretos e indiretos da radiação ionizante na célula.



Fonte: Adaptado de MUN, et al., 2018

Após a interação da radiação com a molécula do DNA, quinases iniciadoras detectam o dano ao DNA e geram uma resposta automática, ativando várias proteínas jusantes. As quinases conhecidas por essa resposta são a Ataxia- Telangiectasia Mutada (ATM) e Ataxia-Telangiectasia relacionada à RAD3 (ATR). A ATM é a principal reguladora das quebras de dupla fita induzidos pela radiação ionizante, enquanto a ATR está mais relacionada à quebra da fita simples do DNA (MAIER, et al., 2015). Após essa detecção, a ATM é ativada por fosforilação, e por sua vez fosforilará a p53. A p53 ativada atuará como um fator de transcrição, estimulando a p21, um inibidor da quinase dependente de ciclina, o CDK4/6 e o CDK1, a parar o ciclo celular nas fases G1 e G2, respectivamente. Por outro lado, a ativação dos Checkpoints em G1 e G2 leva a fosforilação das isoformas do CDC25, resultando em sua degradação. Com isso o CDC25 não ativa mais o CDK2 e o CDK1, interrompendo o ciclo celular nas fases G1 e G2 (Figura 5) (MAIER, et al., 2016; KOPP, et al., 2019).

Figura 5. Cascata de eventos do ciclo celular após interação com a radiação ionizante.



(OH+: radical hidroxila; DNA com DSB: quebra da dupla fita do DNA; ATM: quinase ataxia-telangiectasia mutada; P: fosforilação; ATR: ataxia-telangiectasia relacionada a RAD3; CDK: inibidor dependente de ciclina; CHK: checkpoints.) Fonte: MAIER, et al., 2016

O número de danos no DNA produzidos por 1 Gy de radiação ionizante, por exemplo, é significativamente menor do que as produzidas por processos endógenos do metabolismo celular, por dia. O que torna a radiação ionizante única é sua eficiência na indução dessas lesões de DNA em agrupamentos, que são definidas como duas ou mais lesões em uma ou nas duas fitas da cadeia da molécula do DNA, em uma frequência biologicamente relevante devido à vários eventos de alta deposição de energia em um mesmo espaço e tempo (HILL, 2019).

Ao nível tecidual, os danos causados pela radiação são comumente classificados pelo tempo do surgimento das manifestações clínicas, podendo ser agudos e tardios (KHALIFA et al., 2019). Efeitos biológicos agudos são aqueles observados no indivíduo durante ou logo após o término da irradiação. A mucosite, xerostomia, radiodermite e a fadiga estão entre as principais manifestações clínicas dessa fase (GUSSGARD et al., 2015) (BOCKEL et al., 2018). Causados pela persistência ou agravamento dos danos agudos, os efeitos biológicos tardios surgem após meses ou anos após a exposição à radiação, vale ressaltar que, além disso, a localização tumoral também é fator importante para o surgimento dessas manifestações, que podem ser desde síndromes hematológicas, pneumonites e fibrose

pulmonar, danos gastrointestinais até o surgimento de neoplasias secundárias (DAVIS et al., 2014) (OMARINI et al., 2014) (KUBEŁ et al., 2014) (ARENDS, 2018).

2.3.1 Efeitos das radiações ionizantes no sistema imunológico

As citocinas são pequenas moléculas de proteínas, peptídeos ou glicoproteínas, produzidas como fatores solúveis por células do sistema imunológico, células endoteliais e epiteliais. Elas estão envolvidas na maioria das respostas de estímulos de imunidade, infecção e inflamação. Diversos são os agentes que podem ocasionar o processo inflamatório, dentre eles a radiação ionizante. Portanto, os efeitos diretos e indiretos da radioterapia podem desencadear uma cascata de sinalização inflamatória de citocinas e recrutamento de células imunes (por exemplo, pela expressão de células endoteliais da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), molécula de adesão celular 1 (VCAM-1). Esses eventos são principalmente coordenados pelas ações intracelulares das espécies reativas de oxigênio (ROS) e NF- κ B. As ROS também afetam as vias de sinalização do TNF e podem ativar o NF- κ B, levando a uma produção adicional do TNF- α . Além disso, essas alterações podem causar supressão da defesa antioxidante das células, levando a mais estresse oxidativo, quebras das fitas do DNA e morte celular.

Em resposta à radiação ionizante, as células do sistema imunológico, como linfócitos e macrófagos, aumentam a liberação dos níveis de citocinas, dentre elas a Interleucina-1 beta (IL-1 β), IL-1, Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), IL-2, IL-10, Interferon gama (IFN- γ) e Fator de Crescimento Transformador- β (TGF- β), dando origem a uma resposta inflamatória (FARDID, et al., 2019) (MARCONI, et al., 2019). Sabe-se que essa reação aguda inespecífica ocorre de 4 a 24 horas após a irradiação e é diminuída a níveis basais dentro de um período de 24 horas a alguns dias (LIEROVA et al., 2018).

A ativação do TGF- β parece ser precoce e persistente em tecidos que foram expostos a diferentes doses de radiação, ele desempenha um papel importante na regulação da resposta dos tecidos ao dano (BARCELLOS-HOFF, et al., 2005). Além disso, o TGF- β é um importante medidor na fisiopatologia da toxicidade da radiação, principalmente no que se refere a fibrose induzida pela radiação nos pulmões e na pele (HALL, et al., 2016). O papel da IL-6 é bastante discutido quando envolve a pneumonite por radiação, há estudos que sugerem que seus níveis, quando aumentados no pré-tratamento por radiação, indicam uma predição ao paciente desenvolver a pneumonite (LIEROVA et al., 2018). TNF, IL-8 e IL-1 bem como

outras citocinas pró-inflamatórias têm sido relacionados a dermatite e ao processo fibrótico de tecidos, radioinduzidos (NAJAFI et al., 2018).

Após danos no DNA e morte celular radioinduzidos, as células danificadas liberam sinais de alerta, que são reconhecidos por macrófagos e linfócitos, levando a várias vias de sinalização envolvidas na inflamação, reparo do DNA e metabolismo redução/oxidação (REDOX). Esses processos estão associados a muitos radicais livres, bem como a um aumento no nível de várias citocinas e quimiocinas, como TNF- α , TGF β , IL-1, IL-4, IL-6, IL-8 e IL-13 (FARHOOD, et al., 2018).

Vale ressaltar que as respostas dos tecidos à irradiação são dependentes da dose de radiação. Quando o tecido é exposto a baixas doses de radiação (< 1Gy), geralmente o organismo reage produzindo citocinas anti-inflamatórias, o que pode levar a uma morte celular por apoptose, enquanto em doses maiores o resultado é o processo inflamatório, e por vezes levando a célula à necrose (YAHYAPOUR et al., 2018). Acredita-se que o processo de apoptose pode levar a liberação de citocinas anti-inflamatórias, como o IL-10 e TGF β , e quando há morte por necrose, o organismo libera citocinas inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF (YAHYAPOUR et al., 2018).

2.4 DROGAS RADIOPROTETORAS

Agentes radioprotetores podem ser definidos como toda molécula aplicada antes, durante ou depois da exposição à radiação capaz de proteger o indivíduo de seus efeitos deletérios. Tais moléculas podem ser subdivididas em três categorias: radioprotetoras ou profiláticas, utilizadas antes da realização da exposição à radiação; as mitigadoras, utilizadas durante ou depois da exposição, visando a redução dos danos por ela gerados e consequentemente o possível aparecimento dos efeitos colaterais; e os agentes terapêuticos utilizados no tratamentos dos efeitos adversos causados pela radiação, visando revertê-los (KUNTIÉ, et al., 2013).

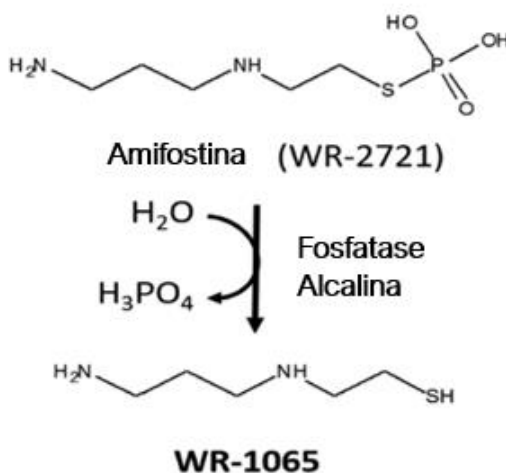
Os agentes radioprotetores, podem ainda, ser classificadas de acordo com o seu mecanismo de ação, podendo ser inibidores da peroxidação lipídica; indutores de quimiocinas e interleucinas; e, antioxidantes, reparando o dano através da eliminação de radicais livres, sendo esse o mecanismo de ação mais comum (MISHRA; ALSBEIH, 2017). Além disso, podem ser sintéticos, desenvolvido em laboratórios, ou ainda produto de derivados naturais, como a Zingerone, um composto ativo fenólico encontrado no gengibre (RAO, et al., 2011) e

a Hesperidina, que é o principal flavonóide encontrado na laranja e limão (REZAEYAN et al., 2016). Esses compostos parecem desempenhar um mecanismo de ação na eliminação dos radicais livres, no entanto, estudos ainda precisam ser feitos para tal confirmação.

Apesar dos esforços na busca de novas moléculas que exerçam a função de radioproteção, poucas são reconhecidas, e até o momento a Amifostina (WR-2721) é a única aprovada pela FDA (FOSTER-NORA; SIDEN, 1997) e regulamentada no Brasil pela ANVISA. A Amifostina é indicada de forma limitada nas seguintes situações: redução da toxicidade renal para pacientes em tratamento de câncer de ovário com uso de cisplatina; e redução de episódios de xerostomia em pacientes com câncer de cabeça e pescoço em tratamento radioterápico (CHEEMA et al., 2019).

A estrutura química da Amifostina consiste em um aminotiol e sua forma ativa fosforilada é denominada WR-1065 (Figura 6) (ARSLAN; SEVERCAN, 2019). Acredita-se que o domínio radioprotetor dessa classe possa ser seu núcleo químico hidrofílico, contendo um grupo sulfidril, protegido por fosfato e ligado por dois ou três carbonos a pelo menos um ou dois grupos aminos. Os efeitos colaterais causados pela Amifostina são atribuídos ao comprimento e natureza terminal do grupo alminoalquil e sua hidrofobicidade (VASIN, 2014). Apesar de sua regulamentação e seu uso na clínica, a Amifostina, mesmo em doses muito baixas, induz efeitos colaterais sistêmicos, como: náuseas, vômitos e hipotensão arterial, o que restringe sua utilização (VARGHESE et al., 2018).

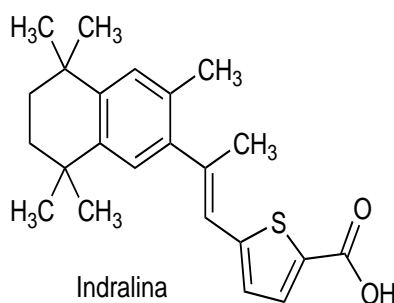
Figura 6. Estrutura química da Amifostina e via de formação do seu metabólito primário (WR-1065).



Fonte: Adaptado de SIMON et al., 2018.

A Indralina (B-190) é um $\alpha 1$ - adrenérgico direto, classificado como um radioprotetor indireto. Possui um efeito vasoconstritor, sendo capaz de diminuir o consumo de oxigênio no organismo, resultando em hipóxia aguda em tecidos radiosensíveis, suficientes para o aumento da radioresistência (Figura 7). Em vários estudos em animais, teve grande eficácia radioprotetora no processo hematopoiético, protegendo células-tronco na medula óssea e baço, permitindo uma rápida recuperação sanguínea pós-irradiação (VASIN et al., 2014). Além de seu papel na radioproteção do sistema sanguíneo, a Indralina demonstrou eficácia na redução de lesões nas glândulas salivares causadas por radiação (VASIN, et al., 2004).

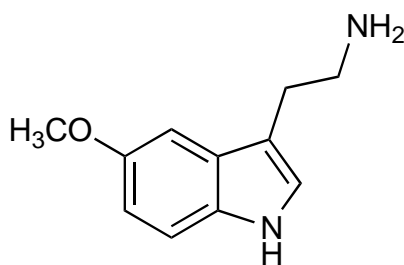
Figura 7. Estrutura química da Indralina.



Fonte: Autor.

A Mexamina (5- Metoxitriptamina) (Figura 8) é um derivado relacionado aos neurotransmissores serotonina e melatonina, sendo biossintetizado através da desacetilação da melatonina na glândula pineal, estando em níveis baixos no organismo e tendo uma boa atividade antioxidante, bem como seu precursor. (GOH et al., 2015) (MISHRA; ALSBEIH, 2017). A mexamina foi avaliada juntamente com outras aminas biogênicas quanto ao seu potencial radioprotetor em animais de grande porte. Os resultados demonstraram atividade associada ao aumento da radiorresistência celular devido à baixa tensão aguda de oxigênio (VASIN; USHAKOV, 2014).

Figura 8. Estrutura química da Mexamina.



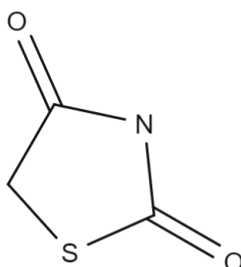
Fonte: Li et al., 2016.

Diante do exposto, fica evidente a falta de moléculas que sejam alternativas na proteção contra a radiação, principalmente no tratamento radioterápico. Com isso, a necessidade de novos estudos para encontrar e/ou desenvolver novas drogas que possam atuar com essa finalidade, trazendo qualidade de vida aos pacientes em tratamento.

2.5 TIAZOLIDINEDIONAS

As tiazolidinas – 2,4-dionas (TZDs) são compostos sintéticos heterocíclicos derivados de um tiazol formado por três átomos de carbono, um átomo de nitrogênio e um átomo de enxofre com dois átomos de oxigênio (Figura 9). Quando combinado a outros anéis heterocíclicos, produz uma gama de atividades biológicas, que representam alternativas na busca de medicamentos, com potencial antineoplásico (RODRIGUES et al., 2018) (QI et al., 2019), antibacteriano (SUCHETA et al., 2018) (TROTSKO et al., 2018), hipoglicêmico (HIDALGO-FIGUEROA et al., 2013) (NAIM et al., 2017) (KUMAR et al., 2018) e anti-inflamatório (BARI et al., 2019).

Figura 9. Estrutura molecular da Tiazolidina-2,4-diona.



Fonte: (Online - <http://molview.org/?cid=5437>)

As TZDs também chamam atenção por seu agonismo com os Receptores Ativadores da Proliferação de Peroxissomos- γ (PPAR γ), membro da superfamília de receptores nucleares ativada por ligantes de fatores de transcrição, que exercem papel importante na regulação de diversas reações bioquímicas (FAINE et al., 2011). Após sua ativação, seja por ligantes sintéticos como TZDs ou endógenos, o PPAR- γ forma um heterodímero com o receptor retinóide X (RXR) e se liga aos elementos de resposta PPAR que regulam a transcrição de genes-alvo selecionados (BLANQUICETT et al., 2008).

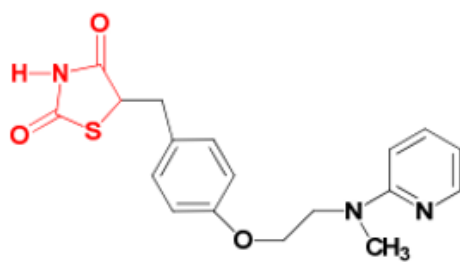
Por conta das suas propriedades anti-inflamatória, anti-fibrótica e antioxidante, as TZDs têm sido investigadas para utilização no tratamento ou prevenção dos danos causados

pela radiação ionizante (BOZDAĞ-DÜNDAR et al., 2011) (BERCZYNSKI et al., 2014). Sua atividade radioprotetora foi relatada pela primeira vez por Farmer, Leung e Lui em 1973. Esses autores testaram derivados tiazolidínicos em camundongos e foi observado que após sua administração e exposição à radiação, a taxa de sobrevivência dos animais aumentou e os tumores foram eliminados da mesma forma que nos animais não tratados.

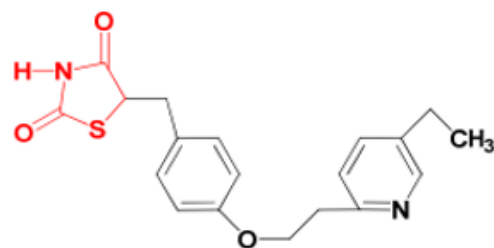
A rosiglitazona (RGZ), é um derivado tiazolidínico, tem demonstrado aspectos promissores enquanto molécula radioprotetora (Figura 10). Em experimentos de irradiação de tumores torácicos, observou-se a redução acentuada da extensão e gravidade da lesão pulmonar induzida pela radiação em camundongos C57BL (MANGONI et al., 2015). A lesão por radiação do trato gastrointestinal também é considerada crítica, pois conduz o paciente da má absorção a obstrução intestinal. Um estudo demonstrou que essa tiazolidina reduziu a expressão do marcador de fibrose TGF-B e a fosforilação da subunidade p65 do NF-KB, revertendo alterações inflamatórias e apoptóticas induzidas pela radiação, em um modelo utilizando camundongos e células de câncer de cólon (HT-29) xenoenxertadas (MANGONI et al., 2016).

O comprometimento cognitivo progressivo ocorre em aproximadamente metade dos pacientes que são submetidos à radioterapia em tumores cerebrais. A partir de ensaios nos quais camundongos foram tratados com tiazolidinas e expostos à radiação e através de testes de reconhecimento e análises bioquímicas, foi relatado que os animais tratados tiveram um desempenho semelhante aos controles saudáveis, com redução do comprometimento cognitivo (ZHAO et al., 2007). A Pioglitazona (Figura 10), outro membro da família das tiazolidinas, foi utilizada em um ensaio em fase clínica, no qual 18 pacientes diagnosticados com tumores cerebrais, foram submetidos à radioterapia e quimioterapia, associados ou não ao tratamento com Pioglitazona. A maioria dos pacientes acompanhados não apresentaram sintomas de declínio cognitivo induzido pela radiação, comprovando mais uma vez o papel citoprotetor da tiazolidina nesse estudo (CRAMER et al., 2018).

Figura 10. Estrutura química das moléculas de Rosiglitazona e Pioglitazona, respectivamente. Em destaque, o anel tiazolidínico.



Rosiglitazona



Pioglitazona

Fonte: [online] <http://www.info-farmacia.com/medico-farmaceuticos/informes-tecnicos/avandia-versus-actos-rosiglitazona-vs-pioglitazona>

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel radioprotetor de novos derivados tiazolidínicos.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

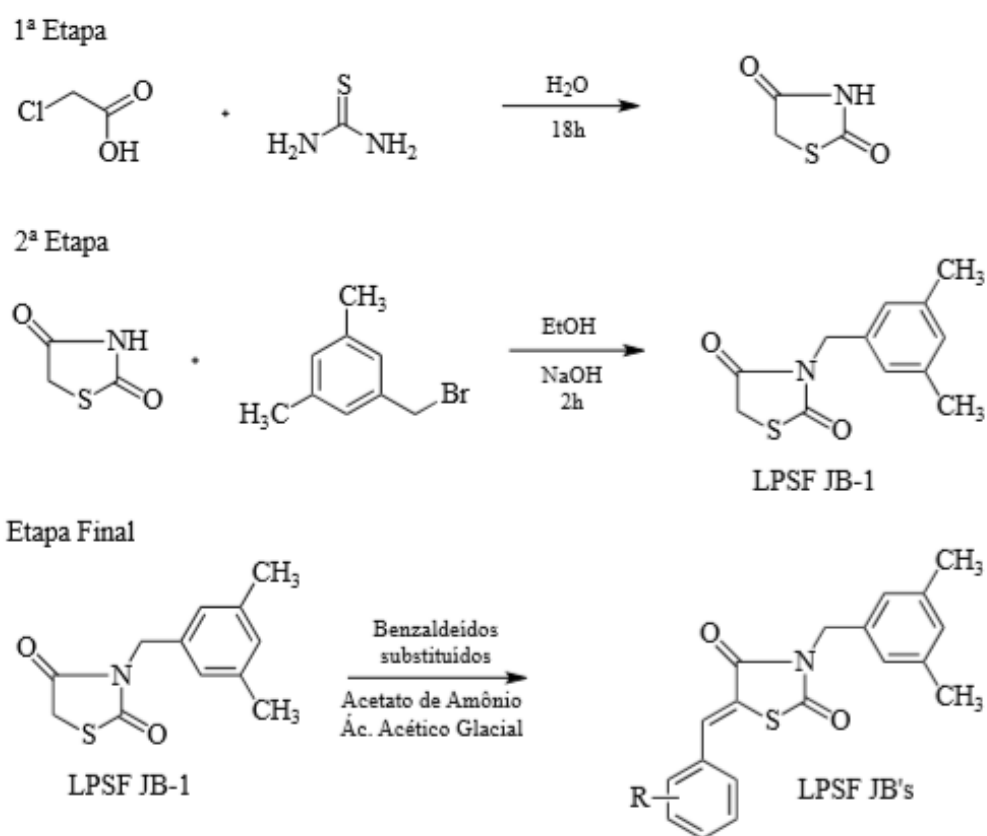
- Analisar a citotoxicidade de novos derivados tiazolidínicos em células mononucleadas do sangue periférico;
- Comparar o efeito inibidor dos novos derivados tiazolidínicos na modulação da produção de citocinas do perfil inflamatório, por células mononucleares irradiadas e não irradiadas;
- Avaliar o efeito dos novos derivados tiazolidínicos sobre os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células mononucleares irradiadas e não irradiadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DERIVADOS TIAZOLIDÍNICOS

A principal rota de obtenção dos novos derivados tiazolidínicos é constituída por três etapas: a primeira delas compreende a síntese do anel de Tiazolidina-2,4-diona (TZD) através do processo de ciclização entre o ácido monocloroacético e a uréia diluídos em água; na segunda etapa foi realizada uma N-alquilação da TZD pelo brometo de 3,5-dimetilbenzila para formar o intermediário 3-(3,5-dimetilbenzil)tiazolidina-2,4-diona (LPSF/JB-1); e na última etapa é realizada uma condensação de Knoevenagel entre os aldeídos aromáticos substituídos e o LPSF/JB 1 para formação dos compostos finais (Figura 11).

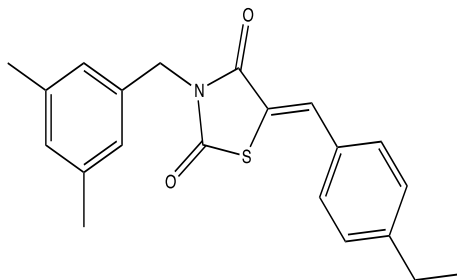
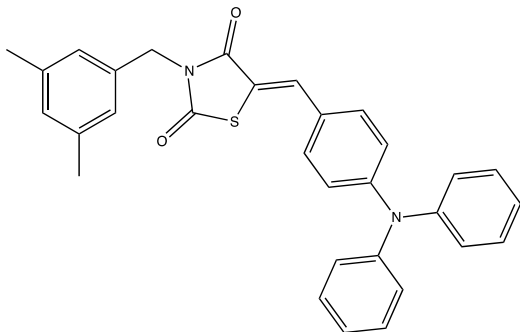
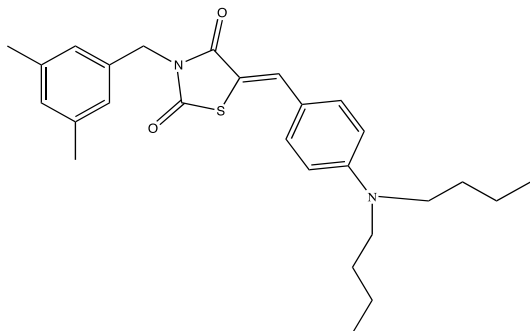
Figura 11. Rota de síntese dos derivados tiazolidínicos em três etapas.

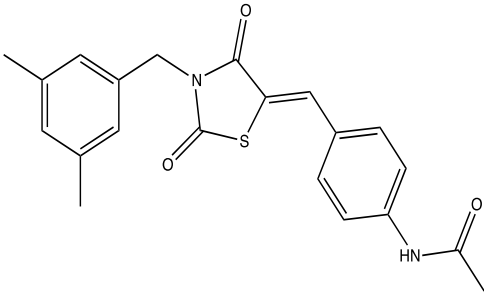
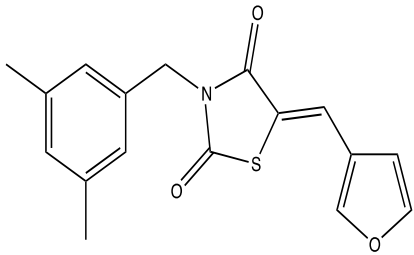
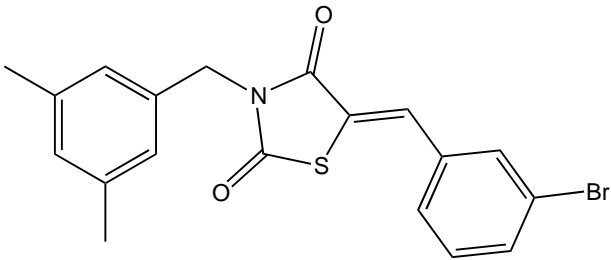
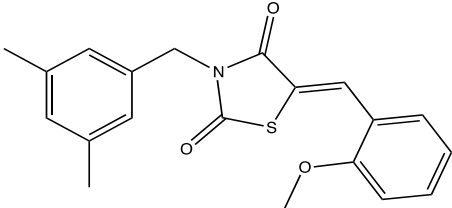
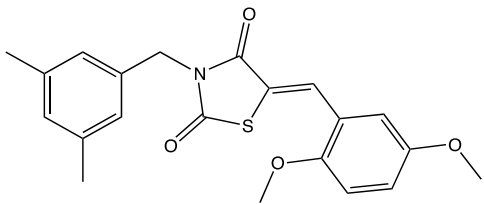


Fonte: Síntese realizada no Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos – trabalho ainda não publicado.

Os compostos avaliados foram sintetizados pelo Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos – UFPE, foram escolhidos baseados em sua estrutura molecular, onde seus radicais podem atuar de forma análoga aos agentes radioprotetores já disponíveis na clínica, como a amifostina. (Tabela 1). As características físico-químicas dos derivados tiazolidínicos estão descritas na Tabela 2.

Tabela 1. Estrutura molecular dos derivados tiazolidínicos avaliados, com substituições feitas no C5.

Código	Estrutura química	Radical
JB 10		3,5-CH ₃
JB 16		4-N(C ₆ H ₅) ₂
JB 17		4-N(C ₄ H ₉) ₂

JB 18		4-NH(CO)CH ₃
JB 19		C ₄ H ₄ O
JB 23		3-Br
JB 24		2-OCH ₃
JB 25		2,5-OCH ₃

Fonte: Síntese realizada no Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos – trabalho ainda não publicado.

Tabela 2. Características físico-químicas dos compostos

Código	PM (g/mol)	Cristal	Pureza (%)	Ponto de Fusão (°C)	Rendimento (%)
JB-10	351,13	Branca	98,5	175,9	43,50
JB-16	490,62	Amarelo	100	145,2	39,80
JB-17	450,23	Amarelo	100	106,9	48,70
JB-18	380,02	Branco	97,7	259,5	74,50
JB-19	313,07	Marrom	97,3	172,3	52,40
JB-23	401,01	Branco	100	249,3	32,48
JB-24	353,11	Branco	98,91	200,2	60,41
JB-25	383,12	Amarelo	100	266,3	63,63

Fonte: Síntese realizada no Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos – trabalho ainda não publicado.

4.2 ANÁLISE *IN SILICO* – REGRA DE CINCO DE LIPINSKI

Para a análise do perfil de absorção, distribuição, metabolismo e excreção foi utilizada a ferramenta computacional *online*, SwissADME (Disponível em: <http://www.swissadme.ch/>), para estimar as propriedades físico-químicas, farmacocinética, semelhança entre drogas e sua biodisponibilidade. Para isso, a regra dos cinco de Lipinski é aplicada relacionando os parâmetros farmacocinéticos e propriedades físico-químicos (DAINA et al., 2017).

Segundo a regra de Lipinski para uma boa biodisponibilidade oral, as drogas devem apresentar peso molecular menor ou igual a 500, valor ideal do Log de P deve ser menor ou igual a 5, possuir até 5 grupos de doadores de ligação de hidrogênio e até 10 aceptores de ligações de hidrogênio (LIPINSKI et al., 2001). Os valores referentes ao peso molecular (PM), aceptores de ligação hidrogênio, doadores de ligação hidrogênio, número de ligações rotáveis, área de superfície polar topológica e Log de P encontrados foram obtidos a partir da plataforma SwissADME. Além disso, também foram avaliadas mais duas propriedades físico-químicas (disponibilidade oral = TPSA <140 e menos que 10 ligações rotáveis).

4.3 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Para cada ensaio, os indivíduos envolvidos foram orientados sobre os objetivos do estudo e triados de acordo com os critérios de inclusão e exclusão, descritos no item posterior

(4.2). Após os esclarecimentos e a seleção, quando em consonância com os objetivos do trabalho, os indivíduos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE (Anexo 2), todos os dados de identificação pessoal são mantidos sob sigilo.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), conforme parecer CEP (Anexo 1) de número 3.035.109, emitido em 23 de novembro de 2018.

4.4 TIPO E CRITÉRIO DO ESTUDO

Este estudo foi do tipo experimental *in vitro* e translacional. Amostras de sangue periférico foram coletadas de 15 indivíduos com faixa etária entre 18 e 40 anos, obedecendo aos seguintes critérios de inclusão e exclusão:

4.4.1 Critérios de inclusão

- Indivíduos que se declarem clinicamente saudáveis;
- Indivíduos que assinem o TCLE;
- Indivíduos com idade ≥ 18 anos.

4.4.2 Critérios de exclusão

- Ter consumido álcool nas 72 horas anteriores a coleta;
- Ter declarado estar fazendo uso de algum medicamento que interfira no processo inflamatório (ex.: anti-inflamatórios e antibióticos);
- Ter se submetido a exame radiológico ou de medicina nuclear na última semana;
- Ter se submetido à radioterapia no último semestre.

4.5 COLETA DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Foram coletados 18mL de sangue periférico em dois tubos (9mL cada) contendo heparina sódica, utilizando sistema a vácuo, obedecendo a procedimentos de biossegurança e boas práticas de laboratório. As amostras de sangue total foram coletadas de voluntários que atenderam aos critérios de elegibilidade e assinaram o Termo de Consentimento Livre e

Esclarecido, no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT). Em seguida, foram levadas para os devidos procedimentos de processamento e cultura.

4.6 OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES

Para obtenção das células mononucleares (*PBMC – Peripheral Blood Mononuclear Cells*) todas as amostras foram individualmente e cuidadosamente identificadas. Em tubos falcon de 50mL foi adicionado 15mL de Ficoll- Paque Plus (densidade = $1,077 \pm 0,001 \text{ g.m.L}^{-1}$), sobreposto do volume total de sangue de cada indivíduo. Em seguida, todo o material biológico foi centrifugado a 700G, por 20 minutos à temperatura ambiente (TA). Após a centrifugação, as frações do sangue foram separadas por sedimentação de acordo com a densidade, possibilitando a obtenção da camada de *PBMCs* para posteriores lavagens.

As células aspiradas, foram lavadas com tampão fosfato-salino (pH = 7,2-7,4), centrifugadas a 350G, aceleração 6 e freio 4 por 15 minutos, TA. Uma segunda lavagem com os mesmos parâmetros foi realizada com o propósito de retirar quaisquer resíduos de Ficoll das células. O *pellet* foi ressuscendido em meio completo (RPMI 1640 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino, 1% de antibiótico (penicilina-estreptomicina) e contado em câmara de Neubauer para posterior diluição e plaqueamento.

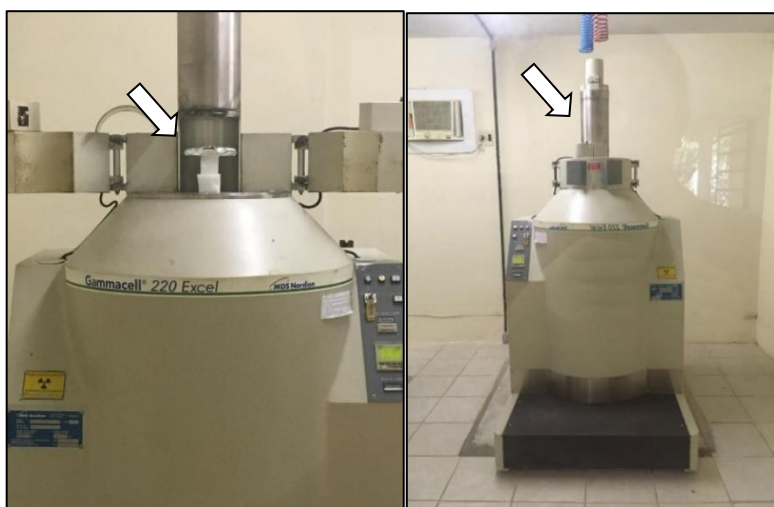
Para utilização nas culturas de células mononucleares, os compostos foram dissolvidos em DMSO de modo a obter uma solução mãe de 50mM. As diluições mais baixas a partir da solução mãe foram feitas diretamente no meio de cultura. A concentração final de DMSO, em todos os testes, incluindo os controles foi de até 0,2%.

4.7 PROCESSO DE IRRADIAÇÃO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Após a obtenção das células mononucleadas e o plaqueamento em suas respectivas condições, as amostras foram irradiadas *in vitro* à temperatura ambiente (TA) no Departamento de Energia Nuclear, Universidade Federal de Pernambuco (DEN/UFPE). As placas contendo as *PBMCs* foram irradiadas com uma dose 2,5Gy (fracionamento de dose,

geralmente utilizada na clínica) de raios gama oriundos de uma fonte de Cobalto-60 de alta taxa de dose – (Gammacell 220 Excel) (1,772kGy/h). Na Figura 12 é possível observar o processo de irradiação e o equipamento utilizado.

Figura 12. Irradiação da placa de cultura no aparelho de Colbato-60, no Departamento de Energia Nuclear (DEN), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Seta na cor branca indicando o local da placa a ser irradiada.



Fonte: Autor

4.8 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DAS CÉLULAS MONONUCLEARES

O ensaio de citotoxicidade, para avaliação da toxicidade dos derivados tiazolidínicos, foi realizado *in vitro* em células a partir da cultura de PBMCs e quantificado pelo método MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazol) -2,5-difenil-2-H-brometo). Para tal estudo, 1×10^6 cél/ml de Meio RPMI suplementado com SFB foram semeadas em triplicata, nas seguintes condições:

- Controle não-tratado: apenas células;
- Condições tratadas: células + Derivados tiazolidínicos nas concentrações de 10, 50 e 100 μ M;
- Controle do veículo: células + DMSO à 0,1% e 0,2%.

Após 48 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C, foi adicionado à solução de MTT (sal de tetrazolium) 0,5mg/mL, e incubado por 3 horas na mesma temperatura. Em seguida, foi adicionado 120µL da solução de SDS 20% (Dodecil Sulfato de Sódio) para dissolução do precipitado. A absorbância foi lida em espectrofotômetro de placa a 570 nm, após 24 horas. Os resultados foram analisados em triplicatas a partir da média aritmética e desvio padrão e o cálculo da viabilidade foi realizado em relação ao controle tratado apenas com o veículo.

4.9 CBA (CITOMETRIC BEAD ARRAY)

A quantificação de citocinas foi realizada através da análise dos sobrenadantes das culturas de PBMCs pelo ensaio de CBA. As citocinas presentes foram detectadas utilizando o kit *Human Inflammatory Cytokine* (BD BIOSCIENCES, USA), seguindo as instruções do fabricante. Foram feitas as dosagens das citocinas IL-8, IL-1B, TNF, IL-10, IL-6 e IL-12p70, respeitando seus limites de detecção.

Para a preparação da solução de *beads* padrão, transferiu-se as *beads* (das seis citocinas) para tubo tipo Falcon de 15 mL. Em seguida, adicionou-se 2 mL do “*assay diluent*” e incubou-se por 20 minutos à TA. A partir desta solução fez-se diluição seriada (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256 e 1/512) a fim de obter uma curva contendo 11 pontos, onde a menor concentração (0 pg/mL) equivale ao tubo contendo apenas “*assay diluent*” e a maior concentração (5000 pg/mL) equivale à concentração contida no tubo da solução mãe. Enquanto aguardava-se o período de incubação, preparou-se o “*mixed capture beads*”, contendo os anticorpos de todas as citocinas a serem dosadas. Uma vez preparadas as soluções de trabalho, misturou-se 25 µL do “*mixed capture beads*”, 25 µL do standard ou da amostra teste e 25 µL do reagente de detecção, incubou-se por 3h à TA e abrigo da luz.

Decorridas as 3h, adicionou-se 200 µL de “*wash buffer*” e fez-se a aquisição de 10.000 eventos por amostra no citômetro de fluxo BD Accuri C6 Plus utilizando o software BD C6 Sampler (Becton, Dickinson and Company, USA). Para as análises das aquisições utilizou-se uma planilha criada no Excel, exclusivamente para este fim. Na tabela 2 pode-se conferir os limites de detecção para cada citocina do perfil inflamatório.

Tabela 3. Limite de detecção para citocinas do perfil inflamatório.

Citocina	Limite de detecção (pg/mL)
IL -8	3.6
IL- 1β	7.2

IL-6	2.5
IL-10	3.3
TNF	3.7
IL-12p70	1.9

4.10 DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS)

Após o tempo de cultivo de 48h, das amostras irradiadas e não irradiadas, as células foram retiradas e colocadas em tubos cônicos de 1,5mL (eppendorfs). Em seguida, os tubos foram centrifugados a 2800 RPM por 5 minutos à 4°C. Ao fim da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet resuspendido em 500 µL de PBS 1x gelado. Em sequência, foram adicionados 10 µL do marcador Dihidroetídio (DHE) na concentração 10 µM, à temperatura ambiente por 30 minutos. Os controles positivo e negativo utilizados foram o Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) (5mM) e a N-acetilcisteína (NAC) (5mM), respectivamente.

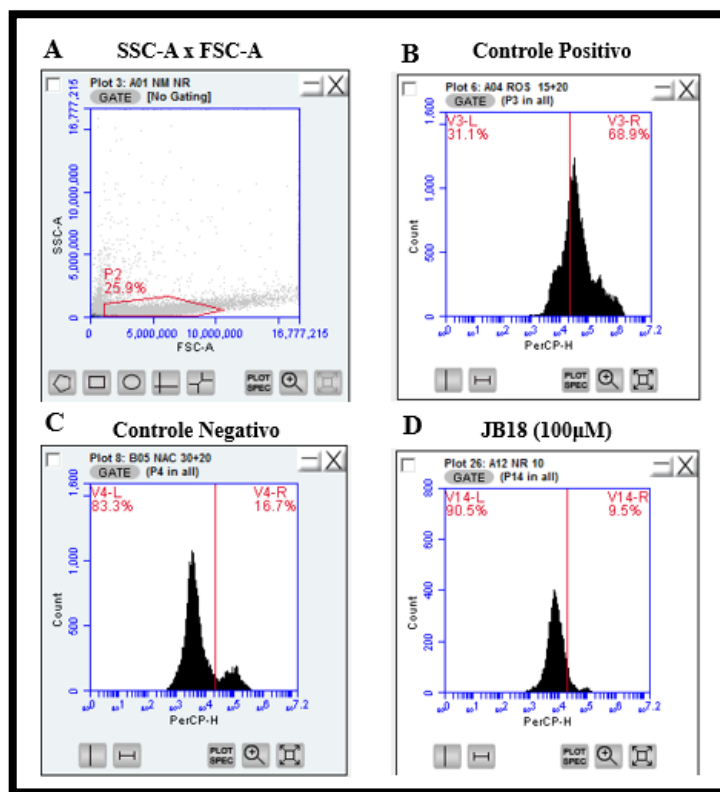
Passado o tempo de incubação, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo BD Accuri C6 Plus e fez-se a aquisição de 10.000 eventos por amostra utilizando o software BD C6 Sampler, e as análises foram efetuadas no software GraphPad PRISM 6.

Foram realizados três experimentos independentes na presença e ausência da radiação, nas seguintes condições:

- Controle não-tratado: apenas células;
- Condições tratadas: células + Derivados tiazolidínicos nas concentrações de 50 e 100µM;
- Células + metabólito ativo da Amifostina (WR-1065) na concentração de 50 µM.

Para análise do ROS, foi utilizada a mesma estratégia de *gate* na citometria para todos os compostos (Figura 13), onde foram selecionadas as populações de monócitos e linfócitos.

Figura 13. Estratégia de gate utilizada na seleção das populações a serem avaliadas.



Fonte: Autor

4.11 DOCKING MOLECULAR DO COMPOSTO JB18 E PPAR γ

Os cálculos do método in silico de docking molecular foram conduzidos utilizando o servidor de acoplamento *SwissDock*, baseado no algoritmo *EADock DSS*.³⁴ As coordenadas tridimensionais do composto LPSF/JB-18 foram geradas utilizando a ferramenta de software livre *UCSF Chimera*. A estrutura cristalina da proteína PPAR γ foi obtida a partir do banco de dados *Protein Data Bank* (PDB), através do código PDB ID: 1ZEO. Os resultados do docking foram analisados através de uma função de energia baseada em *CHARMM*, estimadas em um grid. A função de pontuação *Full Fitness* (FF) que corresponde à energia livre de Gibbs ($-\Delta G$) estimada em kcal/mol, foi especificada pelo algoritmo *SwissDock*. Um escore FF negativo

maior indica um modo de ligação mais favorável com melhor ajuste. Em cada cluster, as posições de ligação individuais foram ranqueadas e classificadas com base na pontuação do FF. O sítio ativo da proteína foi estabelecido de acordo com informações de docking molecular entre o PPAR γ e a molécula Rosiglitazona extraídas do banco de dados *PDBsum*. As imagens do acoplamento entre LPSF/JB-18 e PPAR γ e identificação de resíduos de aminoácido presentes no sítio ativo de maior estabilidade foram obtidas com auxílio do software *Chimera UCSF*.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE *IN SILICO* – REGRA DE LIPINSKI

Todos os parâmetros físico-químicos relevantes na “Regra dos 5” abordados por Lipinski, foram calculados para os derivados tiazolidínicos. De acordo com a Tabela 4, todos os derivados apresentam valores adequados e que se encaixam nos limites propostos, exceto o JB17 que apresentou um LogP acima do padrão ideal. Visto isso, os derivados apresentaram bom perfil teórico de biodisponibilidade oral.

Tabela 4. Predição teórica da biodisponibilidade oral dos derivados tiazolidínicos, segundo a “Regra dos 5” de Lipinski.

Derivados	Regras de Lipinski				RB	TPSA (Å ²)
	PM (g/mol)	HBD	HBA	Log P		
JB10	351,46	0	2	3,77	4	62,68
JB16	490,62	0	2	4,99	6	65,92
JB17	450,64	0	2	5,20	10	65,92
JB18	380,46	1	3	3,27	5	91,78
JB19	313,37	0	3	3,13	3	75,82
JB23	402,30	0	2	3,66	3	62,68
JB24	353,43	0	3	3,51	4	71,91
JB25	383,46	0	4	3,89	5	81,14

Fonte: Autor, (2020).

PM – Peso Molecular.

HBD – Número de Doadores de Ligação de Hidrogênio.

HBA - Número de Aceptores de Ligação de Hidrogênio.

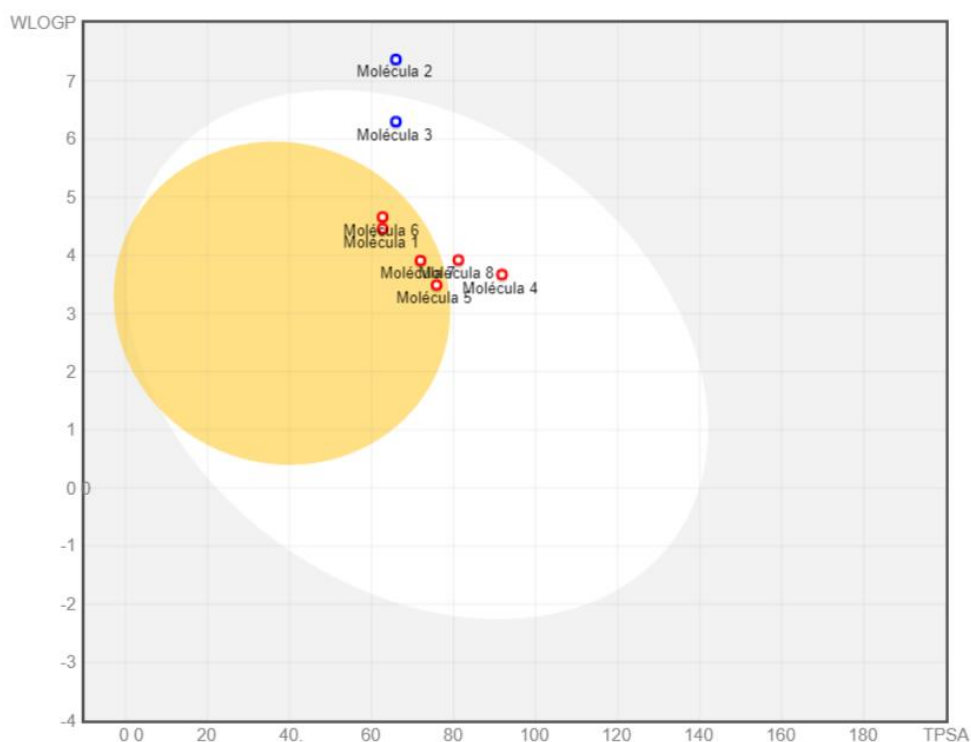
RB – Número de Ligações Rotativas

TPSA - Área de Superfície Polar Topológica.

PM – Peso Molecular.

Através do gráfico de BOILED-Egg (Figura 14), baseado na TPSA/ WLogp, foi possível prever a capacidade de absorção do trato gastrointestinal e a permeabilidade à barreira hematoencefálica, dos derivados tiazolidínicos. Os resultados demonstraram que todos os derivados têm alta absorção no trato gastrointestinal e os JB10, JB19, JB23 e JB24 são permeáveis à barreira hematoencefálica.

Figura 14. Gráfico BOILED-Egg. Em amarelo, é demonstrada a capacidade das moléculas em atravessar a barreira hematoencefálica, e em branco, capacidade de absorção gastrointestinal. Molécula 1 – JB10; Molécula 2 – JB16; Molécula 3 – JB17; Molécula 4 – JB18; Molécula 5 – JB19; Molécula 6 – JB23; Molécula 7 – JB24; Molécula 8 – JB25.

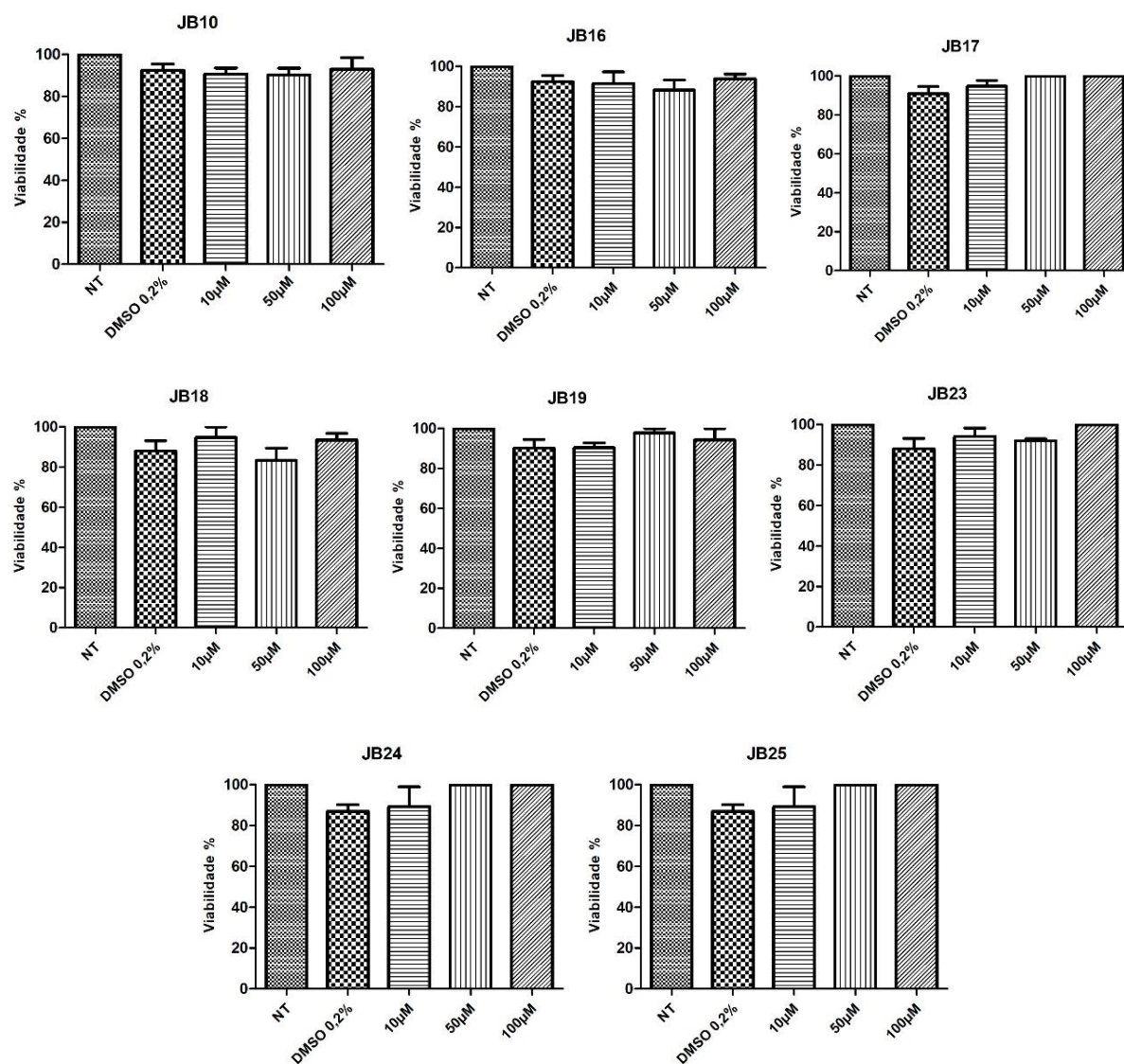


Fonte: (Disponível Online) <http://www.swissadme.ch/index.php#2>

5.2 AVALIAÇÃO DA CITOTOXIDADE DOS DERIVADOS TIAZOLIDÍNICOS

Entre as concentrações de 10 e 100 μ M testadas, as PBMCs apresentaram viabilidade perto de 100%, não havendo citotoxicidade associada aos derivados (Figura 15). A partir destes resultados, todos compostos foram utilizados nos demais ensaios, nas concentrações de 50 e 100 μ M.

Figura 15. Resultado dos ensaios de citotoxicidades dos JBs em PBMCs.



NT: Não Tratado; DMSO: Veículo

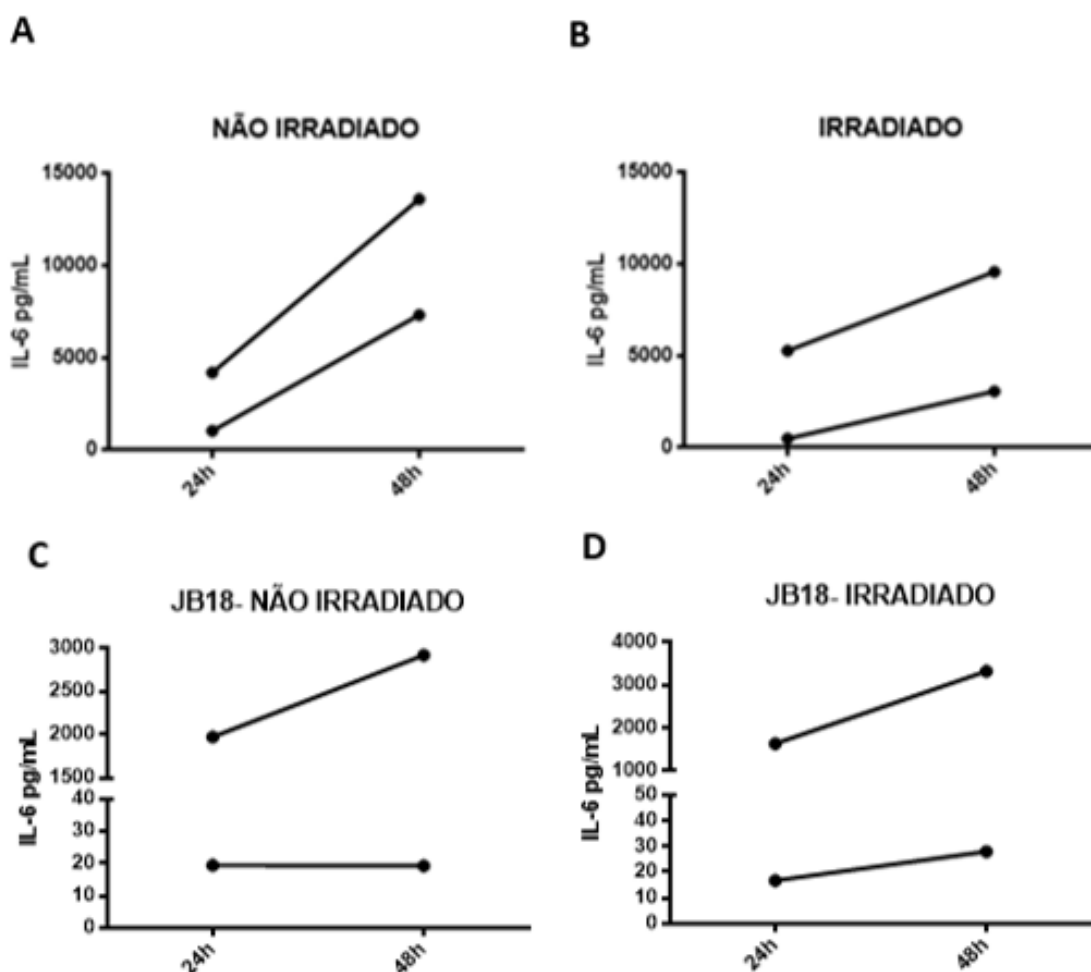
5.3 AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS

Os níveis de concentrações (pg/mL) das citocinas IL-6, IL-10, TNF, IL12p70, IL-8 e IL1 β produzidas por PBMCs não irradiadas (NR) e irradiadas (IR), na presença de estímulo (PHA) e a ação dos compostos JB10, JB16, JB17, JB18, JB19, JB23, JB24 e JB25 não tiveram alteração estatisticamente significativa entre as amostras NR e IR, os dados podem ser visualizados no Anexo 4.

Nesses dados, é possível verificar que há uma variação interindividual dos níveis de expressão de citocinas dos voluntários. No entanto, percebe-se um comportamento padrão entre eles, contudo não foram respostas significativas. Ademais, dos oito compostos avaliados, apenas o JB18 apresentou resultados coerentes e, portanto, prosseguimos avaliando apenas a ação do JB18.

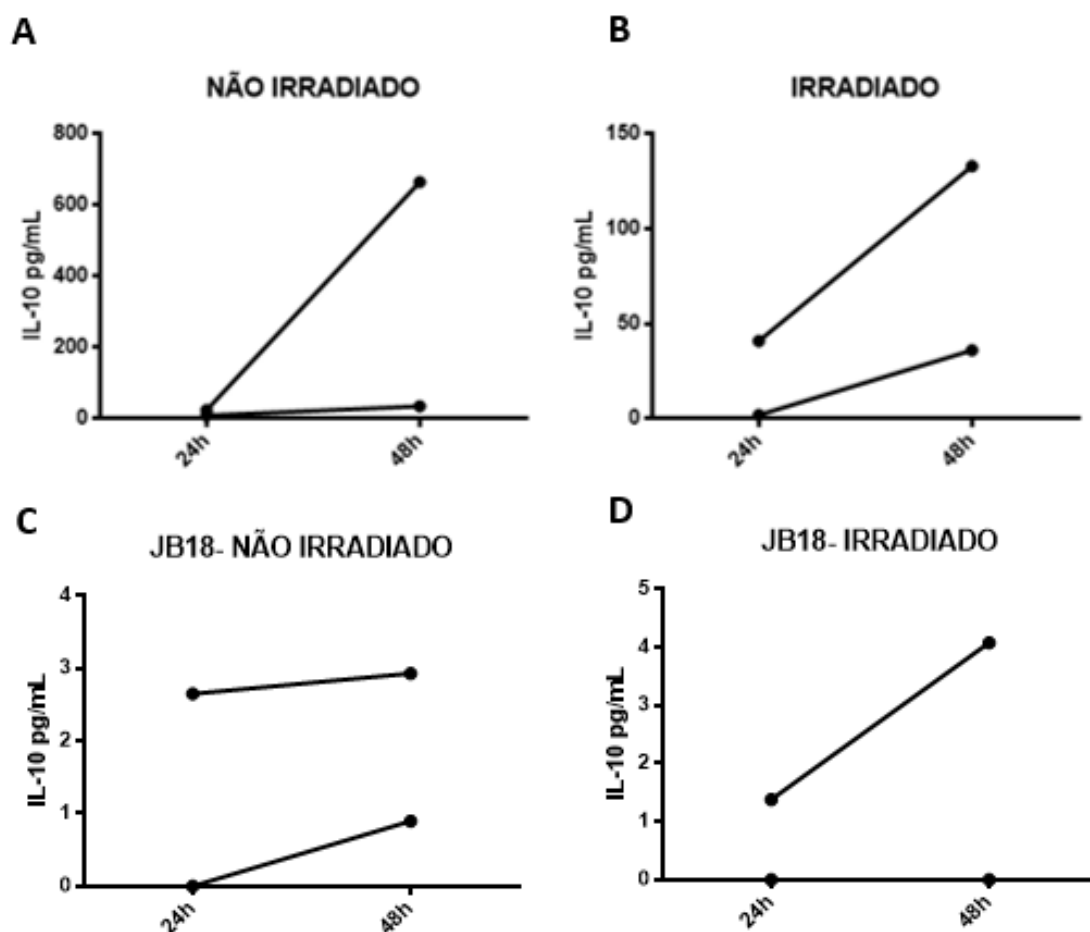
A Figura 16, apresenta os níveis da citocina IL-6 em amostras irradiadas (B e D) e não irradiadas (A e C), na ausência (A e B) e na presença (C e D) do composto JB18, após 24 e 48 horas de cultivo. É possível observar um aumento no nível da secreção da IL-6 após 48 horas no soro das células, não irradiadas e irradiadas (A e B), no entanto, nota-se que esse nível foi menor para as células na presença do tratamento com o JB18, em ambas as condições irradiação e não irradiação (C e D).

Figura 16. Perfil comportamental da IL-6, em células apenas na presença do estímulo (PHA) (A e B); e células na presença do JB18 (C e D), nas condições de não radiação e irradiação, respectivamente.



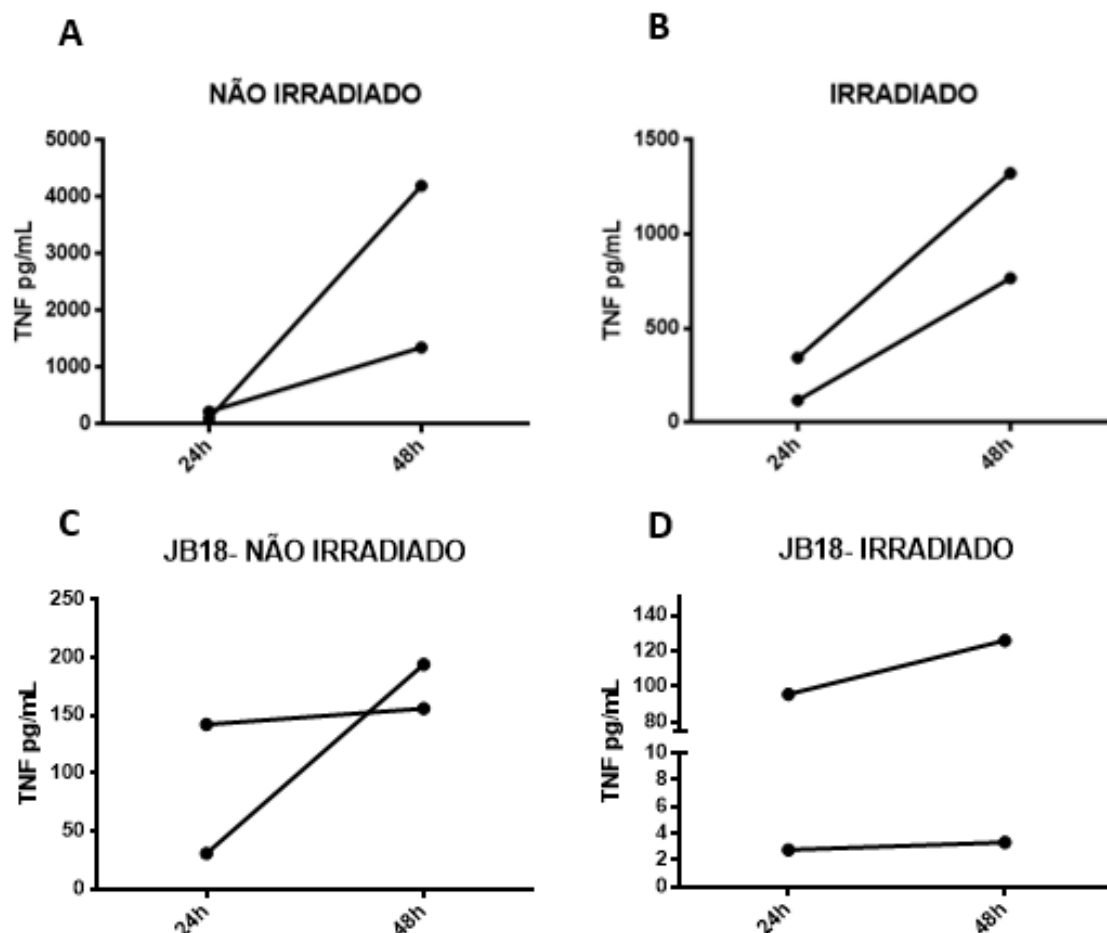
Na Figura 17, é possível verificar os níveis de secreção da IL-10 em amostras irradiadas (B e D) e não irradiadas (A e C), na ausência (A e B) e na presença (C e D) do composto JB18. Observa-se que os níveis de secreção da IL-10 apresentaram-se aumentados, principalmente na condição das células não irradiadas (Figura 17A) e na condição irradiada esses níveis reduzem (Figura 17B). Nas figuras C e D, nota-se que o composto JB18 agiu nos níveis de secreção da IL-10, em ambas as condições, diminuindo o nível dessa resposta.

Figura 17. Perfil comportamental da IL-10, em células apenas na presença do estímulo de (PHA) e células na presença do JB18, nas condições de não radiação e irradiação, respectivamente.



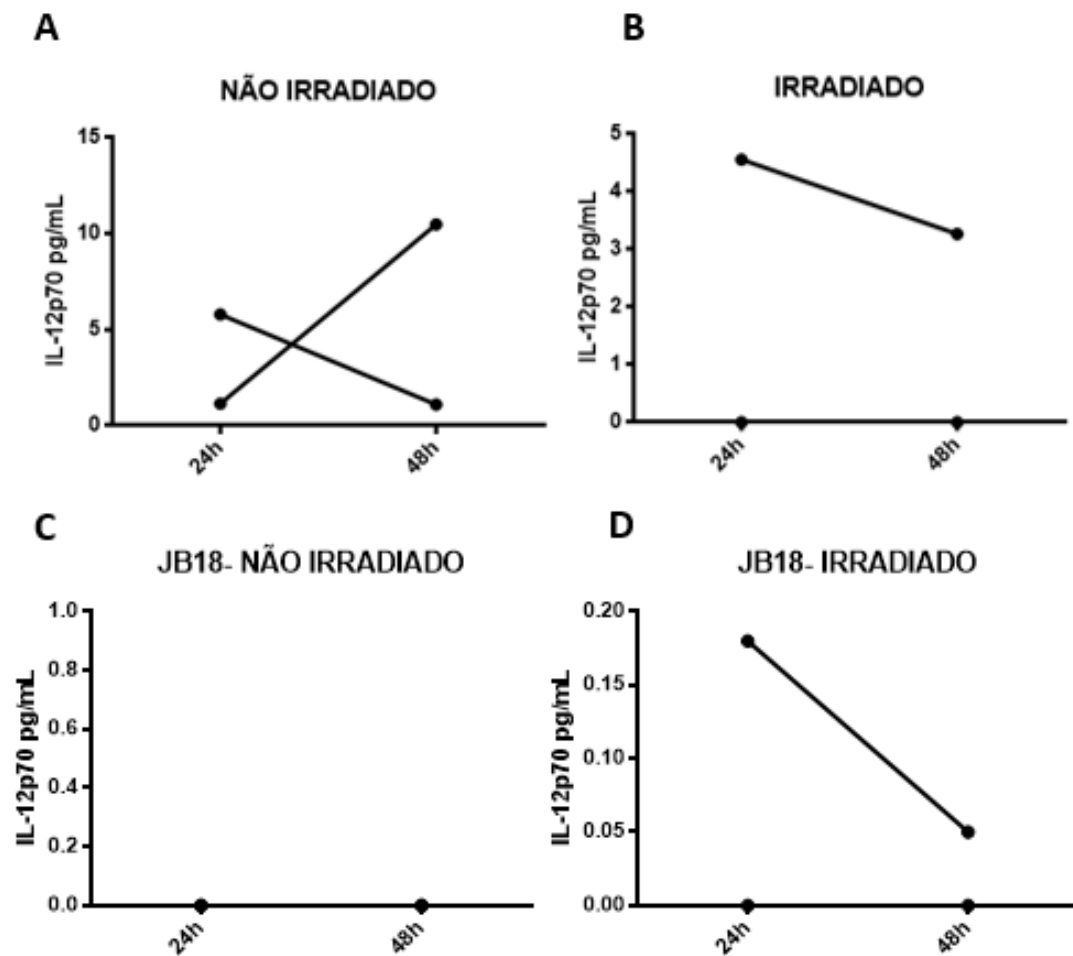
A figura 18 apresenta os níveis de TNF em amostras irradiadas (B e D) e não irradiadas (A e C), na ausência (A e B) e na presença (C e D) do composto JB18. É possível verificar que nas amostras irradiadas há uma diminuição dos níveis de expressão do TNF em ambos os indivíduos, e novamente na condição de célula irradiada (Figura 18B) o nível do TNF diminui em relação à não irradiada (Figura 18A). Na presença do tratamento com o JB18 e não irradiada (Figura 18C), apesar de não ter ficado homogêneo como nas demais citocinas, há um decréscimo nos níveis em relação à condição anterior. Na figura 18D, notamos que o composto consegue diminuir esses níveis notavelmente na condição de irradiação.

Figura 18. Perfil comportamental do TNF, em células apenas na presença do estímulo de (PHA) e células na presença do JB18, nas condições de não radiação e irradiação, respectivamente.



A figura 19 apresenta os níveis de IL-12p70 em amostras irradiadas (B e D) e não irradiadas (A e C), na ausência (A e B) e na presença (C e D) do composto JB18. Pode-se notar que a citocina IL-12p70 apresentou baixa secreção em todas as condições experimentais, no entanto, o perfil de inibição do composto JB18 permaneceu presente, tanto nas amostras não irradiadas quanto nas irradiadas (Figura 19C e 19D).

Figura 19. Perfil comportamental da IL-12p70, em células apenas na presença do estímulo de (PHA) e células na presença do JB18, nas condições de não radiação e irradiação, respectivamente.



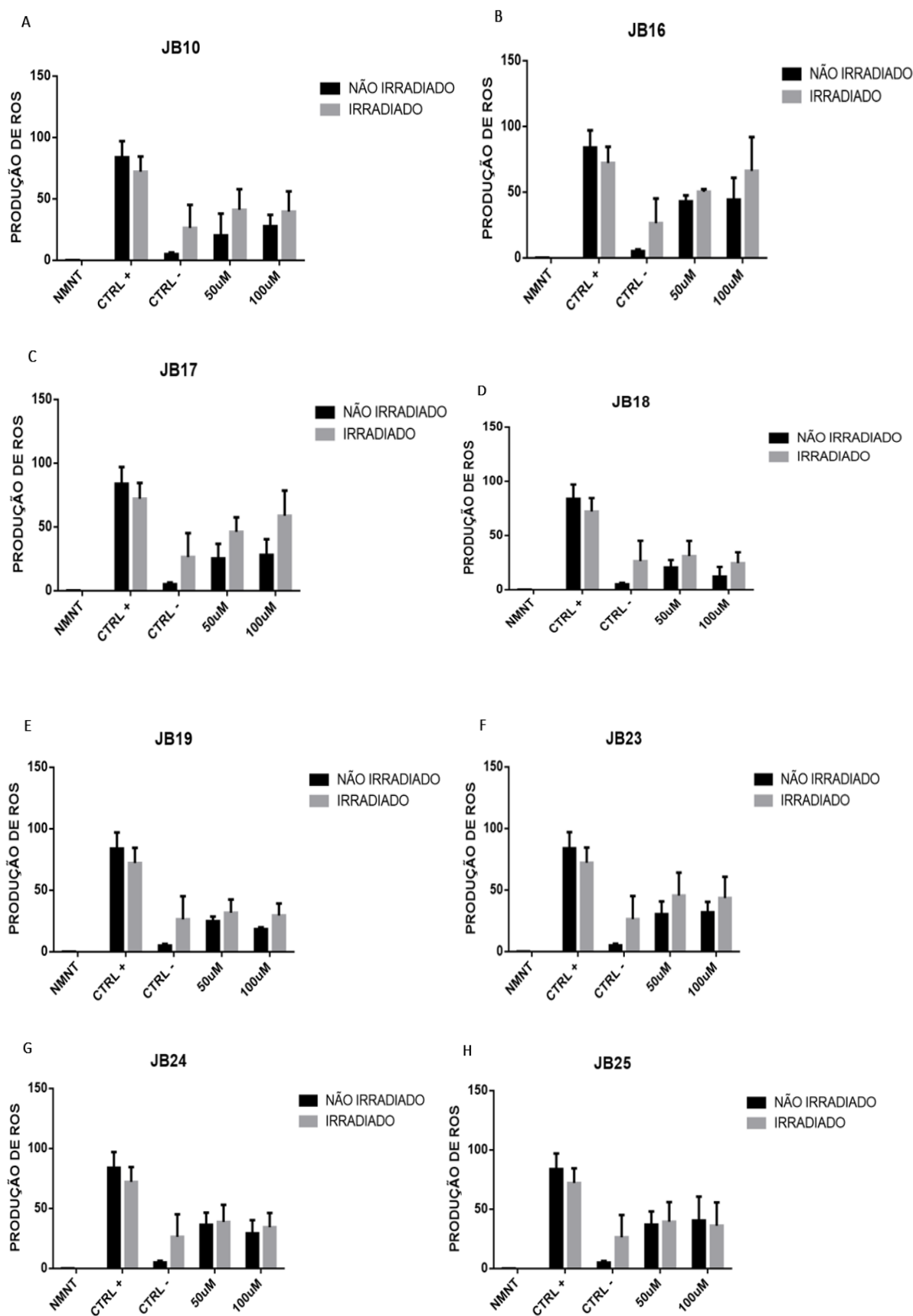
Os valores de secreção das citocinas IL-8 e IL-1 β , não serão apresentados porque ficaram abaixo dos limites de detecção, não sendo possível avaliá-las.

5.4 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

A figura 20 apresenta os resultados da produção de ROS em amostras não irradiadas e irradiadas, na presença (50 e 100 μ M) e na ausência dos compostos JB10 (A), JB16 (B), JB17 (C), JB18(D), JB19 (E), JB23 (F), JB24 (G), JB25 (H). Observando os gráficos, é possível notar que o JB10 parece perder sua habilidade de antioxidante nas amostras irradiadas, bem como o JB17 (Figura 20C). O JB16 parece não apresentar um papel antioxidante em nenhuma das condições (Figura 20B).

Vale ressaltar que na amostra não irradiada, os compostos não foram mais efetivos que o controle negativo. Porém, nas amostras irradiadas, os compostos JB18, JB19 e JB24 apresentaram resultados muito semelhantes ao controle negativo, sugerindo atividade antioxidante. Enquanto, os JBs 23 e 25 aparentaram manter a habilidade antioxidante em ambas as condições, sem parecer tão eficazes nas amostras irradiadas. Exceto os JB16 e JB17, não houve diferença entre a capacidade antioxidante dos compostos entre as concentrações de 50 e 100 μ M.

Figura 20. Análise individual dos compostos no papel antioxidante, diante ausência e presença da radiação.



NMNT: Não Marcado Não Tratado; CTRL+: Controle Positivo; CTRL-: Controle Negativo.

5.5 DOCKING MOLECULAR DO COMPOSTO JB18 E PPAR γ

Os resultados de docking molecular demonstraram que o composto JB18, possui afinidade de ligação com o alvo selecionado, a proteína PPAR γ (PDB ID: 1ZEO). O $-\Delta G$ da energia de ligação presente na posição mais estável foi de -9.490Kcal/mol. Em relação ao sítio ativo da ligação, foi observado acoplamento do composto JB18 na cadeia A da Proteína PPAR γ , destacando a presença dos resíduos de aminoácido descritos na Tabela 5 e demonstrados nas figuras 21 e 22.

Tabela 5. Resultados de Docking molecular entre o composto LPSF/JB-18 e a proteína PPAR γ .

Resíduos de Aminoácidos do Sítio Ativo			Ligações de Hidrogênio		
PPAR γ <i>Resíduo</i>	JB18 <i>Átomo</i>	Distância <i>Ångström</i>	PPAR γ <i>Resíduo</i>	JB18 <i>Átomo</i>	Distância <i>Ångström</i>
TYR473	H17	2.864Å	SER342	O3	2.042Å
ILE262	H1	2.871Å	GLU343	O3	2.513Å
HIS449	H17	2.953Å	CYS285	O2	2.865Å
SER289	H15	3.036Å	TYR477	H4	2.045Å
MET364	H19	3.076Å	ILE326	H4	2.413Å
PHE363	H12	3.093Å			
MET364	H7	3.133Å			
MET364	O2	3.204Å			
CYS285	H13	3.259Å			
SER289	O1	3.529Å			
ILE281	H2	3.566Å			
HIS323	H15	3.579Å			
LEU330	H7	3.714Å			
ILE341	H1	3.897Å			
TY327	H18	4.070Å			
LEU330	O2	4.339Å			
ILE341	O3	4.479Å			

Figura 21. Posição de acoplamento do composto JB18 na Cadeia A da Proteína PPAR γ .

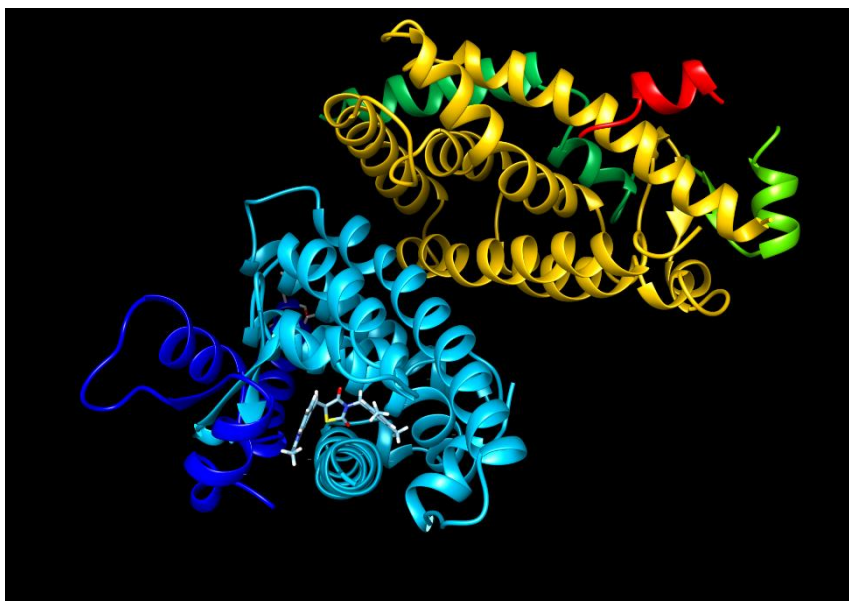
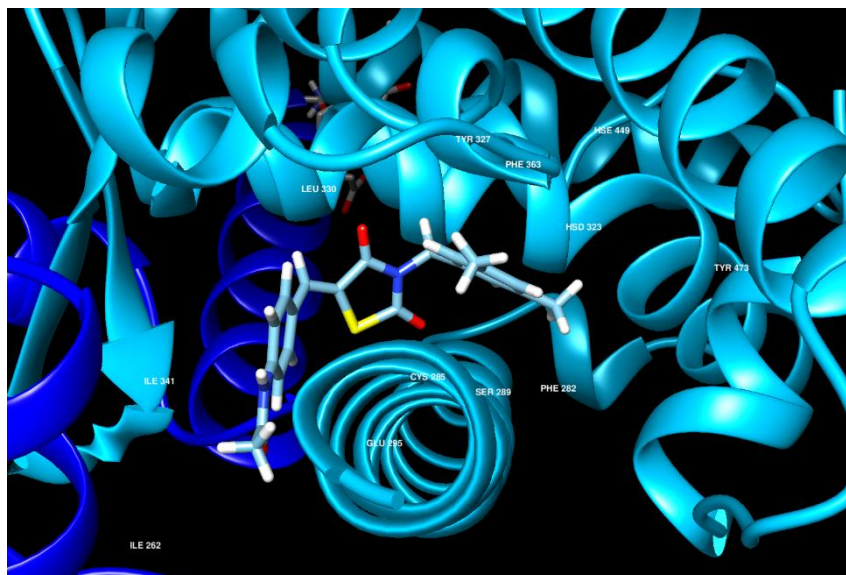


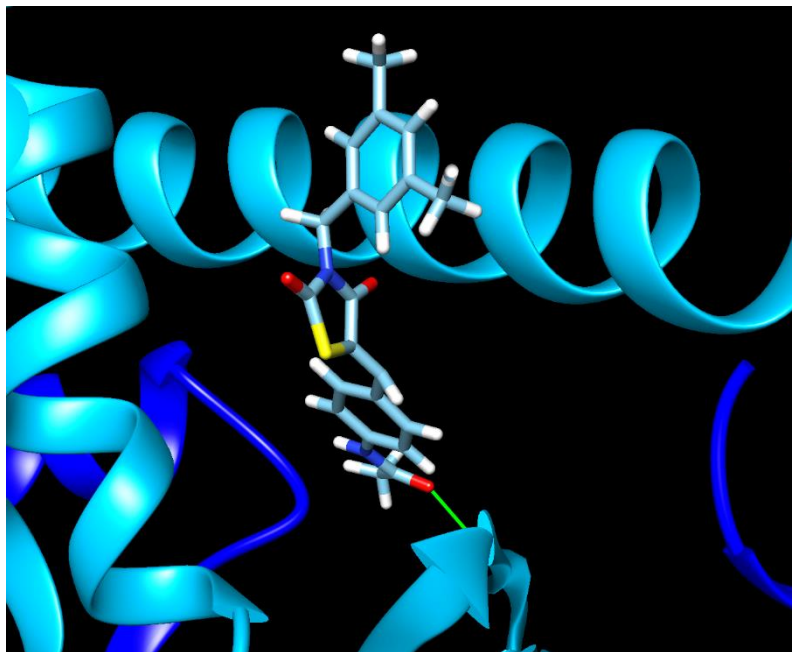
Figura 22. Sítio ativo da enzima onde houve uma ancoragem com o composto JB18 e resíduos de aminoácidos.



A análise de docking molecular demonstrou, ainda, ligações de hidrogênio entre o Oxigênio (O2) do núcleo Tiazolidina-2,4-diona do composto JB18 e o resíduo CYS285. Também foram observadas ligações de hidrogênio entre o Oxigênio (O3) do substituinte n-fenilacetamida do composto JB18 com os resíduos SER342 e GLU343 (Figura 23).

Adicionalmente, foram observadas ligações de hidrogênio entre os resíduos TYR477 e ILE326 com o hidrogênio (H4) do substituinte n-fenilacetamida do composto JB18.

Figura 23. Ligação de Hidrogênio entre o composto JB18 e o resíduo SER342 da proteína PPAR γ (2.042Å).



6 DISCUSSÃO

A radiação ionizante, desde a sua descoberta, vem trazendo benefícios imensuráveis a prática clínica. Desde o seu uso no diagnóstico, através dos exames de imagem, até sua utilização no tratamento de doenças, como o câncer. No entanto, apesar da sua contribuição positiva, seu uso também possui aspectos negativos, trazendo efeitos colaterais decorrentes dos danos teciduais causados pelo seu uso contínuo, principalmente no tratamento oncológico, na radioterapia. Visando isso, esse estudo teve como objetivo avaliar *in vitro*, derivados tiazolidínicos que possam minimizar esses efeitos prejudiciais. De acordo com os parâmetros de administração, absorção, metabolismo e excreção, avaliados na análise *in silico*, os derivados apresentaram boa disponibilidade oral, exceto o JB17 que apresentou um logP acima do padrão ideal. Ainda baseado no perfil teórico das moléculas, pode-se afirmar que todos apresentam alta absorção no trato gastrointestinal, e os JB10, 16, 23 e 24 são permeáveis a barreira hematoencefálica. O JB18, molécula com resultados mais interessantes, é impermeável a barreira hematoencefálica, o que a torna promissora na radioproteção do tecidos saudáveis, diante a irradiação de tumores cerebrais.

Uma propriedade crucial para uma nova molécula com ação de radioproteção, bem como moléculas com atividade antineoplásicas, deve ser sua citotoxicidade em células saudáveis (WILMORE et al., 2001). Levando isso em consideração, os derivados tiazolidínicos, JB10, JB16, JB17, JB18, JB19, JB23, JB24 e JB25, em diferentes concentrações, foram testados quanto a sua citotoxicidade frente a células saudáveis (PBMCs). Obtiveram um resultado positivo com citotoxicidade $\geq 90\%$, mesmo na mais alta concentração, confirmando que os compostos não são tóxicos frente aos tecidos saudáveis. Um estudo comparou atividade citotóxica de derivados tiazolidínicos contra células de carcinoma pulmonar humano, utilizando uma linhagem celular e células mononucleares, tendo concluído a seletividade do composto frente a linhagem celular cancerígena e não apresentando toxicidade frente às PBMCs (RODRIGUES et al., 2018).

Na avaliação do perfil de citocinas inflamatórias, apenas o JB18 apresentou resultados significantes quanto a imunossupressão das citocinas em análise. Quando na ausência do composto, percebe-se que os níveis de secreção das citocinas IL-6, IL-10, TNF e IL-12p70 são relativamente altos, e quando colocados frente a radiação

esses níveis sofrem um decréscimo. Na presença do JB18, os níveis das citocinas decaíram tanto nas condições “não irradiadas” quanto “irradiadas”, ao que parece o composto conseguiu minimizar os efeitos da radiação ao mesmo tempo que modula a resposta inflamatória. A irradiação parece provocar um aumento de IL-6, IL-10 e TNF em todas as condições de tratamento. Alguns estudos, revelam que a exposição de células à radiação ionizante induz a expressão de citocinas, como: TNF, IL-1 β , IL-6, IL-10, entre outras (KIM et al., 2014) (MAGGIO et al., 2015). E em todos os tratamentos com os JBs, há um aumento de IL-6 e IL-1b, apenas os JB18 e JB19 provocam uma redução no nível dessa resposta. Esse aumento dos níveis das citocinas pró-inflamatórias, como o TNF e IL-1b, está relacionada ao processo fibrótico induzido por radiação (LEE et al., 2012). Diante dos efeitos da radiação, citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, TNF e IL-1b, contribuem para a geração de espécies reativas de oxigênio, por outro lado, citocinas anti-inflamatórias, como TGF- β , IL-10 e IL-4, tendem a inibir esses efeitos e exibem propriedades antioxidantes, embora, isso possa variar de acordo com o tipo e as circunstâncias celular (SCHAUE et al., 2012). Entre as inúmeras citocinas que são produzidas imediatamente após a irradiação, a IL-1, IL-6 e TNF são as principais envolvidas em resposta a pele, pulmão e cérebro (KIM et al., 2014). Estudos mostraram que a diminuição da expressão das citocinas IL-6 e TNF- α pode estar relacionada a diminuição da atividade de um isotipo enzimático do complexo REDOX, levando à diminuição da produção de ROS (MENG et al., 2013). Deve-se levar em consideração o fato que algumas citocinas são dependentes da dose da radiação e do tempo de exposição ao estímulo (HONG et al., 1995), o que torna o estudo limitado por não ter sido feito uma cinética da exposição, nem a variação da dose. A intervariabilidade dos resultados entre os indivíduos, pode estar relacionada à radiosensibilidade ou radioresistência de cada indivíduo (CAUDELL et al., 2017).

Na investigação da produção de espécies reativas de oxigênio, os compostos JB18 e JB19 apresentaram maior habilidade antioxidante, frente a radiação. A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) é a causa mais frequente de danos a molécula DNA, como foi dito inicialmente. Visto isso, moléculas que desempenhem o papel de antioxidante também são promissoras na radioproteção do tecido normal. Estudos demonstram que alguns derivados tiazolidínicos possuem a habilidade de “sequestrar” essas espécies reativas de oxigênio das células, mantendo seu equilíbrio redox normal (BOZDAG-DÜNDAR et al., 2011); (BERCZYNSKI et al., 2014). Em testes *in vitro*, Faine e colaboradores obtiveram êxito quando investigaram as

propriedades antioxidantes de um novo derivado tiazolidínico, comparando-o com Rosiglitazona, tendo como resultado positivo do experimento em macrófagos.

Comparando as estruturas químicas, observamos que o JB18 possuiu um grupamento amina ligado a um carbono, o que se assemelha a parte final da estrutura química da amifostina. Em comparação com a rosiglitazona e a pioglitazona, tiazolidinedionas já conhecidas, os derivados tiazolidínicos do estudo possuem as mesmas substituições no anel na posição C5, o que nos traz uma semelhança positiva. E a maioria dessas substituições realizadas no anel, são na posição PARA com um grupamento fenil, apenas o JB23, JB24 e JB25 não possuem essa substituição em PARA, o JB19 por sua vez, difere dos outros por possuir um furano invés do fenil.

Os resultados do docking molecular do composto JB18 mostraram-se bastante consistente com os resultados de outros agonistas parciais da PPAR γ , em especial a molécula Rosiglitazona. Dentre os resíduos de aminoácido observados na região de acoplamento de ambas as moléculas, destacam-se HIS449, TYR473, HIS323 e SER289 que possuem ligações de hidrogênio com o núcleo tiazolidínico da Rosiglitazona (PDBsum). Os resultados também são comparáveis ao de outros derivados tiazolidínicos, descritos na literatura como agonistas parciais da PPAR γ , dentre eles, os compostos GQ-16 e GW0072, cujo docking molecular destacaram os resíduos CYS285, ILE281, LEU330 também presentes no sítio do composto JB18 (KROKER; BRUNING, 2015). A presença de ligações de hidrogênio envolvendo átomos do substituinte n-fenilacetamida também demonstram a importância dos aceptores e doadores de ligações de hidrogênio presentes no radical.

Diante do exposto, das moléculas estudadas, o JB18 apresentou uma boa atividade imunomoduladora e antioxidante frente às PBMCs, sugerindo-se que pode se tornar uma alternativa radioprotetora. Contudo, o estudo apresenta algumas limitações e novos ensaios deverão ser realizados para elucidar melhor o mecanismo de ação desse composto e confirmação dos resultados.

CONCLUSÃO

- Os oito derivados tiazolidínicos, testados nas concentrações de 10, 50 e 100uM em PBMCs, apresentaram viabilidade próximo de 100%, não havendo citotoxicidade associada aos derivados;
- Na avaliação do perfil de secreção de citocinas, em PBMCs irradiadas e não irradiadas, dos oito compostos, apenas o JB18 diminuiu consideravelmente os níveis das citocinas nas duas condições;
- No ensaio de detecção de espécies reativas de oxigênio, o JB18 obteve uma atividade similar ao controle positivo, sugerindo uma ação antioxidante;
- Na análise por docking molecular, os resultados demonstraram-se bastante consistentes com resultados anteriores de outros agonistas PPAR γ , em especial a molécula da Rosiglitazona. A presença de ligações de hidrogênio envolvendo átomos do substituinte n-fenilacetamida também demonstram a importância dos aceptores e doadores de ligações de hidrogênio presentes no radical.

REFERÊNCIAS

ALLEN, Christine; HER, Sohyoung; JAFFRAY, David A. **Radiotherapy for Cancer: Present and future. *Advanced Drug Delivery Reviews***, [s.l.], v. 109, p.1-2, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2017.01.004>.

A PALACIOS, Diego; MIYAKE, Makito; ROSSER, Charles J. Radiosensitization in prostate cancer: mechanisms and targets: mechanisms and targets. **Bmc Urology**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.1-13, 26 jan. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2490-13-4>.

A CONSOLI; DEVANGELIO, e. Thiazolidinediones and inflammation. **Lupus**, [s.l.], v. 14, n.9, p.794-797, set. 2005. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1191/0961203305lu2223oa>.

ARENDS, Jann. How to feed patients with gastrointestinal mucositis. **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**, [s.l.], v. 12, n. 2, p.168-173, jun. 2018. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/spc.0000000000000345>.

ARSLAN, Gulgun Cakmak; SEVERCAN, Feride. The effects of radioprotectant and potential antioxidant agent amifostine on the structure and dynamics of DPPC and DPPG liposomes. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Biomembranes**, [s.l.], v. 1861, n. 6, p.1240-1251, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.04.009>.

ASATI, Vivek; MAHAPATRA, Debarshi Kar; BHARTI, Sanjay K.. Thiazolidine-2,4-diones as multi-targeted scaffold in medicinal chemistry: Potential anticancer agents. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 87, p.814-833, nov. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.10.025>.

BARCELLOS-HOFF, Mary Helen; PARK, Catherine; WRIGHT, Eric G. Radiation and the microenvironment – tumorigenesis and therapy. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 5, n. 11, p.867-875, nov. 2005. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1735>.

BARI, Ahmed et al. Synthesis and anti-inflammatory activity of diversified heterocyclic systems. **Chemical Biology & Drug Design**, [s.l.], v. 94, n. 4, p.1750-1759, 10 jul. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/cbdd.13576>.

BASELET, Bjorn; SONVEAUX, Pierre; BAATOUT, Sarah; AERTS, An. Pathological effects of ionizing radiation: endothelial activation and dysfunction.: endothelial activation and dysfunction. **Cellular And Molecular Life Sciences**, [s.l.], v. 76, n. 4, p. 699-728, 30 out. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-018-2956-z>.

BERCZYŃSKI, Paweł et al. Studies on the antioxidant activity of some thiazolidinedione, imidazolidinedione and rhodanine derivatives having a flavone core. **Luminescence**, [s.l.], v. 29, n. 8, p.1107-1112, 14 abr. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bio.2667>.

BERGER, Joel; MOLLER, David E. The Mechanisms of Action of PPARs. **Annual Review Of Medicine**, [s.l.], v. 53, n. 1, p.409-435, fev. 2002. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.med.53.082901.104018>.

BOZDAĞ-DÜNDAR, Oya; ERTAN, Rahmiye; ABOUL-ENEIN, Hassan Y.; KŁADNA, Aleksandra; KRUK, Irena. Free radical scavenging abilities of flavonyl-thiazolidine-2,4-dione compounds. **Luminescence**, [s.l.], v. 26, n. 1, p. 10-16, jan. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bio.1176>.

BLANQUICETT C, Roman J, Hart CM. Thiazolidinediones as anti-cancer agents. *Cancer Ther.* 2008;6(A):25-34. PMID: 19079765; PMCID: PMC2600565.

BOCKEL, S. et al. Pharmacological modulation of radiation-induced oral mucosal complications. **Cancer/radiothérapie**, [s.l.], v. 22, n. 5, p.429-437, set. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canrad.2017.11.006>.

BOZDAĞ-DÜNDAR, Oya et al. Free radical scavenging abilities of flavonyl-thiazolidine-2,4-dione compounds. **Luminescence**, [s.l.], v. 26, n. 1, p.10-16, jan. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bio.1176>.

CARIOU, Bertrand; CHARBONNEL, Bernard; STAELS, Bart. Thiazolidinediones and PPAR γ agonists: time for a reassessment.: time for a reassessment. **Trends In Endocrinology & Metabolism**, [s.l.], v. 23, n. 5, p. 205-215, maio 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2012.03.001>.

CAUDELL, Jimmy J; TORRES-ROCA, Javier F; GILLIES, Robert J; ENDERLING, Heiko; KIM, Sungjune; RISHI, Anupam; MOROS, Eduardo G; HARRISON, Louis B. The future of personalised radiotherapy for head and neck cancer. **The Lancet Oncology**, [s.l.], v. 18, n. 5, p. 266-273, maio 2017. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045\(17\)30252-8](http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045(17)30252-8)

CHADHA, Navriti; BAHIA, Malkeet Singh; KAUR, Maninder; SILAKARI, Om. Thiazolidine-2,4-dione derivatives: programmed chemical weapons for key protein targets of various pathological conditions.: Programmed chemical weapons for key protein targets of various pathological conditions. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 23, n. 13, p. 2953-2974, jul. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2015.03.071>.

CHEEMA, Amrita K. et al. Metabolomic studies in tissues of mice treated with amifostine and exposed to gamma-radiation. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.1-13, 30 out. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-52120-w>.

CRAMER, Christina K. et al. Safety of pioglitazone during and after radiation therapy in patients with brain tumors: a phase I clinical trial. **Journal Of Cancer Research And Clinical Oncology**, [s.l.], v. 145, n. 2, p.337-344, 12 nov. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00432-018-2791-5>.

CHOU, F.-s. et al. Effects of Thiazolidinediones on Differentiation, Proliferation, and Apoptosis. **Molecular Cancer Research**, [s.l.], v. 5, n. 6, p.523-530, 1 jun. 2007. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-06-0278>.

DAINA, Antoine; MICHELIN, Olivier; ZOETE, Vincent. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 1-13, 3 mar. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep42717>.

DAVIS, Amanda S.; VIERA, Anthony J.; MEAD, Monica D. Leukemia: An Overview for Primary Care. **American Family Physician**, Carolina do Sul, v. 89, n. 9, p.731-738, maio 2014.

DRUDE, Natascha; TIENKEN, Lena; MOTTAGHY, Felix M.. Theranostic and nanotheranostic probes in nuclear medicine. **Methods**, [S.L.], v. 130, p. 14-22, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2017.07.004>.

FAINE, L. A. et al. Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of a New Arylidene-Thiazolidinedione in Macrophages. **Current Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 18, n. 22, p.3351-3360, 1 ago. 2011. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/092986711796504600>.

FARHOOD, B. et al. Melatonin as an adjuvant in radiotherapy for radioprotection and radiosensitization. **Clinical and Translational Oncology**, [s.l.], v. 21, n. 3, p.268-279, 22 ago. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12094-018-1934-0>.

FARMER, P. S.; LEUNG, C. C.; LUI, E. M. K. Radio protective Thiazolidines from β - Keto Esters. *Journal of Medicinal Chemistry*, 16v, 411-413p, 1973.

FONTAINE, Coralie et al. The Orphan Nuclear Receptor Rev-Erba Is a Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) γ Target Gene and Promotes PPAR γ -induced Adipocyte Differentiation. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 278, n. 39, p.37672-37680, 23 jun. 2003. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m304664200>.

FOSTER-NORA, Jessica A.; SIDEN, Rivka. Amifostine for protection from antineoplastic drug toxicity. **American Journal of Health-system Pharmacy**, [s.l.], v. 54, n. 7, p.787-800, 1 abr. 1997. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/ajhp/54.7.787>.

GA, Chernov et al. The molecular aspects of the action of the radioprotector indralin. **Europe Pmc**, Rússia, v. 5, n. 8, p.20-37, jan. 1994.

GAUBEUR, Matheus Acquesta. Marcadores radiométricos de dano ao DNA: possíveis alvos e estado atual. **Revista Médica**, São Paulo, p.46-56, mar. 2015.

GOH, Teik Beng et al. 5-Methoxytryptamine reacts with natural food flavour to produce 6-methoxy tetrahydro- β -carboline: In vitro investigation of their antioxidant and cytotoxicity properties. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 183, p.208-216, set. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.044>.

GUSSGARD, Anne Margrete et al. Symptoms Reported by Head and Neck Cancer Patients during Radiotherapy and Association with Mucosal Ulceration Site and Size: An Observational Study. **Plos One**, [s.l.], v. 10, n. 6, p.1-13, 10 jun. 2015. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0129001>.

HALL, Susan et al. Protection against Radiotherapy-Induced Toxicity. **Antioxidants**, [s.l.], v. 5, n. 3, p.22-40, 5 jul. 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/antiox5030022>.

HIDALGO-FIGUEROA, Sergio et al. Discovery of Thiazolidine-2,4-Dione/Biphenylcarbonitrile Hybrid as Dual PPAR α/γ Modulator with Antidiabetic Effect: In vitro, In Silico and In Vivo Approaches. **Chemical Biology & Drug Design**, [s.l.], v. 81, n. 4, p.474-483, 21 mar. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/cbdd.12102>.

HILL, M.a. Radiation Track Structure: How the Spatial Distribution of Energy Deposition Drives Biological Response. **Clinical Oncology**, [s.l.], p.1-9, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clon.2019.08.006>.

HONG, Ji-hong; CHIANG, Chi-shiun; CAMPBELL, Iain L.; SUN, Ji-rong; WITHERS, H. rodney; MCBRIDE, William H.. Induction of acute phase gene expression by brain irradiation. **International Journal Of Radiation Oncology*biology*physics**, [s.l.], v. 33, n. 3, p. 619-626, out. 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0360-3016\(95\)00279-8](http://dx.doi.org/10.1016/0360-3016(95)00279-8).

KALIKI, S; SHIELDS, C L. Uveal melanoma: relatively rare but deadly cancer.: relatively rare but deadly cancer. **Eye**, [s.l.], v. 31, n. 2, p. 241-257, 2 dez. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/eye.2016.275>.

KAUR, Simran; NAG, Alo; SINGH, Ajay Kumar; SHARMA, Kulbhushan. PPAR γ -targeting Potential for Radioprotection. **Current Drug Targets**, [s.l.], v. 19, n. 15, p. 1818-1830, 26 out. 2018. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1389450119666180131105158>.

KHALIFA, J. et al. Gene therapy and cell therapy for the management of radiation damages to healthy tissues: Rationale and early results. **Cancer/radiothérapie**, [s.l.], v. 23, n. 5, p.449-465, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canrad.2019.06.002>.

KIM, Jae Ho; JENROW, Kenneth A.; BROWN, Stephen L. Mechanisms of radiation-induced normal tissue toxicity and implications for future clinical trials. **Radiation Oncology Journal**, [s.l.], v. 32, n. 3, p. 103-115, 2014. Korean Society for Therapeutic Radiology and Oncology. <http://dx.doi.org/10.3857/roj.2014.32.3.103>.

KROKER, Alice J.; BRUNING, John B.. Review of the Structural and Dynamic Mechanisms of PPAR γ Partial Agonism. **Ppar Research**, [S.L.], v. 2015, p. 1-15, 2015. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/816856>.

KUBEŁ, J. et al. Velmi pozdní následky radioterapie –limitující faktor současných radioterapeutických technik. **Klin Onkol**, Praga, v. 27, n. 3, p.161-165, mar. 2014.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R. N. Robbins. Patologia básica. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

KUMAR, K. Srikanth; RAO, A. Lakshmana; RAO, M.v. Basaveswara. Design, synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of novel 3-substituted-5-[(indol-3-yl) methylene] -thiazolidine-2,4-dione derivatives. **Heliyon**, [s.l.], v. 4, n. 9, p.1-26, set. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00807>.

KUNTIÉ, V. S.; STANKOVÉ, M. B.; VUJIÉ, Z. B. et al. Radioprotectors – the Evergreen Topic. *Chemistry and Biodiversity*, 10v, 1791-1803p, 2013.

LANGBEIN, Thomas; WEBER, Wolfgang A.; EIBER, Matthias. Future of Theranostics: an outlook on precision oncology in nuclear medicine. **Journal Of Nuclear Medicine**, [S.L.], v.

60, n. 2, p. 13-19, set. 2019. Society of Nuclear Medicine. <http://dx.doi.org/10.2967/jnumed.118.220566>.

LEE, Judy W.; ZOUMALAN, Richard A.; VALENZUELA, Cristian D.; NGUYEN, Phuong D.; TUTELA, John P.; ROMAN, Benjamin R.; WARREN, Stephen M.; SAADEH, Pierre B.. Regulators and mediators of radiation-induced fibrosis: gene expression profiles and a rationale for smad3 inhibition.: Gene expression profiles and a rationale for Smad3 inhibition. **Otolaryngology–head And Neck Surgery**, [s.l.], v. 143, n. 4, p. 525-530, out. 2010. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1016/j.otohns.2010.06.912>.

LIEROVA, Anna et al. Cytokines and radiation-induced pulmonary injuries. **Journal Of Radiation Research**, [s.l.], p.709-753, 31 ago. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jrr/rry067>.

LIPINSKI, Christopher; LOMBARDO, Franco; DOMINY, Beryl W; FEENEY, Paul J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings 1PII of original article: s0169-409x(96)00423-1. the article was originally published in advanced drug delivery reviews 23 (1997) 3:25. 1. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 46, n. 1-3, p. 3-26, mar. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0169-409x\(00\)00129-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00129-0).

MAGGIO, Federica di; MINAFRA, Luigi; FORTE, Giusi; CAMMARATA, Francesco; LIO, Domenico; MESSA, Cristina; GILARDI, Maria; BRAVATÀ, Valentina. Portrait of inflammatory response to ionizing radiation treatment. **Journal Of Inflammation**, [s.l.], v. 12, n. 1, p. 14-24, 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12950-015-0058-3>.

MAIER, Patrick et al. Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 17, n. 1, p.102-134, 14 jan. 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms17010102>.

MAIER, Patrick; WENZ, Frederik; HERSKIND, Carsten. Radioprotection of normal tissue cells. **Strahlentherapie Und Onkologie**, [s.l.], v. 190, n. 8, p.745-752, 18 mar. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00066-014-0637-x>.

(KOPP, et al., 2019).

MANGONI, Monica et al. A PPAR-gamma agonist attenuates pulmonary injury induced by irradiation in a murine model. **Lung Cancer**, [s.l.], v. 90, n. 3, p.405-409, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2015.11.005>.

MANGONI, Monica et al. A PPAR-gamma agonist protects from radiation-induced intestinal toxicity. **United European Gastroenterology Journal**, [s.l.], v. 5, n. 2, p.218-226, 8 jul. 2016. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/2050640616640443>.

MARCONI, Raffaella et al. Cytokine Modulation in Breast Cancer Patients Undergoing Radiotherapy: A Revision of the Most Recent Studies. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 20, n. 2, p.1-18, 17 jan. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20020382>.

MERNA, Catherine; RWIGEMA, Jean-claude M.; CAO, Minsong; WANG, Pin-chieh; KISHAN, Amar U.; MICHAILIAN, Argin; LAMB, James; SHENG, Ke; AGAZARYAN, Nzhde; LOW, Daniel A. A treatment planning comparison between modulated tri-cobalt-60 teletherapy and linear accelerator-based stereotactic body radiotherapy for central early-stage non-small cell lung cancer. **Medical Dosimetry**, [s.l.], v. 41, n. 1, p. 87-91, 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meddos.2015.09.002>.

MISHRA, Krishnanand; ALSBEIH, Ghazi. Appraisal of biochemical classes of radioprotectors: evidence, current status and guidelines for future development. **3 Biotech**, [s.l.], v. 7, n. 5, p.1-16, 29 ago. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-017-0925-0>.

MUN, Gil-im et al. Pharmacology of natural radioprotectors. **Archives of Pharmacal Research**, [s.l.], v. 41, n. 11, p.1033-1050, 25 out. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12272-018-1083-6>.

MV, Vasin et al. Radioprotective capacity of indralin in reducing radiation injury to salivary glands. **Radiats Biol Radioecol**, Rússia, v. 44, n. 3, p.1-10, maio 2004.

NAIM, Mohd. Javed et al. Synthesis, molecular docking and anti-diabetic evaluation of 2,4-thiazolidinedione based amide derivatives. **Bioorganic Chemistry**, [s.l.], v. 73, p.24-36, ago. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.05.007>.

NAJAFI, Masoud; MOTEVASELI, Elahe; SHIRAZI, Alireza; GERALLY, Ghazale; REZAEYAN, Abolhasan; NOROUZI, Farzad; REZAPOOR, Saeed; ABDOLLAHI, Hamid. Mechanisms of inflammatory responses to radiation and normal tissues toxicity: clinical implications.: clinical implications. **International Journal Of Radiation Biology**, [s.l.], v. 94, n. 4, p. 335-356, 7 mar. 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/09553002.2018.1440092>.

NANJAN, M.J.; MOHAMMED, Manal; KUMAR, B.R. Prashantha; CHANDRASEKAR, M.J.N.. Thiazolidinediones as antidiabetic agents: a critical review. **Bioorganic Chemistry**, [S.L.], v. 77, p. 548-567, abr. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.02.009>.

OMARINI, Claudia; THANOPOULOU, Eirini; JOHNSTON, Stephen R. D. Pneumonitis and pulmonary fibrosis associated with breast cancer treatments. **Breast Cancer Research and Treatment**, [s.l.], v. 146, n. 2, p.245-258, 15 jun. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-014-3016-5>.

ORTH, Michael et al. Current concepts in clinical radiation oncology. **Radiation and Environmental Biophysics**, [s.l.], v. 53, n. 1, p.1-29, 20 out. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00411-013-0497-2>.

OWADALLY, Waheeda; STAFFURTH, John. Principles of cancer treatment by radiotherapy. **Surgery (oxford)**, [s.l.], v. 33, n. 3, p.127-130, mar. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpsur.2014.12.008>.

QI, Baohui et al. Discovery of thiazolidin-4-one urea analogues as novel multikinase inhibitors that potently inhibit FLT3 and VEGFR2. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**,

[s.l.], v. 27, n. 10, p.2127-2139, maio 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2019.03.049>.

RAGHAVAN, Govind; KISHAN, Amar U; CAO, Minsong; CHEN, Allen M. Anatomic and dosimetric changes in patients with head and neck cancer treated with an integrated MRI-tri-60Co teletherapy device. **The British Journal Of Radiology**, [s.l.], v. 89, n. 1067, p. 1-8, nov. 2016. British Institute of Radiology. <http://dx.doi.org/10.1259/bjr.20160624>.

RAO, Bhuvanagiri Nageshwar et al. Protective effect of Zingerone, a dietary compound against radiation induced genetic damage and apoptosis in human lymphocytes. **European Journal of Pharmacology**, [s.l.], v. 657, n. 1-3, p.59-66, abr. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.02.002>.

REZAEYAN, A. et al. Evaluating Radioprotective Effect of Hesperidin on Acute Radiation Damage in the Lung Tissue of Rats. **Journal of Biomedical, Physics and Engineering**, Irã, v. 3, n. 6, p.165-174, set. 2016.

RODRIGUES, Maria do D. et al. Selective cytotoxic and genotoxic activities of 5-(2-bromo-5-methoxybenzylidene) -thiazolidine-2,4-dione against NCI-H292 human lung carcinoma cells. **Pharmacological Reports**, [s.l.], v. 70, n. 3, p.446-454, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharep.2017.11.008>.

SÁ, José Roberto et al. Interação da Física das Radiações com o Cotidiano: uma prática multidisciplinar para o Ensino de Física. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, [s.l.], v. 39, n. 1, p.1-11, 10 out. 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1806-9126-rbef-2016-0119>.

SANTINI, Fernando C.; RIZVI, Hira; PLODKOWSKI, Andrew J.; NI, Andy; LACOUTURE, Mario E.; GAMBARIN-GELWAN, Maya; WILKINS, Olivia; PANORA, Elizabeth; HALPENNY, Darragh F.; LONG, Niamh M. Safety and Efficacy of Re-treating with Immunotherapy after Immune-Related Adverse Events in Patients with NSCLC. **Cancer Immunology Research**, [s.l.], v. 6, n. 9, p. 1093-1099, 10 jul. 2018. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/2326-6066.cir-17-0755>.

SCHAUE, Dörthe; KACHIKWU, Evelyn L.; MCBRIDE, William H.. Cytokines in Radiobiological Responses: a review: A Review. **Radiation Research**, [s.l.], v. 178, n. 6, p. 505-523, dez. 2012. Radiation Research Society. <http://dx.doi.org/10.1667/rr3031.1>.

SHIMADA, Akira. Hematological malignancies and molecular targeting therapy. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 862, p. 1-10, nov. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172641>.

SIMON, Eric S. et al. Evaluation of a method for measuring the radioprotective metabolite WR-1065 in plasma using chemical derivatization combined with UHPLC-MS/MS. **Journal of Chromatography B**, [s.l.], v. 1080, p.82-89, mar. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.02.030>.

SINGH, Vijay K.; SEED, Thomas M. The efficacy and safety of amifostine for the acute radiation syndrome. **Expert Opinion on Drug Safety**, [s.l.], v. 18, n. 11, p.1077-1090, 17set. 2019. InformaUK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/14740338.2019.1666104>.

SCAFF, Luiz A. M. **Física da radioterapia**. São Paulo: Sarvier, 1997. 361 p.

SUCHETA; TAHLAN, Sumit; VERMA, Prabhakar Kumar. Synthesis, SAR and in vitro therapeutic potentials of thiazolidine-2,4-diones. **Chemistry Central Journal**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.1-11, dez. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13065-018-0496-0>.

TANDERUP, Kari; MÉNARD, Cynthia; POLGAR, Csaba; LINDEGAARD, Jacob Christian; KIRISITS, Christian; PÖTTER, Richard. Advancements in brachytherapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 109, p. 15-25, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2016.09.002>.

TROTSKO, Nazar; PRZEKORA, Agata; ZALEWSKA, Justyna; GINALSKA, Grażyna; PANETH, Agata; WUJEC, Monika. Synthesis and in vitro antiproliferative and antibacterial activity of new thiazolidine-2,4-dione derivatives. **Journal Of Enzyme Inhibition And Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 33, n. 1, p. 17-24, 3 nov. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/14756366.2017.1387543>.

TROTSKO, Nazar et al. Synthesis and antibacterial activity of new (2,4-dioxothiazolidin-5-yl/ylidene) acetic acid derivatives with thiazolidine-2,4-dione, rhodanine and 2-thiohydantoin moieties. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [s.l.], v. 26, n. 4, p.568-577, maio 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2018.01.016>.

VARGHESE, J.j. et al. Localized Delivery of Amifostine Enhances Salivary Gland Radioprotection. **Journal of Dental Research**, [s.l.], v. 97, n. 11, p.1252-1259, 10 abr. 2018. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/0022034518767408>.

VASIN, Mikhail V. Comments on the mechanisms of action of radiation protective agents: basis components and their polyvalence. **Springerplus**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.1-16, 7 ago. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/2193-1801-3-414>.

VASIN, Mikhail V. et al. Protective effect and the therapeutic index of indralin in juvenile rhesus monkeys. **Journal of Radiation Research**, [s.l.], v. 55, n. 6, p.1048-1055, 10 jul. 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jrr/rru046>.

VASIN, M. V.; USHAKOV, I. B. Comparative efficacy and the window of radioprotection for adrenergic and serotonergic agents and aminothiols in experiments with small and large animals. **Journal Of Radiation Research**, [s.l.], v. 56, n. 1, p.1-10, 13 out. 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jrr/rru087>.

WILMORE, Britta H.; CASSIDY, Pamela B.; WARTERS, Raymond L.; ROBERTS, Jeanette C. Thiazolidine Prodrugs as Protective Agents against γ -Radiation-Induced Toxicity and Mutagenesis in V79 Cells. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 44, n. 16, p. 2661-2666, ago. 2001. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jm010162l>.

ZHAO, Weiling et al. Administration of the peroxisomal proliferator-activated receptor γ agonist pioglitazone during fractionated brain irradiation prevents radiation-induced cognitive impairment. **International Journal Of Radiation Oncology*biology*physics**, [s.l.], v. 67, n. 1, p.6-9, jan. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijrobp.2006.09.036>.

YAHYAPOUR, Rasoul; AMINI, Peyman; REZAPOUR, Saeed; CHEKI, Mohsen; REZAEYAN, Abolhasan; FARHOOD, Bagher; SHABEEB, Dheyauldeen; MUSA, Ahmed

Elejo; FALLAH, Hengameh; NAJAFI, Masoud. Radiation-induced inflammation and autoimmune diseases. **Military Medical Research**, [s.l.], v. 5, n. 1, p. 1-8, 20 mar. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s40779-018-0156-7>.

YAHYAPOUR, R.; MOTEVASELI, E.; REZAEYAN, A.; ABDOLLAHI, H.; FARHOOD, B.; CHEKI, M.; REZAPOOR, S.; SHABEEB, D.; MUSA, A. E.; NAJAFI, M.. Reduction–oxidation (redox) system in radiation-induced normal tissue injury: molecular mechanisms and implications in radiation therapeutics.: molecular mechanisms and implications in radiation therapeutics. **Clinical And Translational Oncology**, [s.l.], v. 20, n. 8, p. 975-988, 9 jan. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12094-017-1828-6>.

ANEXO 1



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da Atividade Radioprotetora e Radiomitigadora de Novos Derivados Tiazolidínicos.

Pesquisador: Raquel Vasconcelos da Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 98305318.4.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.035.109

Apresentação do Projeto:

O projeto intitulado "Avaliação da Atividade Radioprotetora e Radiomitigadora de Novos Derivados Tiazolidínicos" foi apresentado por Raquel Vasconcelos da Silva, estudante do Programa de Mestrado da Pós Graduação em Inovação Terapêutica UFPE, sob a orientação do Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo e Co-orientação das Profas. Dra. Mariana Brayner Cavalcanti Freire Bezerra e Dra. Marina Galdino da Rocha Pitta. O presente estudo visa avaliar a atividade radioprotetora e/ou radiomitigadora de novos derivados tiazolidínicos hibridizados, com grupamentos análogos aos agentes radioprotetores já existentes, visando seu potencial uso na terapêutica de pacientes hipersensíveis às radiações ionizantes. O estudo será do tipo experimental ou ensaio clínico não randomizado. Amostras de sangue periférico serão coletadas de 30 indivíduos, sendo 15 do gênero masculino e 15 do gênero feminino, com faixa etária entre 18 e 40 anos. Serão coletados 18 mL de sangue periférico em 02 tubos contendo heparina sódica, utilizando sistema a vácuo, obedecendo a procedimentos de biossegurança. Uma amostra será mantida como controle não irradiado e as demais serão irradiadas in vitro utilizando um arranjo experimental já bem estabelecido pelo grupo de pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o papel de novos derivados da tiazolidinediona como potencial droga radioprotetora ou

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



Continuação do Parecer: 3.035.109

radiomitigadora

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A coleta de sangue pode ser desconfortável e o braço pode ficar um pouco dolorido e apresentar um pequeno hematoma, que é uma área arroxeadada no local da coleta. Antes de iniciar a coleta, nós limparemos o seu braço com álcool, e todo material usado na coleta é descartável. A coleta será feita por profissionais treinados e competentes e orientados para reduzir os riscos. Caso ocorra a formação do hematoma, será aplicada compressa gelada para reduzir a vermelhidão.

b. Benefícios:

Os benefícios da pesquisa não são individuais. Estendendo-se a sociedade como um todo, uma vez que os resultados obtidos poderão propiciar um maior conhecimento sobre a atividade radioprotetora e/ou radiomitigadora de derivados tiazolídínicos frente às células saudáveis.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está escrito de forma clara e objetiva. O projeto visa explorar o papel de novos derivados da tiazolidinadiona como potencial droga radioprotetora ou radiomitigadora da resposta inflamatória exacerbada de citocinas e restauração do equilíbrio entre elas após exposição às radiações ionizante. De acordo com Resolução 466, o TCLE contém palavras técnicas e científicas que podem dificultar a compreensão do participante. Os verbos dos objetivos específicos podem ser substituídos para que se compreenda o alcance do objetivo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

1. Folha de rosto – foi apresentada, assinada pela coordenadora do curso de pós-graduação, UFPE.
2. Termo de Confidencialidade – não foi apresentado.
3. Orçamento – o projeto demanda custos que estão discriminados no valor total de R\$ 39.000,00 reais.
4. TCLE – foi apresentado e as pendências foram acatadas.
5. Currículos – apresentados.
6. Cartas de Anuência – foram apresentadas, devidamente assinadas pelas Instituições envolvidas.

Recomendações:

Nenhuma

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



Continuação do Parecer: 3.035.109

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências foram acatadas.

Considerações Finais a critério do CEP:

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

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

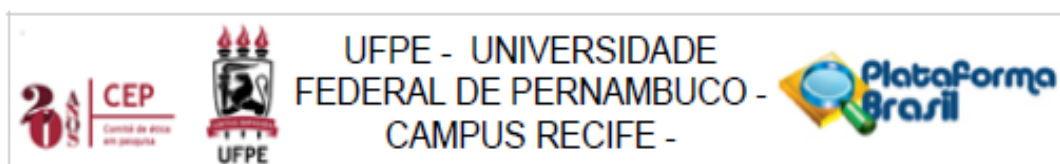
Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1200334.pdf	20/11/2018 13:08:31		Aceito
Outros	carta_de_respostas_as_pendencias.docx	20/11/2018 13:07:38	Raquel Vasconcelos da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLE_correcoes.doc	20/11/2018 13:07:01	Raquel Vasconcelos da Silva	Aceito

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



Continuação do Parecer: 3.035.109

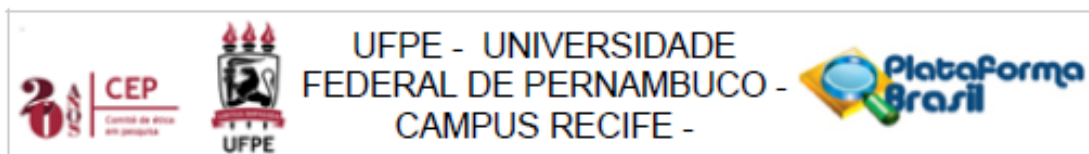
Ausência	TCLE_correcoes.doc	20/11/2018 13:07:01	Raquel Vasconcelos da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Raquel.doc	13/09/2018 09:53:25	Raquel Vasconcelos da Silva	Aceito
Outros	Carta_anuencia_LINAT.pdf	13/09/2018 09:20:47	Raquel Vasconcelos da Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado.docx	13/09/2018 09:18:20	Raquel Vasconcelos da Silva	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	11/09/2018 12:34:45	Raquel Vasconcelos da Silva	Aceito
Orçamento	Orcamento.docx	11/09/2018 11:15:21	Raquel Vasconcelos da Silva	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	11/09/2018 09:33:02	Raquel Vasconcelos da Silva	Aceito
Outros	Declaracao_de_vinculo.pdf	11/09/2018 09:31:51	Raquel Vasconcelos da Silva	Aceito
Outros	Curriculo_Samuel.pdf	10/09/2018 11:21:35	Raquel Vasconcelos da Silva	Aceito
Outros	Curriculo_Ana.pdf	10/09/2018 11:21:20	Raquel Vasconcelos da Silva	Aceito
Outros	Curriculo_Douglas.pdf	10/09/2018 11:21:06	Raquel Vasconcelos da Silva	Aceito
Outros	Curriculo_Ivan.pdf	10/09/2018 11:20:50	Raquel Vasconcelos da Silva	Aceito
Outros	Curriculo_Marina.pdf	10/09/2018 11:20:36	Raquel Vasconcelos da Silva	Aceito
Outros	Curriculo_Moacyr.pdf	10/09/2018 11:19:50	Raquel Vasconcelos da Silva	Aceito
Outros	Curriculo_Thiago.pdf	10/09/2018 11:19:35	Raquel Vasconcelos da Silva	Aceito
Outros	Curriculo_Mariana.pdf	10/09/2018 11:19:21	Raquel Vasconcelos da Silva	Aceito
Outros	Curriculo_Raquel.pdf	10/09/2018 11:19:09	Raquel Vasconcelos da Silva	Aceito
Outros	Termo_de_Confidencialidade.pdf	10/09/2018 11:11:27	Raquel Vasconcelos da Silva	Aceito
Outros	Carta_Anuencia_IMIP.pdf	10/09/2018 11:10:02	Raquel Vasconcelos da Silva	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

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



Continuação do Parecer: 3.035.109

Não

RECIFE, 23 de Novembro de 2018

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

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-500
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

ANEXO 2**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS)**

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa “Avaliação da atividade radioprotetora e radiomitigadora de novos derivados tiazolidínicos”, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Raquel Vasconcelos da Silva, e-mail: queltasconcelos8@gmail.com, fone: (81) 99899-6850, Endereço: Rua Sessenta e três, nº110, Rio Doce – Olinda/PE, CEP: 53090-393. Também participam desta pesquisa os pesquisadores: Profa. Dra. Mariana Brayner Cavalcanti Freire Bezerra (Telefone: (81) 99281-8446, e-mail: maribrayner@yahoo.com.br) e Dr. Samuel Cesar Dantas (Telefone: (81) 99631-1415, e-mail: samuel_cesard@yahoo.com.br) estando sob orientação do Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo (Telefone: (81) 99794-3799, e-mail: moacyr.rego@gmail.com).

Todas as suas dúvidas podem ser esclarecidas com o responsável por esta pesquisa. Apenas quando todos os esclarecimentos forem dados e você concorde com a realização do estudo, pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Você estará livre para decidir participar ou recusar-se. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema, desistir é um direito seu, bem como será possível retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa, também sem nenhuma penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

- A busca por novas compostos que possam agir como agentes protetores e/ou minimizadores dos efeitos dos efeitos maléficos da radiação é de extrema importância no atual panorama da terapêutica do câncer. Nosso principal objetivo é descobrir como as células saudáveis do sangue se comportam quando tratadas com os derivados tiazolidínicos, compostos já descritos como agentes protetores dos efeitos maléficos da radiação ionizante, utilizados no tratamento radioterápico. Nesta pesquisa só serão realizados testes com as células presentes no seu sangue que é coletado da sua veia como uma coleta de sangue para exames laboratoriais. Caso concorde, você participará desta pesquisa apenas uma vez com a coleta de sangue. Em nenhum momento você será exposto a nenhum agente físico ou químico, apenas a amostra do seu sangue (que será coletada com o seu consentimento), que será levada para o laboratório e será colocada em contato com os compostos em estudo, posteriormente essa amostra será analisada utilizando testes laboratoriais já bem estabelecido, e nada mais será necessário.

- Para este estudo, precisamos coletar algumas células de sangue. A coleta de sangue é feita no braço e a quantidade coletada é equivalente a duas colheres de sopa (18 ml).
- **RISCOS:** A coleta de sangue pode ser desconfortável e o braço pode ficar um pouco dolorido e apresentar um pequeno hematoma, que é uma área arroxeadada no local da coleta. Antes de iniciar a coleta, nós limparemos o seu braço com álcool, e todo material usado na coleta é descartável. A coleta será feita por profissionais treinados e competentes e orientados para reduzir os riscos. Caso ocorra a formação do hematoma, será aplicada compressa gelada para reduzir a vermelhidão.
- **BENEFÍCIOS:** Os benefícios da pesquisa não são individuais, o participante não beneficiado diretamente, no entanto, os resultados gerais e finais da pesquisa estende-se a sociedade como um todo, já que os resultados obtidos poderão propiciar um maior conhecimento sobre a atividade protetora e/ou minimizadora dos derivados tiazolídínicos frente às células saudáveis sob efeito maléfico da radiação ionizante. Sendo assim, diminuindo os efeitos colaterais, principalmente em pacientes em tratamento radioterápico.

Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa provenientes dos resultados das amostras coletadas ficarão devidamente armazenados em arquivos digitais em computadores ou impressos em pastas de arquivos, sob a responsabilidade da pesquisadora Raquel Vasconcelos da Silva, no Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino NUPIT-SG localizado no 1º andar do Prédio da Diretoria de Inovação e Empreendedorismo – DINE, cujo endereço é Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE, por um período mínimo 5 anos.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br) ou no CEP-IMIP que está situado à Rua dos Coelho, nº 300, Boa Vista. Diretoria de Pesquisa do IMIP, Prédio Administrativo Orlando Onofre, 1º Andar tel: (81) 2122-4756 – Email: comitedeetica@imip.org.br O**

CEP/IMIP funciona de 2ª a 6ª feira, nos seguintes horários: 07:00 às 11:30 h e 13:30 às 16:00h.

(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do projeto “Avaliação da atividade radioprotetora e radiomitigadora de novos derivados tiazolidínicos”, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento).

Local e data _____

Assinatura do participante: _____

Impressão
digital

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

ANEXO 3**QUESTIONÁRIO PARA COLETA DE DADOS****I- IDENTIFICAÇÃO PESSOAL**

- Nome completo: _____
- Sexo: () Masculino () Feminino
- Data de nascimento: ____/____/____
- Contato: () _____

II- INFORMAÇÕES ADICIONAIS

- Consumiu álcool nas últimas 72 horas? () Sim () Não
- Fuma? () Sim Quantos cigarros/dia? () Não
- Fez uso de anti-inflamatórios e/ou outros medicamentos na última semana?
() Sim Quais? _____
() Não
- Apresenta alguma patologia (autoimune/alergia/diabetes/tumor/outras)?
() Sim Qual? _____
() Não
- Passou por procedimento de transplante ou transfusão?
() Sim Que tipo? _____ ; Há quanto tempo? _____
() Não
- Fez uso de vacinas ou imunoterapia?
() Sim Que tipo? _____ ; Há quanto tempo? _____
() Não
- Foi submetido a algum tipo de exame radiológico ou de medicina nuclear?
() Sim Que tipo? _____ ; Há quanto tempo? _____
() Não
- Foi submetido a radioterapia?
() Sim Há quanto tempo? _____
() Não

ANEXO 4

Perfil de citocinas.

Citocinas (pg/ml)	Voluntário	PHA		Composto	
		NI	IR	NI	IR
COMPOSTO JB10 (100 µM)					
IL-6	I	5279,51	9581,74	7374,34	10243,09
	II	493,82	3063,62	3254,27	6157,96
IL-10	I	40,99	133,07	28,40	92,68
	II	1,91	36,10	6,05	38,21
TNF	I	343,98	1324,06	830,88	1428,66
	II	118,40	767,35	266,07	701,94
IL-12p70	I	4,56	3,27	4,22	5,72
	II	0,00	0,30	2,43	2,48
IL-8	I	26542,32	13458,55	25671,68	16048,35
	II	13003,30	21895,44	16187,70	25685,94
IL-1b	I	104,55	98,09	760,32	746,62
	II	2,17	0,26	93,61	41,09
COMPOSTO JB16 (100 µM)					
IL-6	I	5279,51	9581,74	6652,20	6437,72
	II	493,82	3063,62	941,30	1321,58
IL-10	I	40,99	133,07	44,49	91,69
	II	1,91	36,10	21,70	49,75
TNF	I	343,98	1324,06	969,39	1585,57
	II	118,40	767,35	144,45	168,68
IL-12p70	I	4,56	3,27	46,61	67,26
	II	0,00	0,30	34,77	47,48
IL-8	I	26542,32	13458,55	23515,59	23428,10
	II	13003,30	21895,44	9228,45	11914,02
IL-1β	I	104,55	98,09	423,19	608,46
	II	2,17	0,26	58,47	115,65
COMPOSTO JB17 (100 µM)					
IL-6	I	5279,51	9581,74	9330,47	13275,51
	II	493,82	3063,62	4207,90	9169,81
IL-10	I	40,99	133,07	52,65	156,72
	II	1,91	36,10	7,76	36,12

TNF	I	343,98	1324,06	813,73	1493,27
	II	118,40	767,35	402,90	791,13
IL-12p70	I	4,56	3,27	8,10	10,34
	II	0,00	0,30	2,45	2,56
IL-8	I	26542,32	13458,55	29390,48	16240,67
	II	13003,30	21895,44	19557,02	21040,59
IL-1β	I	104,55	98,09	306,92	471,00
	II	2,17	0,26	30,36	75,71
COMPOSTO JB18 (100 μM)					
IL-6	I	5279,51	9581,74	1631,52	3325,17
	II	493,82	3063,62	16,78	28,02
IL-10	I	40,99	133,07	1,38	4,08
	II	1,91	36,10	0,00	0,00
TNF	I	343,98	1324,06	95,88	126,03
	II	118,40	767,35	2,79	3,35
IL-12p70	I	4,56	3,27	0,18	0,05
	II	0,00	0,30	0,00	0,00
IL-8	I	26542,32	13458,55	17340,64	26319,20
	II	13003,30	21895,44	3407,91	6254,31
IL-1β	I	104,55	98,09	59,45	68,51
	II	2,17	0,26	0,00	0,00
COMPOSTO JB19 (100 μM)					
IL-6	I	5279,51	9581,74	340,50	710,51
	II	493,82	3063,62	7,28	11,09
IL-10	I	40,99	133,07	32,10	0,78
	II	1,91	36,10	0,00	0,00
TNF	I	343,98	1324,06	288,35	1823,67
	II	118,40	767,35	8,82	117,20
IL-12p70	I	4,56	3,27	0,19	1,95
	II	0,00	0,30	0,00	0,00
IL-8	I	26542,32	13458,55	12538,93	25920,74
	II	13003,30	21895,44	3385,08	6029,71
IL-1β	I	104,55	98,09	73,09	58,55
	II	2,17	0,26	0,00	0,00
COMPOSTO JB23 (100 μM)					
IL-6	I	5279,51	9581,74	7863,31	11822,95

	II	493,82	3063,62	1138,66	3147,63
IL-10	I	40,99	133,07	17,32	84,65
	II	1,91	36,10	0,19	13,38
TNF	I	343,98	1324,06	928,60	2462,88
	II	118,40	767,35	119,72	611,36
IL-12p70	I	4,56	3,27	10,63	15,55
	II	0,00	0,30	0,22	1,81
IL-8	I	26542,32	13458,55	26778,78	19177,38
	II	13003,30	21895,44	11346,55	24818,48
IL-1β	I	104,55	98,09	583,45	665,15
	II	2,17	0,26	14,85	17,44
COMPOSTO JB24 (100 μM)					
IL-6	I	5279,51	9581,74	9566,18	10714,51
	II	493,82	3063,62	2018,42	5602,85
IL-10	I	40,99	133,07	26,23	76,41
	II	1,91	36,10	1,16	25,24
TNF	I	343,98	1324,06	1371,35	2085,56
	II	118,40	767,35	233,45	548,22
IL-12p70	I	4,56	3,27	7,73	9,52
	II	0,00	0,30	0,71	1,14
IL-8	I	26542,32	13458,55	30324,25	23805,81
	II	13003,30	21895,44	11204,37	25650,31
IL-1β	I	104,55	98,09	1567,15	1023,64
	II	2,17	0,26	147,29	34,00
COMPOSTO JB25 (100 μM)					
IL-6	I	5279,51	9581,74	8329,36	11139,93
	II	493,82	3063,62	1507,46	3419,05
IL-10	I	40,99	133,07	33,82	70,75
	II	1,91	36,10	0,37	11,40
TNF	I	343,98	1324,06	697,97	1439,97
	II	118,40	767,35	59,12	284,13
IL-12p70	I	4,56	3,27	6,80	5,91
	II	0,00	0,30	0,68	2,86
IL-8	I	26542,32	13458,55	27069,08	20002,15
	II	13003,30	21895,44	10964,96	20744,60
IL-1β	I	104,55	98,09	668,09	550,54

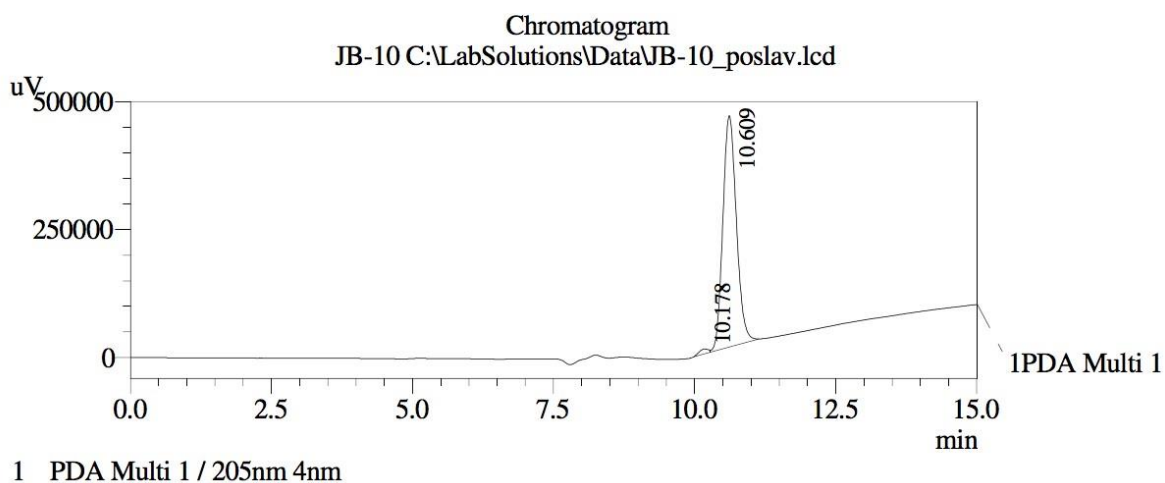
	II	2,17	0,26	40,90	103,21
--	----	------	------	-------	--------

PHA: Fitohemaglutinina; NI: Não Irradiado; IR: Irradiado.

ANEXO 5

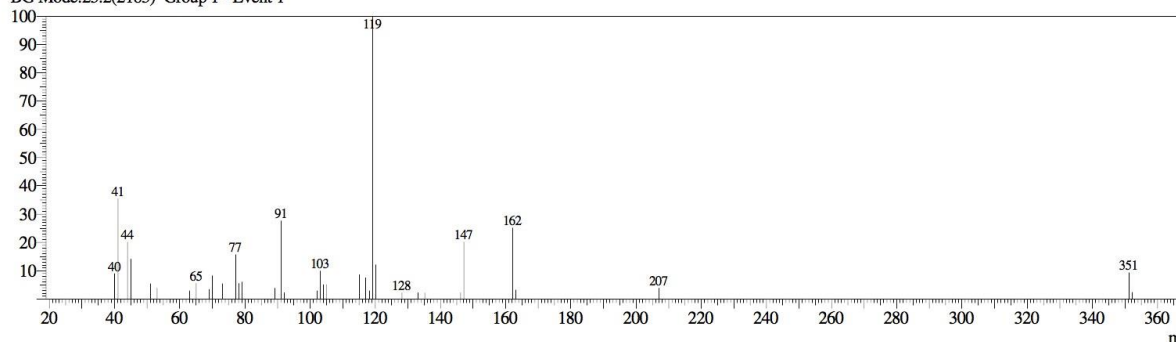
JB – 10

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

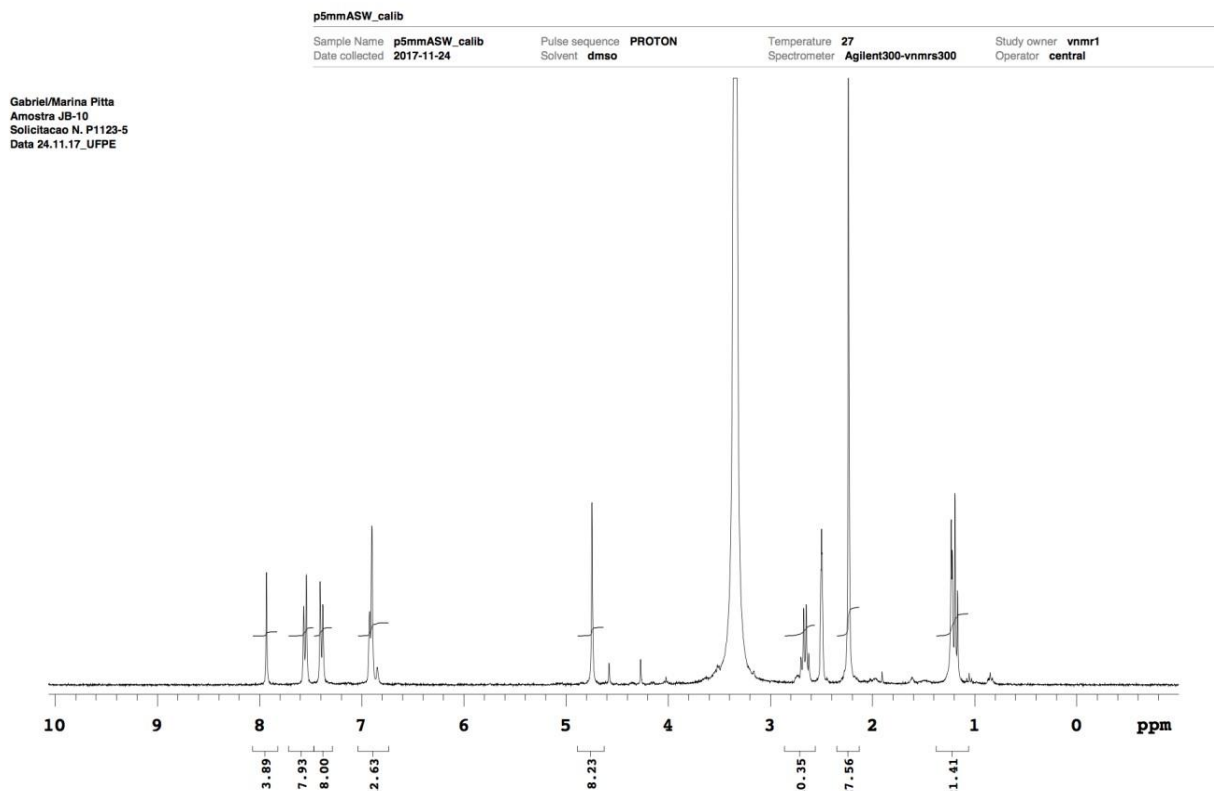


MALDI TOFF

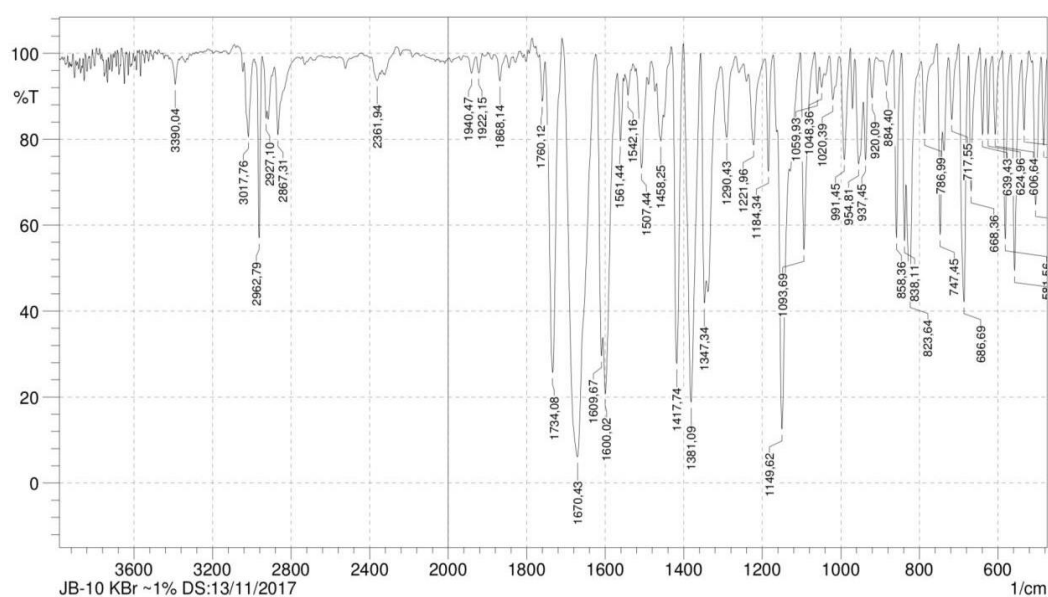
Line#:2 R.Time:22.3(Scan#:2071)
RawMode:Single 22.3(2071) BasePeak:119(46738)
BG Mode:23.2(2183) Group 1 - Event 1



Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

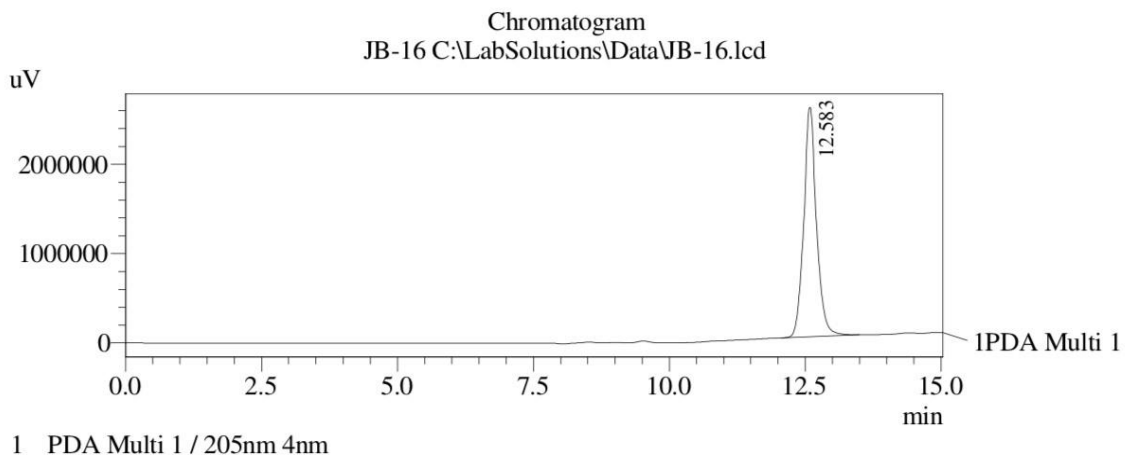


Espectro de Infravermelho



JB – 16

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

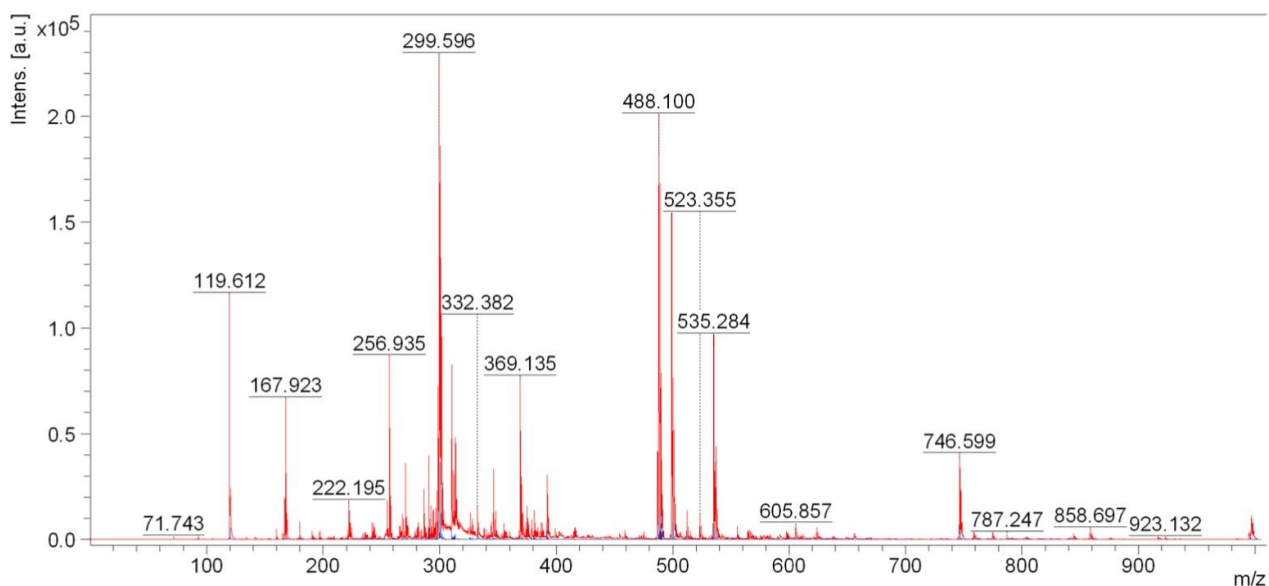


PeakTable

PDA Ch1 205nm 4nm

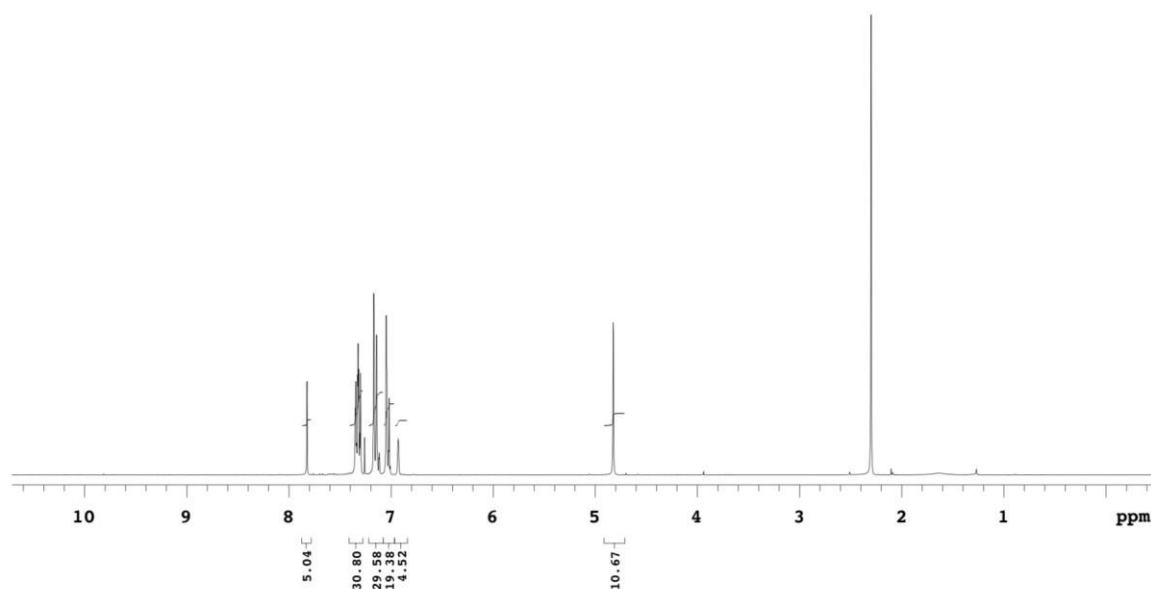
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	12.583	41916049	2568791	100.000	100.000
Total		41916049	2568791	100.000	100.000

MALDI TOFF

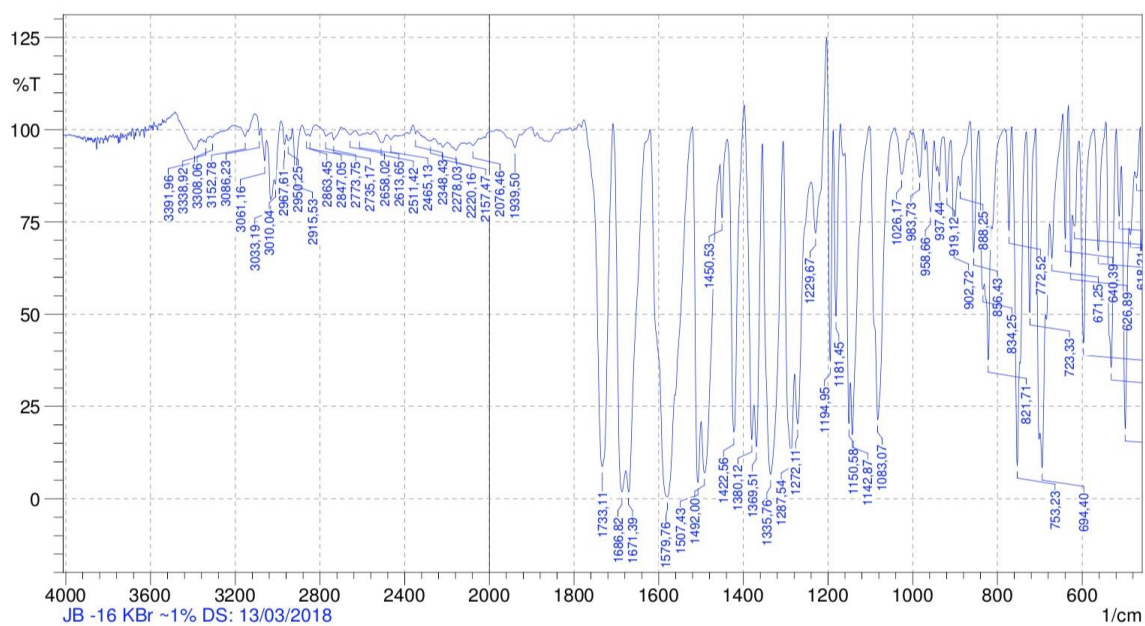


Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

Douglas/PROF. MARINA PITTA
Amostra JB 16
Solicitacao N.Q0426_34
Data 15.05.18_UFPE

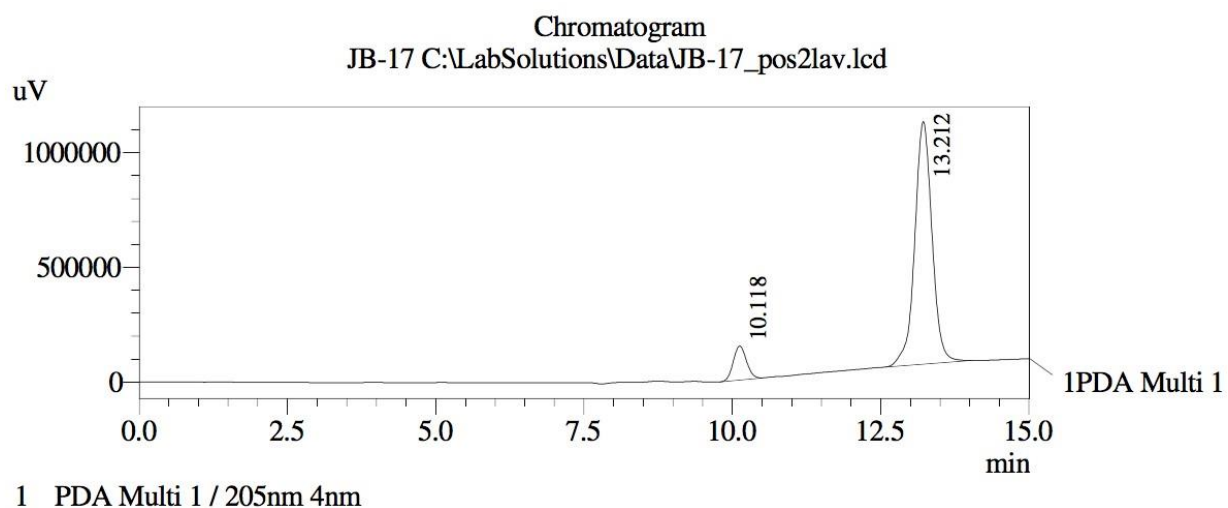


Espectro de Infravermelho

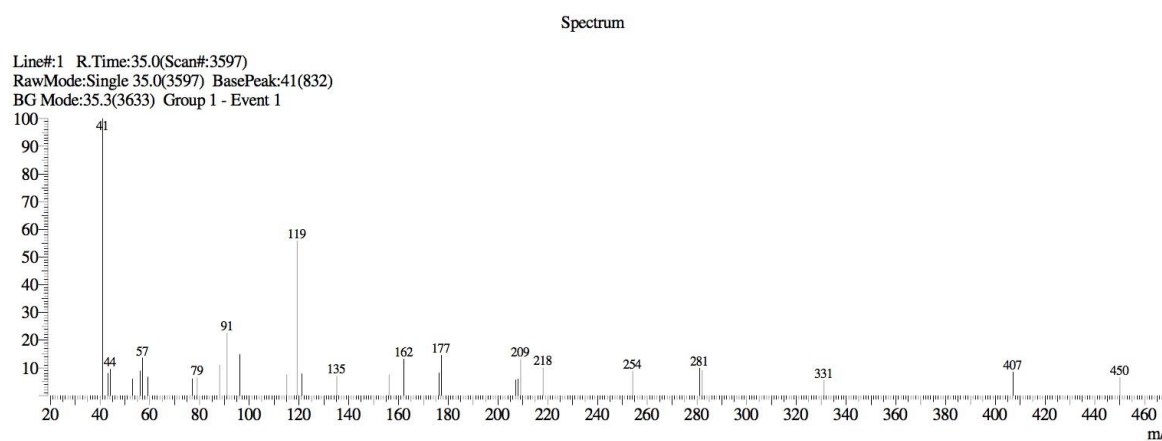


JB - 17

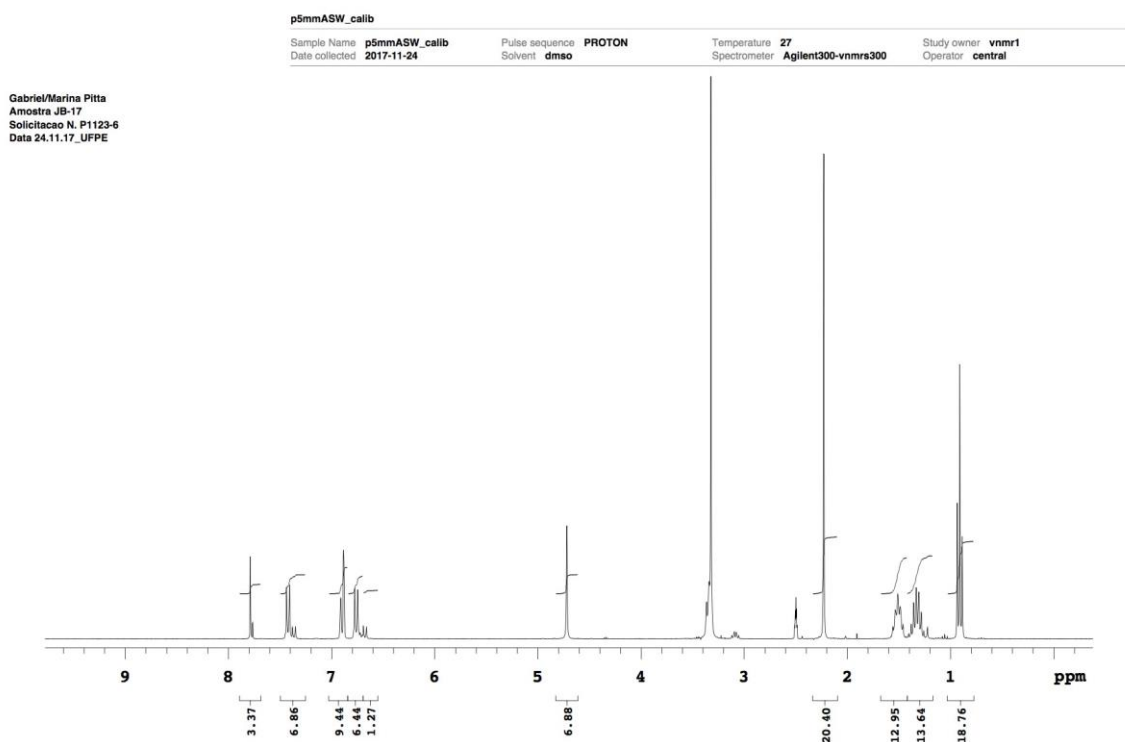
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência



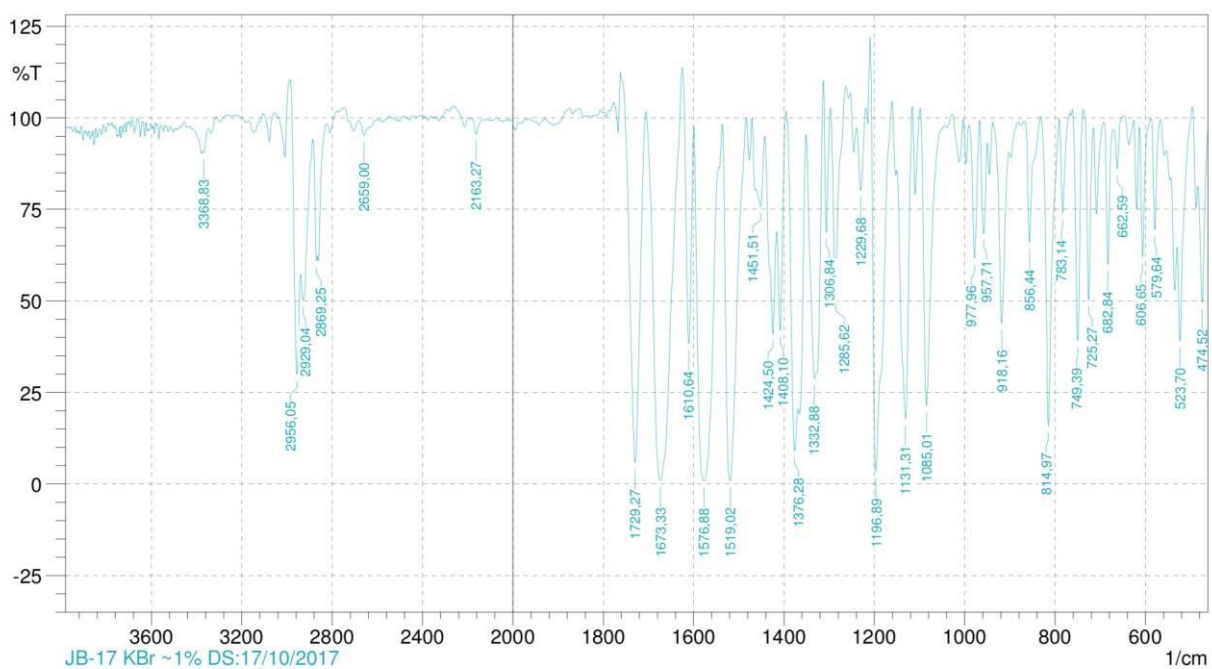
MALDI TOFF



Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

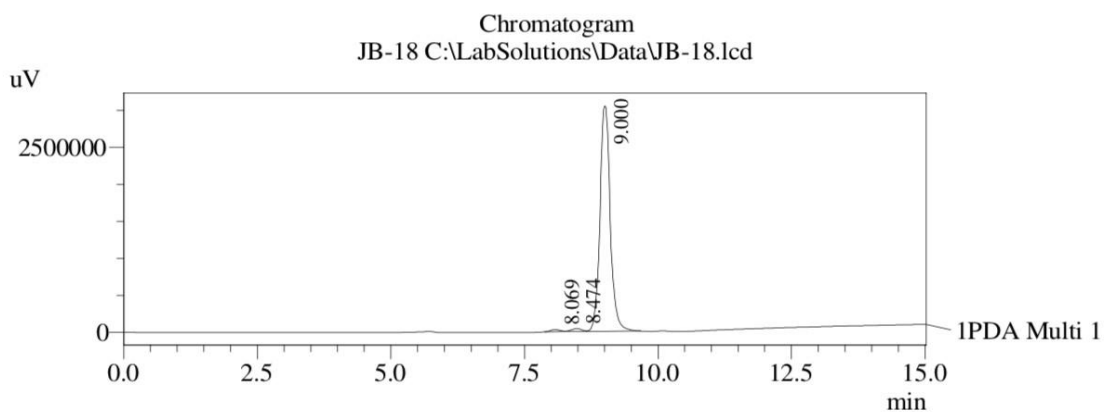


Espectro de Infravermelho



JB – 18

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência



1 PDA Multi 1 / 205nm 4nm

PeakTable

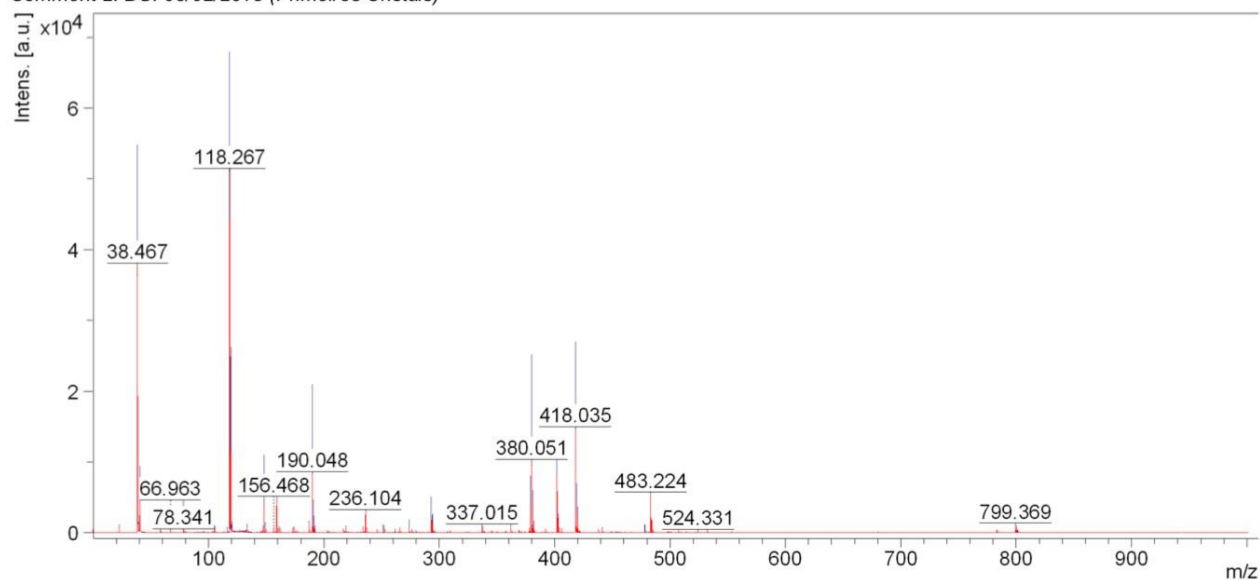
PDA Ch1 205nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.069	381721	29994	0.913	0.962
2	8.474	558770	40726	1.337	1.306
3	9.000	40859103	3046645	97.750	97.731
Total		41799594	3117366	100.000	100.000

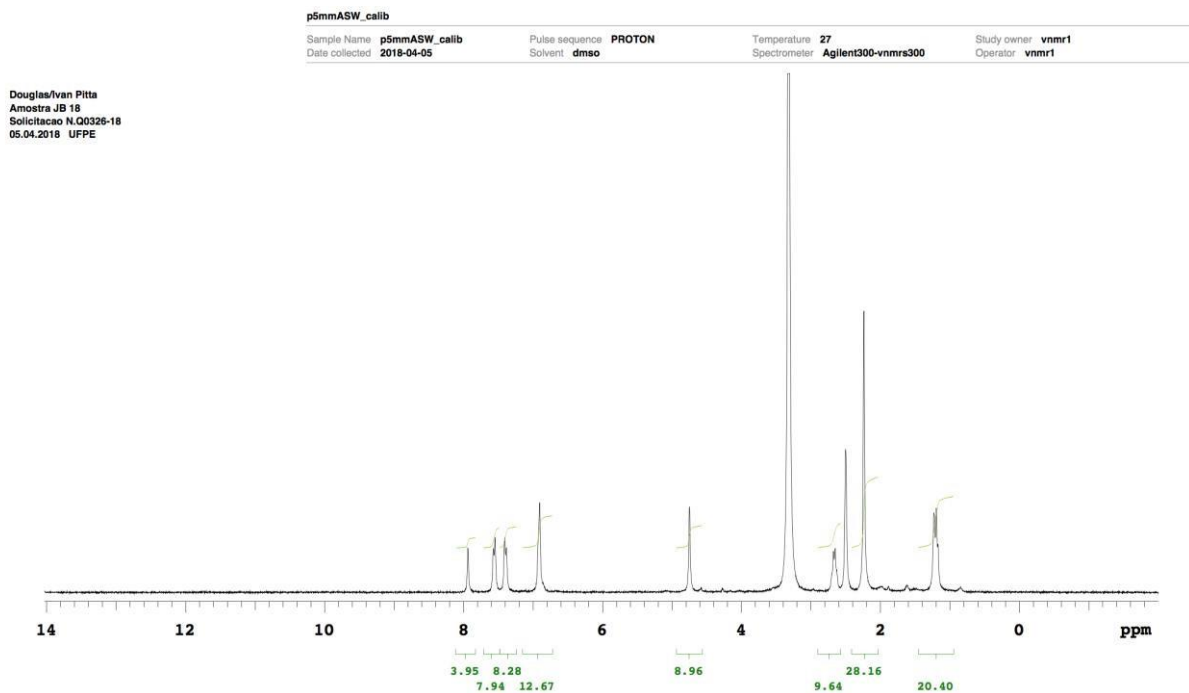
MALDI TOFF

Comment 1: JB-18 - PM:380.12

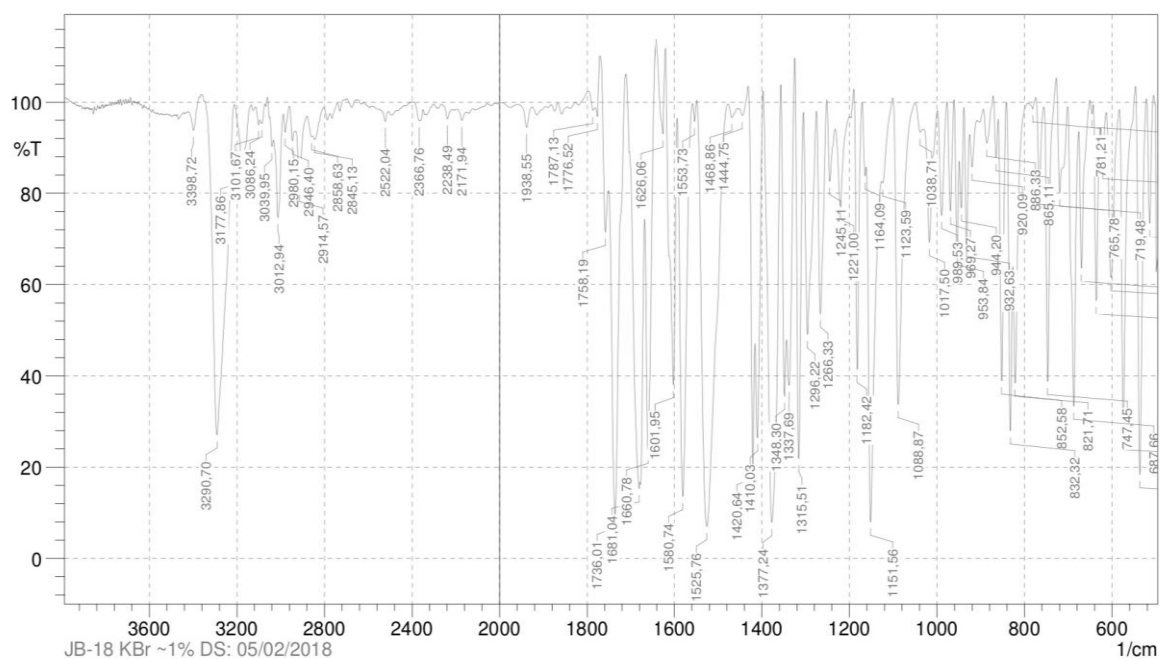
Comment 2: DS. 05/02/2018 (Primeiros Cristais)



Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

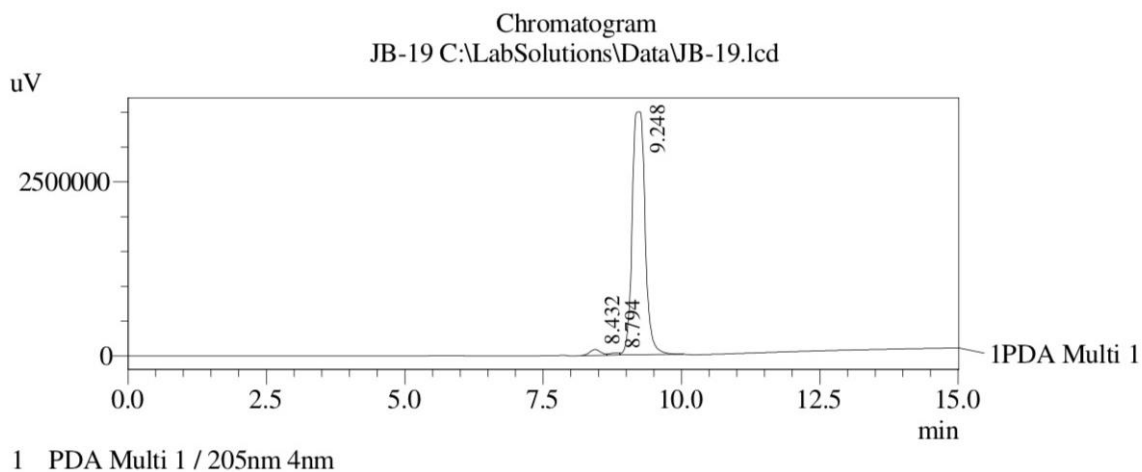


Espectro de Infravermelho



JB 19

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

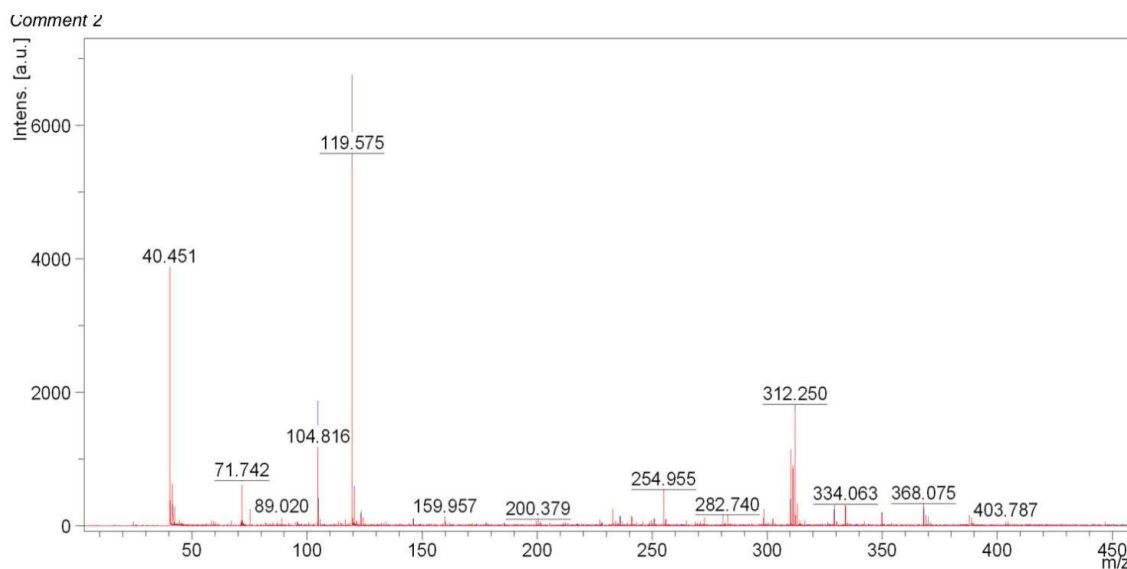


PeakTable

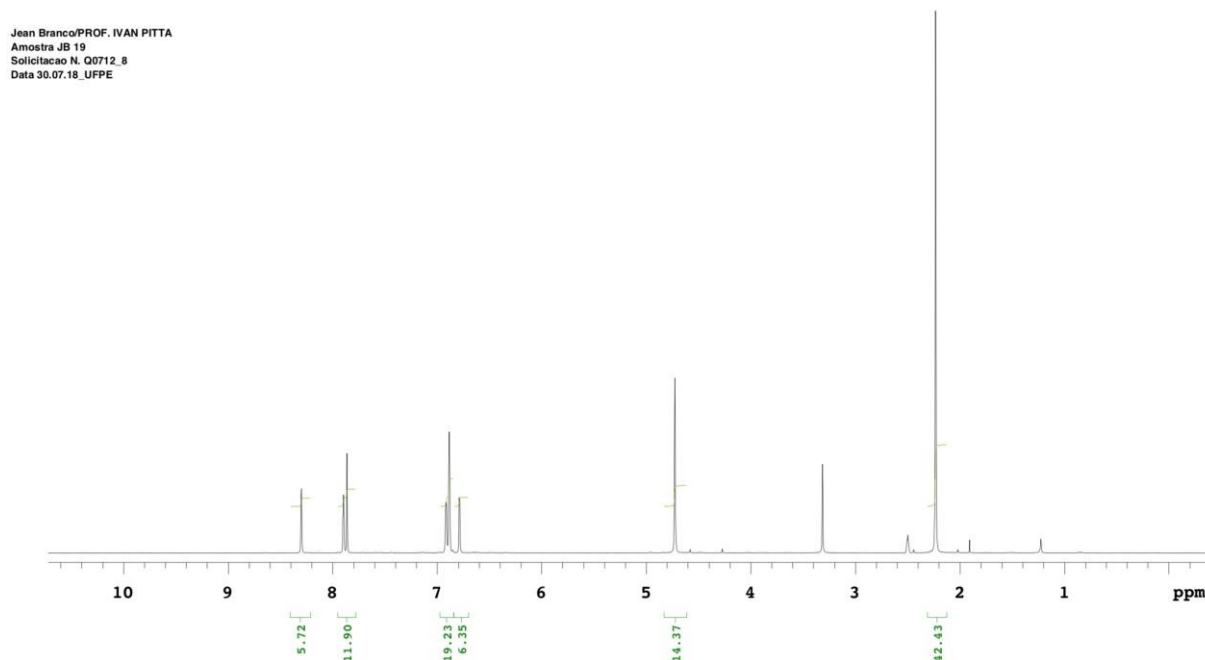
PDA Ch1 205nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.432	1156708	83491	1.986	2.315
2	8.794	365933	31113	0.628	0.863
3	9.248	56717507	3491421	97.386	96.822
Total		58240148	3606025	100.000	100.000

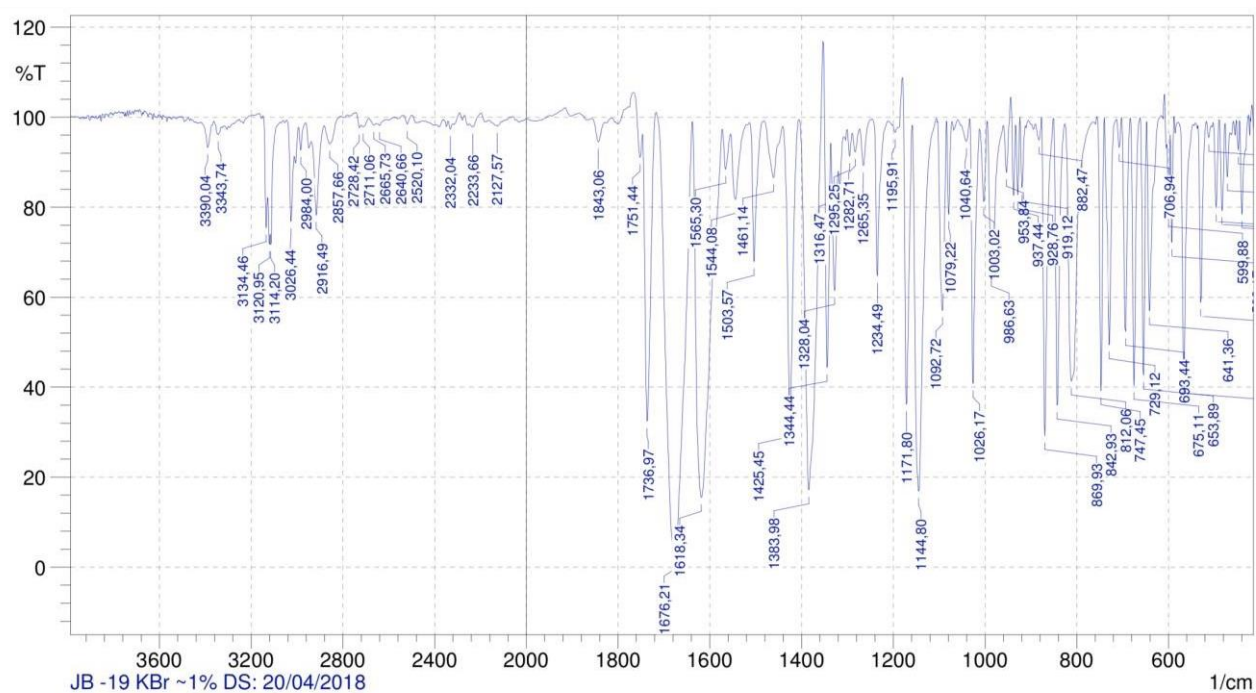
MALDI TOFF



Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

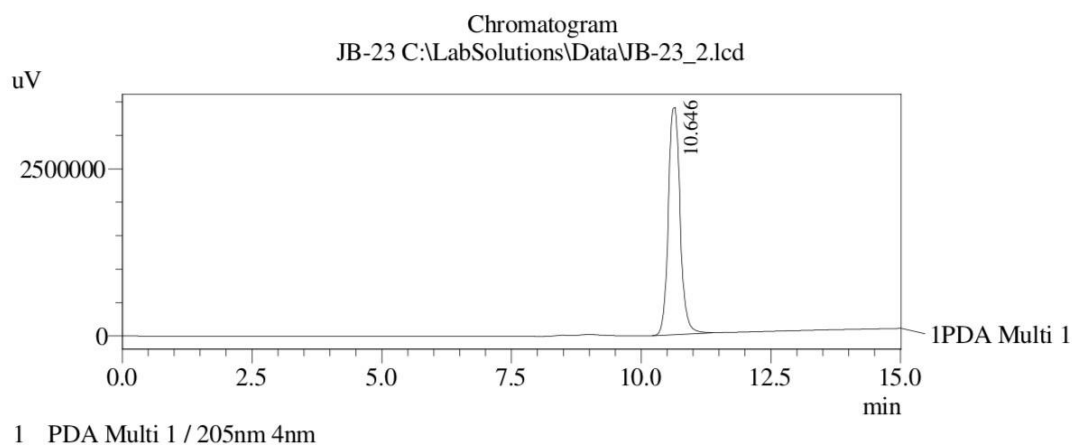


Espectro de Infravermelho



JB 23

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

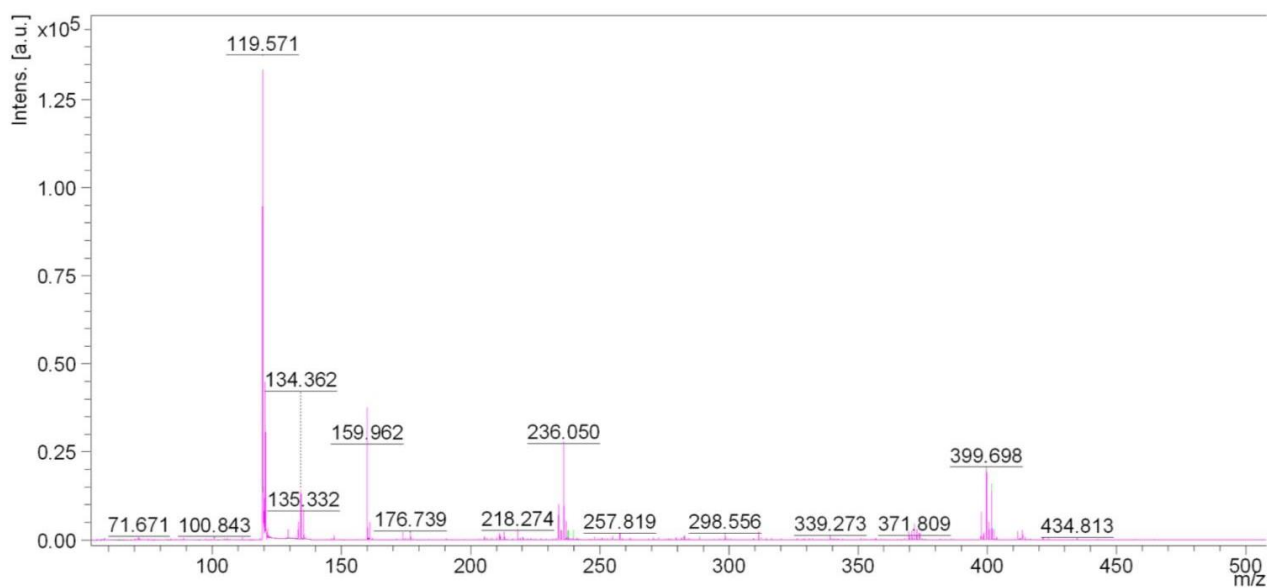


PeakTable

PDA Ch1 205nm 4nm

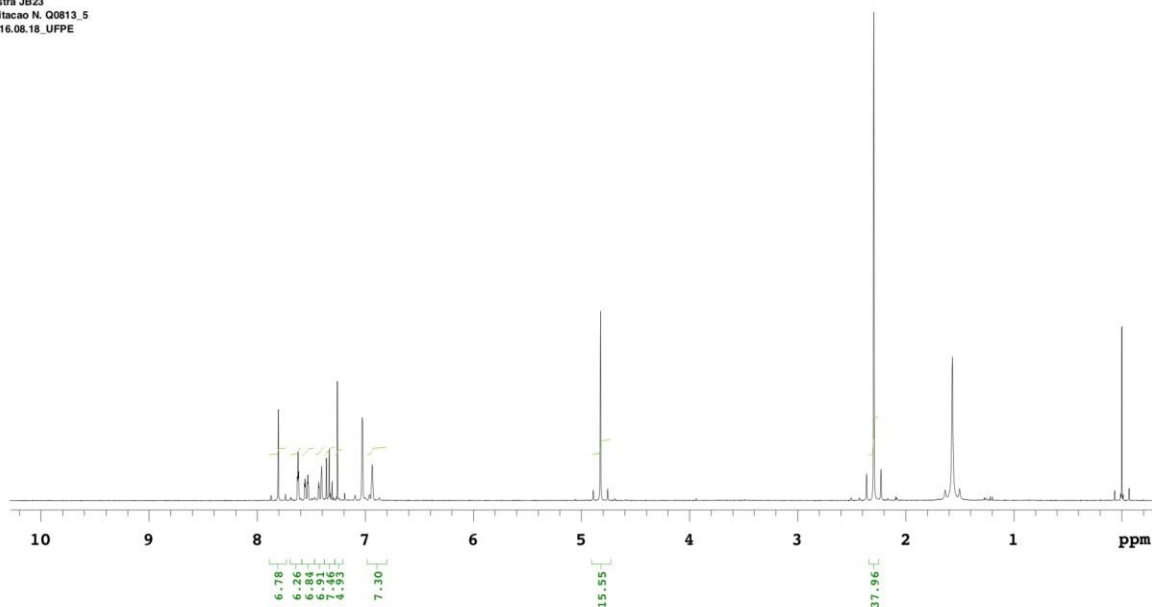
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	10.646	53687044	3398934	100.000	100.000
Total		53687044	3398934	100.000	100.000

MALDI TOFF

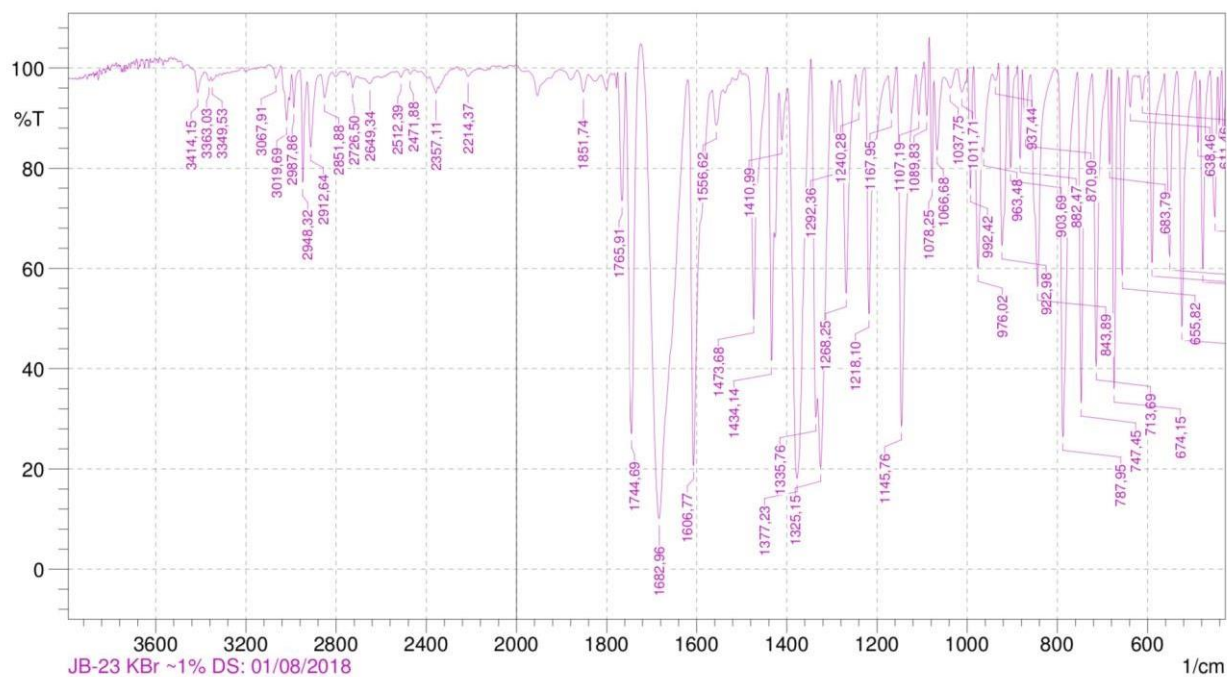


Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

Douglas Viana/PROF. MARINA PITTA
Amostra JB23
Solicitação N. 00813_5
Data 16.08.18_UFPE

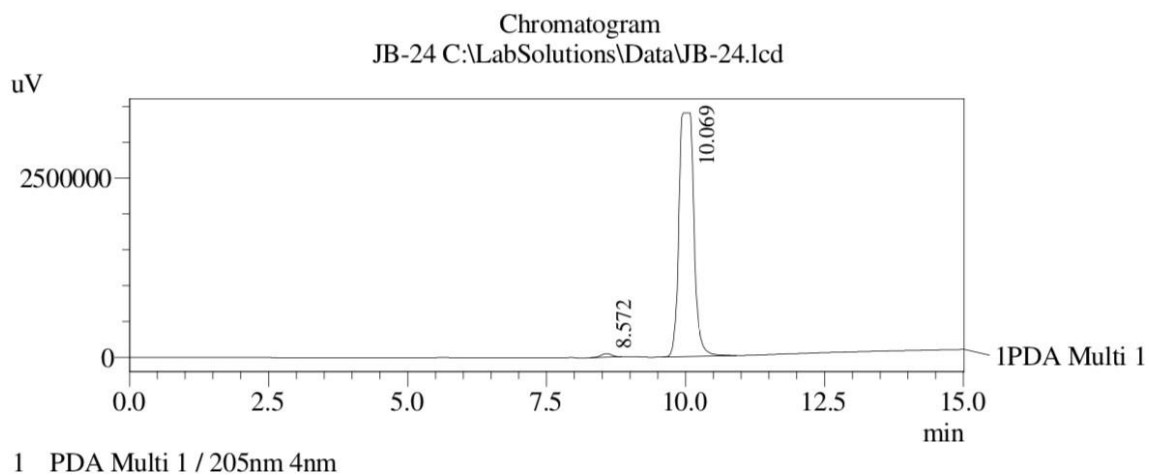


Espectro de Infravermelho



JB 24

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

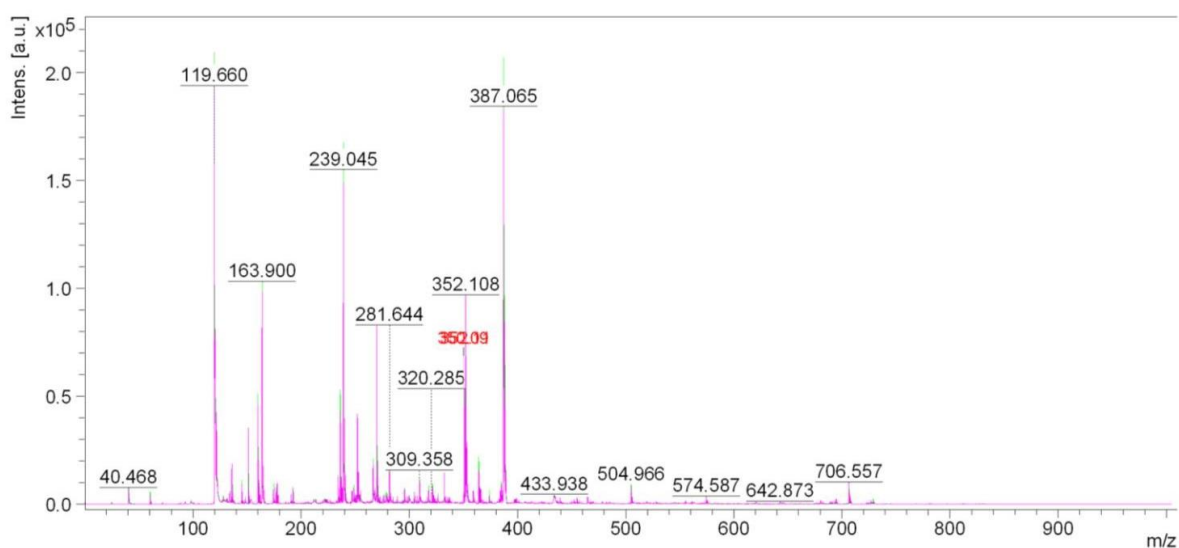


PeakTable

PDA Ch1 205nm 4nm

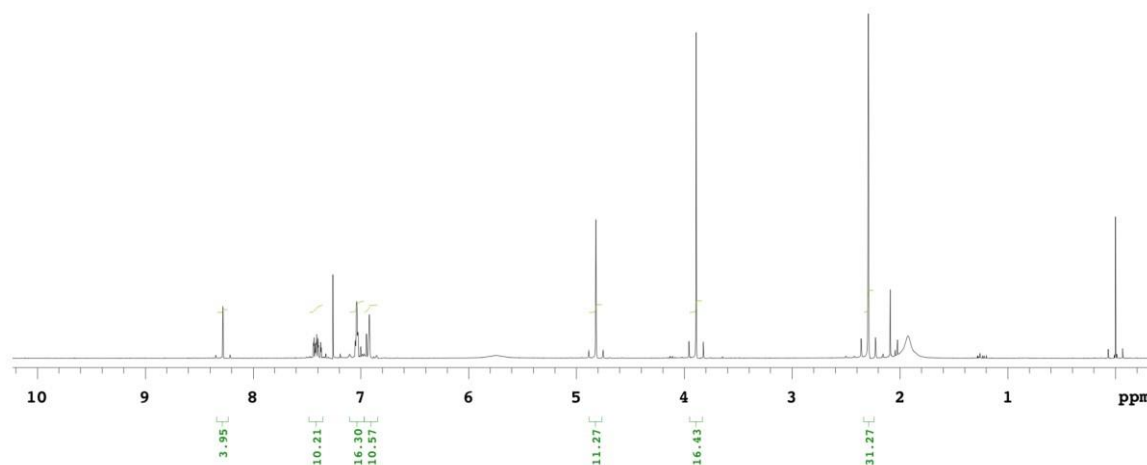
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.572	692931	50109	1.086	1.454
2	10.069	63128958	3396555	98.914	98.546
Total		63821889	3446664	100.000	100.000

MALDI TOFF

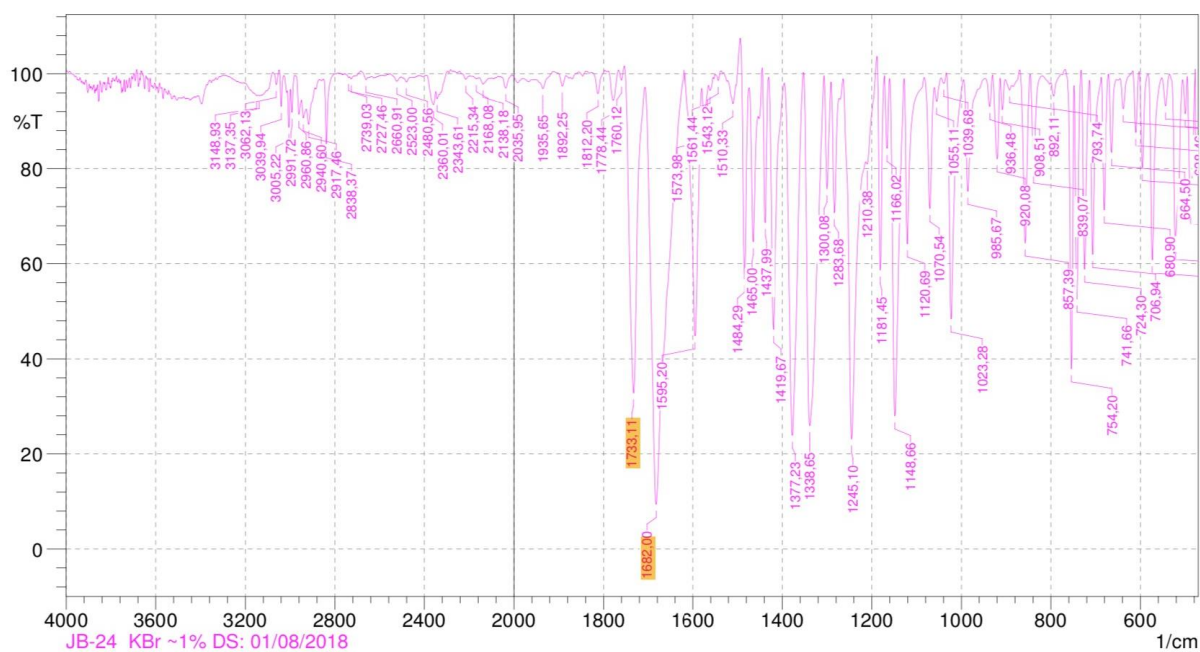


Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

Douglas Viana/PROF. MARINA PITTA
Amostra JB24
Solicitacao N. Q0813_6
Data 16.08.18 _UFPE

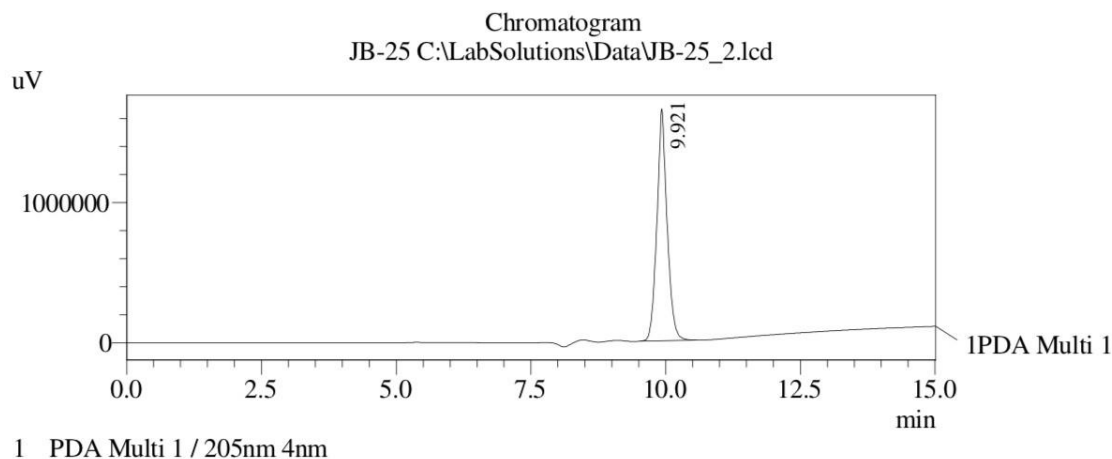


Espectro de Infravermelho



JB 25

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

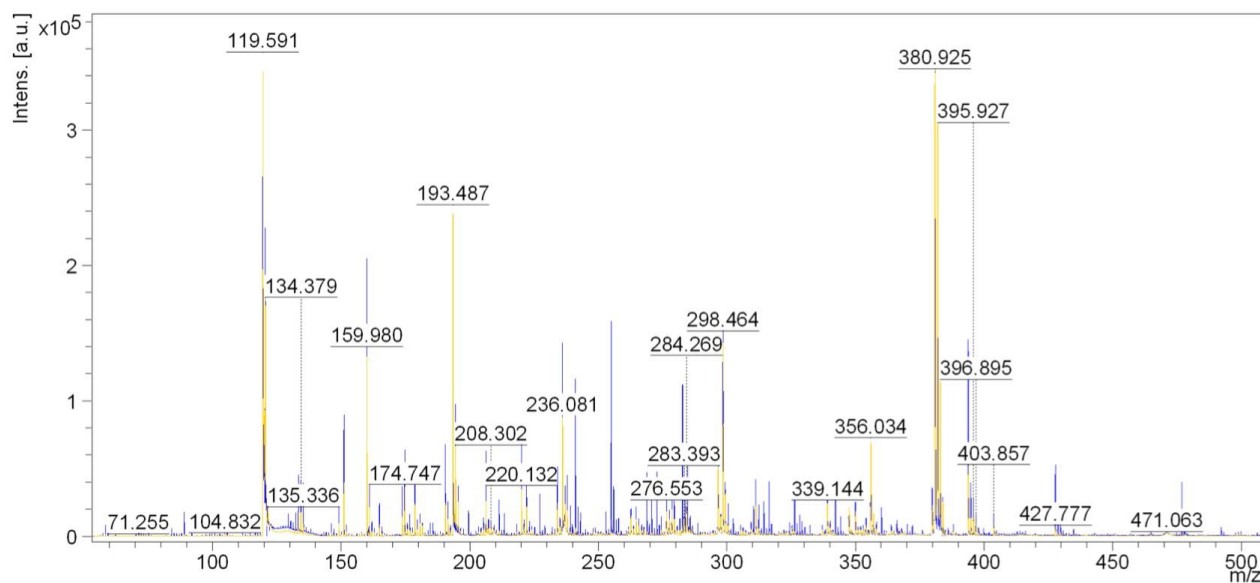


PeakTable

PDA Ch1 205nm 4nm

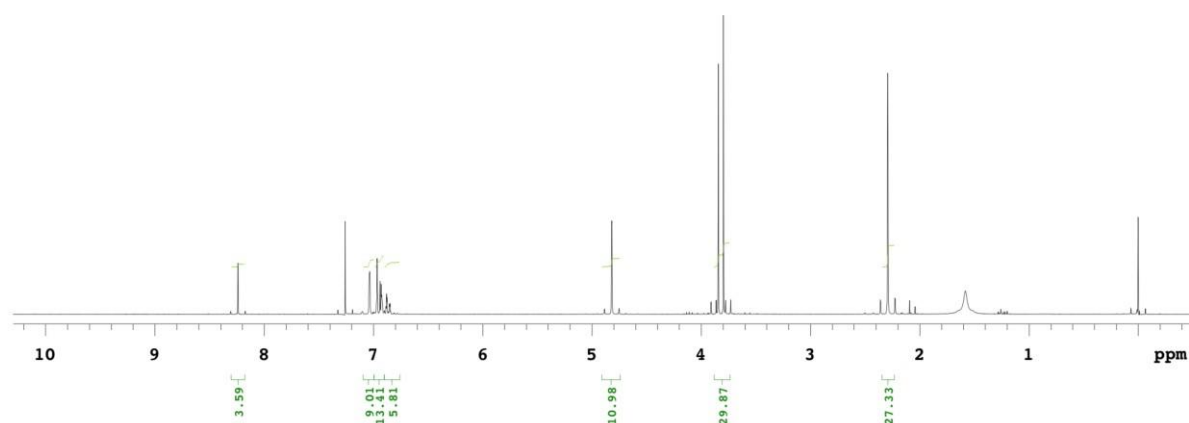
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	9.921	21740271	1655726	100.000	100.000
Total		21740271	1655726	100.000	100.000

MALDI TOFF



Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

Douglas Viana/PROF. MARINA PITTA
 Amostra JB25
 Solicitação N. Q0813.7
 Data 16.08.18_UFPE



Espectro de Infravermelho

