

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E DOS POSSÍVEIS MECANISMOS DE
AÇÃO DE NOVOS DERIVADOS 4-TIAZOLIDINONAS**

Aluna: Maria do Desterro Rodrigues
Orientadora: Prof^a. Dra. Silene Carneiro do Nascimento
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Gardênia Carmem Gadelha Militão

RECIFE, 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E DOS POSSÍVEIS MECANISMOS DE
AÇÃO DE NOVOS DERIVADOS 4-TIAZOLIDINONAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do título
de Mestre em Ciências Biológicas.

Aluna: Maria do Desterro Rodrigues
Orientadora: Prof^a. Dra. Silene Carneiro do Nascimento
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Gardênia Carmem Gadelha Militão

RECIFE, 2013

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

R696a Rodrigues, Maria do Desterro

Avaliação da atividade citotóxica e dos possíveis mecanismos de ação de novos derivados 4-tiazolidinonas / Maria do Desterro Rodrigues. – Recife: O Autor, 2013.

63 f. : il., fig. tab.

Orientadora: Silene Carneiro do Nascimento

Coorientador: Gardênia Carmem Gadelha Militão

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2013.

Inclui bibliografia e anexo

1. Farmacologia 2. Toxicologia 3. Tiazóis I. Nascimento, Silene Carneiro do (orientadora) II. Militão, Gardênia Carmem Gadelha (coorientador) III. Título.

615.1

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2013-165

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTOXICA E DOS POSSÍVEIS MECANISMOS DE
AÇÃO DE NOVOS DERIVADOS 4-TIAZOLIDINONAS**

MARIA DO DESTERRO RODRIGUES

Banca examinadora

Titulares:

Prof^a. Dra. Silene Carneiro do Nascimento – UFPE
Orientadora – Membro interno

Prof^a. Dra. Ana Luiza Muccillo-Baisch - UFRS
Membro externo

Prof^a Dra. Gláucia Manoela de Souza Lima - UFPE
Membro externo

Suplentes:

Prof^a. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia - UFPE
Membro interno

Prof^a. Dra. Maria Bernadete de S. Maia – UFPE
Membro externo

Dedico

*A minha mãe Maria do Socorro
Rodrigues (In memorian) por todo
amor e pela minha formação. E aos
meus filhos, João Vítor Rodrigues
Rocha, João Paulo Rodrigues Rocha e
João Guilherme Rodrigues Rocha por
todo amor, alegria e por ser a
inspiração para tudo que faço.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos concedidas e por todas as pessoas maravilhosas que tem colocado em meu caminho;

A Dr^a. Prof^a. Silene Carneiro do Nascimento, por todos os ensinamentos profissionais e acadêmicos, pelo exemplo de força e determinação, pela amizade, por todo apoio e por me dar a oportunidade de crescimento profissional;

A Dr^a. Prof^a. Teresinha Gonçalves da Silva, pelo apoio, pela oportunidade, pela amizade e pelos muitos ensinamentos;

A Dr^a. Prof^a. Gardênia C. Gadelha Militão, pelo exemplo de disciplina, determinação e competência, pela paciência, por todos os ensinamentos, apoio e toda ajuda no desenvolvimento deste trabalho;

Ao Dr^o Prof^o. José Gildo Lima, por sintetizar e ceder as moléculas utilizada neste trabalho;

A Dr^a. Prof^a. Norma Gusmão, que desde o início acreditou e torceu por mim, pelo incentivo, por me fazer enxergar novos horizontes;

Aos meus pais, Luiz Rodrigues do Nascimento e em especial a minha mãe Maria do Socorro Rodrigues (*In memórian*), por todo amor e exemplo de determinação, força e fé;

Aos meus filhos, Vítor, Paulo e Guilherme por todo amor e carinho, pela compreensão nos momentos de ausência e por serem a minha inspiração maior;

As minhas irmãs, pelo amor, amizade, incentivo, e pela força e apoio em todos os momentos;

A Suely Cavalcanti, pela amizade de tantos anos, por sempre me apoiar quando mais preciso;

A Suzete Mendonça e a Glória Alencastro pelo carinho, amizade e por sempre torcerem por mim;

A secretária do Dept^o. de Antibióticos, Maria Betânia, pela amizade e pela presteza em me atender;

A todos que fazem ou fizeram parte do LBPF: Sandrine Arruda, Fernanda Mota, André Luís, Flávia Raquel, Jaciana Aguiar, Jailson, Eduardo Henrique, Temístocles, Vítor, Isla, Sandra, Bruno, Ingrid, Carlson Júnior, Paulo, Paulo Bruno, Laís, Laís Emanuele, Elizabeth, Simone, Tony, Ada, Aline, Iane, Iza, Anne, Tatiane, Larissa, e em especial a Jeyce Kelle pelos muitos momentos vividos, de trabalho, de descontração, de ajuda e companheirismo;

A todos meus amigos que passaram pelo laboratório de cultura de células, que me serviram de inspiração e por quem guardo imenso carinho: Raquel Querino, Onaldo Guedes, Paloma Lis, Lúcio, Joabe, Hercília Rolim, Noêmia Pereira, Jaqueline, Patrícia Pires e outros tantos;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro;

A todos que de algum modo contribuíram para a realização de mais um sonho, meu agradecimentos.

RESUMO

Os compostos **4** - tiazolidinonas tem despertado grande interesse pela sua diversidade estrutural e descoberta de um grande número de atividades biológicas. O presente estudo avaliou a atividade citotóxica de novos derivados de 4- tiazolidinonas dos quais seis foram considerados ativos com percentual de inibição de crescimento celular superior a 75% pelo teste do MTT. Os compostos foram testados nas seguintes linhagens de células tumorais humanas: NCI-H 292 (carcinoma mucoepidermóide de pulmão); HT – 29 (carcinoma humano do cólon, HEp – 2 (carcinoma epidermóide de laringe); HL- 60 (leucemia promielocítica aguda) e K562 (leucemia mielocítica crônica). Nos seis compostos considerados ativos foi realizado o estudo da concentração que inibe 50% do crescimento celular (IC_{50}) em sete concentrações seriadas que variaram de 0,39 a 25 $\mu\text{g/mL}$. O análogo 2-[(2-piridinyl-metileno)hydrazono]-4-thiazolidinonas (composto 2) apresentou melhores resultados com valores de IC_{50} entre 0,5 e 3,3 $\mu\text{g/mL}$ nas linhagens testadas e por esse motivo foi escolhido para prosseguir com o estudo sobre mecanismo de morte celular frente à linhagem de células tumorais HL-60, na qual apresentou menor valor de CI_{50} no tempo de 48 h ($CI_{50} = 3,04 \mu\text{g/mL}$). A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo e apresentou CI_{50} de 48 horas igual a 0,03 $\mu\text{g/mL}$. O composto em estudo não apresentou atividade hemolítica frente a eritrócitos de camundongos apresentando concentração efetiva - $EC_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$, sugerindo uma citotoxicidade por mecanismo de ação mais específico. No teste do Azul de Tripán foi observado que após 48 horas de incubação houve redução do número de células viáveis com percentual de inibição de 72,22% na concentração de 3 $\mu\text{g/mL}$ e de 91,08% para a concentração de 6 $\mu\text{g/mL}$. A análise morfológica após coloração May- Grunwald- Giemsa indicou alterações celulares típicas de células em processo de apoptose (membrana íntegra, redução do volume celular, núcleo picnótico e cromatólise). A integridade da membrana celular e a fragmentação do DNA foram avaliadas por citometria de fluxo. Foi observado na concentração de 6 $\mu\text{g/mL}$ que um grande percentual de células apresentou fragmentação do DNA e que pequeno número de células apresentou redução da integridade da membrana celular. Estes dados sugerem um mecanismo citotóxico por indução da via apoptótica e apontam o potencial citotóxico do composto 2.

Palavras –chave: Citotoxicidade, 4- Tiazolidinonas, Apoptose

ABSTRACT

The 4 - thiazolidinones are compounds that have attracted great interest for their structural diversity and a wide range of biological activities. The present study evaluated the cytotoxic activity of twenty new 4 - thiazolidinones derivatives. Six compounds were considered active with cell growth inhibition by 75% to 100%. The compounds were tested on the following human tumor cell lines: NCI H-292, HT – 29, Hep - 2, HL-60 and K562. The compound 2-[(2-piridinyl-metileno) hydrazono]-4-thiazolidinone showed better results with IC₅₀ values between 0.5 to 3.3 µg/mL and for this reason was chosen for further study on the mechanism of cell death on HL-60. The test compound showed no hemolytic activity against mice erythrocytes (EC₅₀ > 250µg/mL) suggesting a more specific mechanism of cytotoxicity. On trypan blue exclusion test there was a reduction on viable cell number after 48 hours of incubation (72.22%) at a concentration of 3µg/mL and (91.08%) at 6 µ/mL. Morphological analysis after May-Grunwald-Giemsa staining indicated cellular changes typical of cells undergoing apoptosis (intact membrane, decrease of cell volume, and chromatolysis core picnotic). The integrity of the cell membrane and DNA fragmentation was assessed by flow cytometry. DNA fragmentation was observed after 48 h treatment while no significant reduction on cell membrane integrity was found at 6 µ/mL. These data suggest that HL60 cells undergo apoptosis after treatment with compound 2.

Keywords: Cytotoxicity, 4 - thiazolidinones, Apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1	Etapas da carcinogênese	16
Figura 2	Características marcantes do câncer	17
Figura 3	Vias de transdução de sinais da apoptose	23
Figura 4	Estrutura química do anel 4- tiazolidinonas	24

LISTA DE TABELAS

	Pág
Tabela 1 Principais diferenças morfológicas entre apoptose e necrose.	21

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 Geral	14
2.2 Específicos	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 Câncer: Aspectos Gerais	15
3.1.1 Carcinogênese	15
3.1.1.1 Etapas da carcinogênese	16
3.1.2 Características Marcantes do Câncer	16
3.1.3 Morte Celular	19
3.1.3.1 Senescência	19
3.1.3.2 Catástrofe Mitótica	19
3.1.3.3 Necrose	20
3.1.3.4 Autofagia	20
3.1.3.5 Apoptose	20
3.1.3.5.1 Vias de Transdução de sinais da apoptose	21
3.1.4 Tratamento contra o câncer	23
3.1.5 Compostos derivados das 4- tiazolidinonas	24
3.1.5.1 Atividades biológicas das 4-tiazolidinonas	24
REFERÊNCIAS	28

CAPÍTULO II

4. ARTIGO CIENTÍFICO I - Synthesis, Cytotoxic and Antimicrobial activities of 5-benzylidene-2-[pyridine-2-ylmetthylene]hidrazono]-thiazolidine-4-one Derivatives.	34
5. ARTIGO CIENTÍFICO II - Evaluation of Cytotoxic Activity of derivatives 4-thiazolidinones.	40
6. CONCLUSÕES	57
ANEXO - Normas da Revista Anticancer Research	58

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um conjunto de mais de 100 doenças que pode ocorrer nos diversos tecidos do organismo em razão de alterações patológicas ocorridas na informação contida no DNA através de mutações na expressão dos genes que codificam as proteínas envolvidas no controle da proliferação e da diferenciação celular ou comprometidas com mecanismos de reparo do DNA. Como consequência, as células adquirem as principais características de células cancerígenas que são: a autossuficiência em sinais de crescimento; insensibilidade aos inibidores de crescimento; evasão da morte celular programada (apoptose); potencial de replicação ilimitado; capacidade para desenvolver novos vasos sanguíneos (angiogênese); invasão tecidual e capacidade de migração ou metástase (HANAHAHAN & WEINBERG, 2000; INCA, 2012).

Nas últimas décadas, o câncer se tornou um evidente problema de saúde pública mundial dada sua crescente importância como causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo constituindo a segunda causa de morte. No Brasil em 2012 foi previsto a ocorrência de mais de 500 mil novos casos. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2030, estão previstos 27 milhões de casos incidentes de câncer com 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas portadoras de câncer. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixa e média renda. A maioria dos casos, cerca de 80%, está relacionada ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de uma sociedade, onde encontramos um grande número de fatores de risco. As causas internas são, em grande parte, geneticamente pré-determinadas, e estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas (INCA, 2012).

A terapia adotada para o tratamento do câncer envolve remoção cirúrgica do tumor, quimioterapia ou radioterapia. O uso das drogas antineoplásicas tem proporcionado aumento da sobrevida dos pacientes portadores de neoplasias diversas. Sabe-se, no entanto, que a exposição mais prolongada a essas drogas aumenta o risco de efeitos colaterais em diferentes órgãos e tecidos (CHAVES et al, 2007).

A oncologia experimental contribui de forma relevante para busca de novos fármacos que proporcionem tratamentos mais eficazes contra o câncer e que produzam menos efeitos colaterais permitindo o estudo dos diversos aspectos relacionados aos processos neoplásicos e possibilitando a realização de experimentos *in vivo* e *in vitro*, através de testes de substâncias de origem vegetal, animal, microbiana ou de síntese. Os compostos contendo o anel 4 - tiazolidinonas possuem grande interesse científico por apresentarem um amplo espectro de atividades biológicas sendo relatadas

como potenciais agentes antimicrobianos, anti-virais, anti-inflamatórios, antiprotzoários e antitumoral

(RAWAL et al, 2008; KUCUKGZEL et al, 2006; VERÇOZA et al, 2009; VIGORITA et al, 2001; KUCUKGUZEL et al, 2002; FEITOZA et al, 2012; KAVITHA et al, 2006; WANG et al, 2012; HAVRYLYUK et al, 2009; HAVRYLYUK et al, 2010).

Em pesquisa recente foi demonstrado que o derivado 5-benzidileno- 4- tiazolidinona apresentou resultados promissores em estudos antiproliferativos preliminares, realizados em células NCI-H 292 (carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano) apresentando resultados relevantes quanto à citotoxicidade (FEITOZA et al, 2012).

Desse modo, este trabalho apresenta o estudo da atividade citotóxica com alguns derivados contendo o heterocíclico 4- tiazolidinona, visando investigar o seu potencial antiproliferativo e alguns dos possíveis mecanismos de ação pela investigação da atividade citotóxica, atividade hemolítica, e da verificação de possíveis efeitos apoptóticos dos compostos analisados.

2. OBJETIVOS

2.1 Gerais

- ✓ Investigar o potencial antitumoral e possíveis mecanismos de ação de novos derivados 4-tiazolidinonas.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a citotoxicidade de derivados 4 – tiazolidinona em linhagens de células tumorais;
- ✓ Investigar a ocorrência de atividade hemolítica das substâncias testadas;
- ✓ Investigar indícios de morte celular por apoptose através da análise morfológica;
- ✓ Investigar a fragmentação do DNA e integridade da membrana.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 – CÂNCER: ASPECTOS GERAIS

O câncer é uma doença genética que pode ocorrer nos diversos tecidos do organismo em razão de mudanças patológicas ocorridas na informação contida no DNA. Essas mutações promovem alterações na expressão dos genes que codificam as proteínas envolvidas no controle da proliferação e da diferenciação celular ou envolvidas nos mecanismos de reparo do DNA (SMYTH *et al.*, 2006).

3.1.1. CARCINOGENESE

O desenvolvimento do câncer ocorre através de um processo dinâmico que acontece por etapas determinadas de múltiplos estágios da carcinogênese, podendo ser considerado em três estágios: iniciação, promoção e progressão (figura 1) (HARRIS, 1991). A primeira etapa é a iniciação onde há a ocorrência de danos ao DNA pela exposição de uma população de células ao carcinógeno, causando mutações genéticas que constituem o primeiro passo para o desenvolvimento neoplásico (JAKÓBISIAK *et al.*, 2003).

Eficientes mecanismos de controle acontecem em tecidos de células normais, quando são detectados danos ao DNA promovendo a destruição das células danificadas para evitar a progressão maligna. O gene p53, supressor de tumor, impede a proliferação de células mutadas, desse modo, as mutações ocorridas nos genes supressores de tumor permitem que as células mutadas prossigam no ciclo celular (FOSTER, 2008). A segunda etapa da carcinogênese é a promoção, definida como um processo de expressão clonal de células iniciadas, e que resulta na formação de células pré-neoplásicas que dão origem a pólipos, nódulos, ou papilomas. A progressão é o terceiro estágio e, compreende a fase da evolução da neoplasia maligna caracterizada pela transformação de células pré-neoplásicas em tumor maligno (JAKÓBISIAK *et al.*, 2003).

3.1.1.1 ETAPAS DA CARCINOGENÊSE

INICIAÇÃO

- Danos ao DNA;
- Indução de mutação em genes alvos críticos;
- Ativação de protooncogenes;
- Inativação de genes supressores de tumor;
- Replicação celular e fixação da mutação.

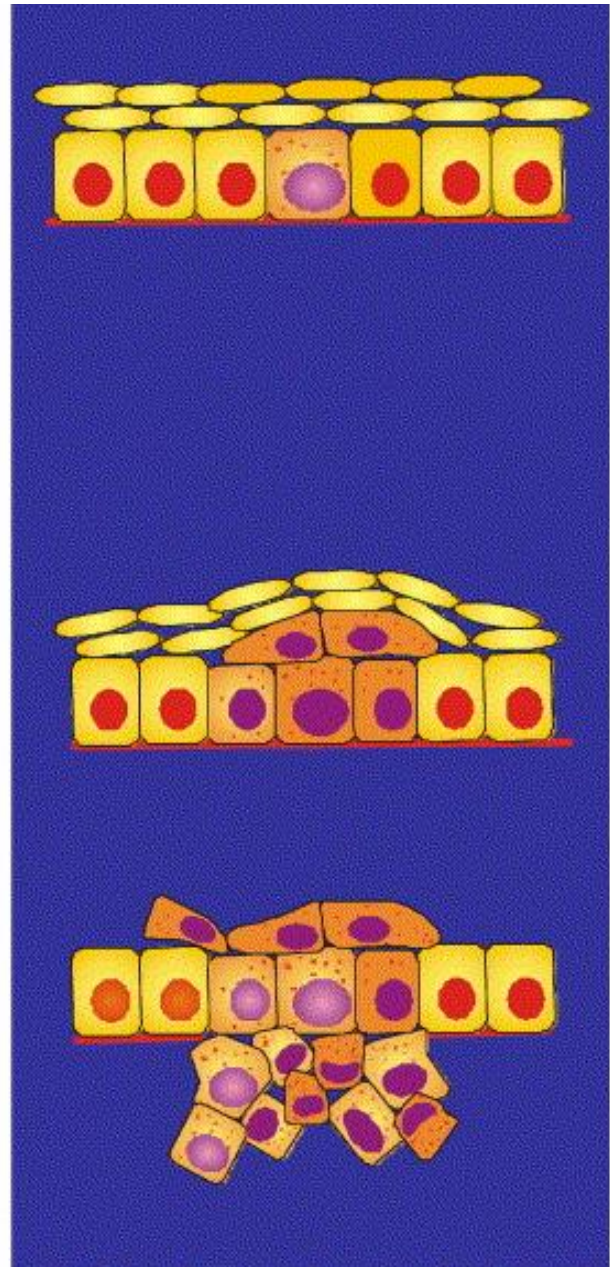
PROMOÇÃO

- Expansão clonal das células iniciadas
- Desenvolvimento do tumor benigno

PROGRESSÃO

- Expressão alterada de enzimas;
- Proteólises;
- Invasão;
- Migração;
- Metástase.

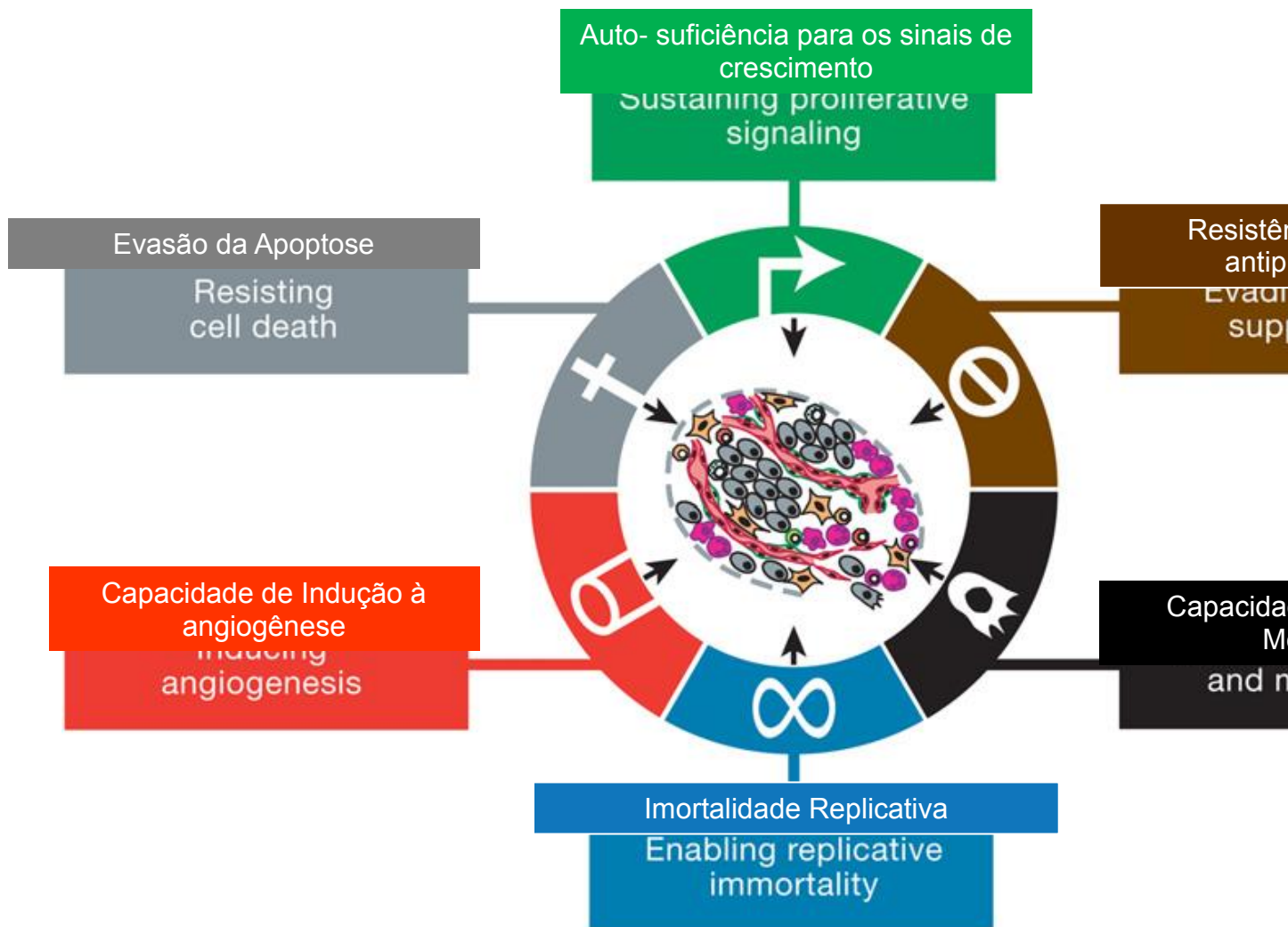
Figura 1: Etapas da carcinogênese. Fonte: Jakòbisiak, et al., Immunology Letters, 2003.



3. 1. 2. CARACTERÍSTICAS MARCANTES DO CÂNCER

Com o processo de carcinogênese as células adquirem características marcantes que determinam a formação do tumor maligno, tais como: Autossuficiência em sinais de crescimento; insensibilidade aos inibidores de crescimento; evasão da morte celular programada (apoptose); potencial de replicação ilimitado; capacidade para desenvolver novos vasos sanguíneos (angiogênese); invasão tecidual e capacidade de migração (metástase) (HANAHAAN; WEINBERG, 2000).

Figura 2. Características marcantes do câncer . Adaptado de HANAHAAN & WEINBERG, 2011)



- Auto-suficiência para sinais de crescimento

Para que células normais possam passar de um estado quiescente para um estado proliferativo ativo é necessário a presença de sinais de crescimento que são transmitidos para a célula por receptores transmembrânicos que ligam diferentes classes de moléculas sinalizadoras como fatores de crescimento, componentes da matriz extracelular e moléculas de adesão/interação célula a célula. Nas células cancerígenas o processo ocorre de maneira diferente, pois estas são auto-suficientes na sinalização dos fatores de crescimento e para isso produzem e liberam fatores de

crescimento que estimulam seus próprios receptores por sinalização autócrina e para receptores de células vizinhas por sinalização parácrina. Além disso, ocorre alteração do número, estrutura e função dos receptores de fator de crescimento, aumentando a propensão destes a enviar sinais de crescimento para o núcleo. Nessas células também há a desregulação da via de sinalização dos receptores de crescimento para que esses estejam constantemente ativados (HARRINGTON 2007; HANAHAN e WEINBERG 2000).

- Resistência aos sinais antiproliferativos

Outra característica marcante do câncer é a resistência aos inibidores de crescimento. No tecido de células normais a quiescência celular e homeostase do tecido são mantidos por vários sinais antiproliferativos, que podem bloquear a proliferação forçando as células a sair do ciclo ativo proliferativo para o estado quiescente (G_0) de onde a célula pode voltar ao ciclo ativo por sinalização extracelular. Ou ainda, os sinais antiproliferativos podem induzir as células a entrar num estágio pós-mitótico geralmente relacionado com a aquisição de características específicas associados à diferenciação (HANAHAN e WEINBERG 2000).

A via de sinalização antiproliferativa acontece principalmente pelo controle do ciclo celular sendo mediada por proteínas que incluem a retinoblastoma (Rb), ciclinas, cinases dependentes de ciclinas (CDK) e as proteínas inibidoras das cinases dependentes de ciclinas (CDKi). As células do câncer frequentemente apresentam anormalidades na sinalização antiproliferativa através de alterações nessas proteínas, sendo comum em vários tumores a perda de Rb e de membros da família CDKi ou ainda pela superexpressão de determinadas ciclinas e CDK (HARRINGTON 2007).

- Evasão da apoptose

Numa célula normal, quando ocorre um dano ao DNA, ocorre a interrupção do ciclo celular para se avaliar a possibilidade de reparo. Quando não é possível reparar o dano, a célula é induzida à apoptose, impedindo que as mutações ocorridas sejam transmitidas às células descendentes pela divisão celular. Os principais genes envolvidos na apoptose são o pró apoptótico p53 (supressor tumoral) e o Bcl-2 (oncogene) anti - apoptótico. Diferentemente do que ocorre nas células normais, as células cancerosas conseguem evadir - se da apoptose, ignorando os sinais enviados pela via extrínseca ou ainda por reconfigurar o equilíbrio das moléculas pró e anti – apoptóticas em detrimento da apoptose (HARRINGTON 2007).

- Capacidade de indução à angiogênese

O crescimento do tumor maligno está relacionado com a capacidade de um fornecimento de sangue necessitando da formação de novos vasos que é realizada pela perda do equilíbrio entre os fatores positivos pró-angiogênico e negativos anti-angiogênicos que ocorre em células do tecido normal. Nas células cancerosas há um aumento da produção das proteínas pró- angiogênicas como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e/ou por diminuir a produção das proteínas anti-angiogênicas como a trombospondina-1 (HARRINGTON 2007).

- Imortalidade replicativa

As células somáticas normais, após passar por um número finito de divisões celulares entram em senescência replicativa, isso acontece por que essas células são incapazes de replicar as extremidades dos seus cromossomos (telômeros) a cada divisão, como resultado seus telômeros sofrem encurtamento a cada ciclo celular atuando como relógios moleculares com a contagem regressiva do tempo das células. Diferentemente, as células do câncer conseguem manter a replicação dos telômeros a cada divisão celular, adquirindo desse modo a imortalidade replicativa (HARRINGTON, 2007).

- Invasão tecidual e metástase

As células malignas conseguem atravessar a membrana basal (MB) e penetrar a matriz extracelular com o objetivo de invadir estruturas adjacentes. Esse poder de invasão leva a séria consequência da produção da metástase, pois desse modo essas células também conseguem invadir vasos sanguíneos e linfáticos e serem levadas pela circulação para um tecido íntegro onde irão emigrar do vaso e proliferar. Para haver a degradação da MB é necessário a presença de enzimas proteolíticas. Nos processos de invasão e metástases, as metaloproteinases da matriz extracelular (MMP) são expressas em altos níveis e apresentam importante ação proteolítica atuando diretamente sobre os componentes da MB. Desse modo, essas enzimas são cruciais na progressão tumoral (PEREIRA, et al., 2006).

3. 1. 3. MORTE CELULAR

De acordo com o NCCD (Nomenclature committee on cell death) uma célula deverá ser considerada em processo de morte, quando apresentar qualquer uma das características morfológicas ou bioquímicas descritas a seguir: Perda da integridade da membrana, que pode ser verificada através da incorporação de corantes vitais como o Iodeto de Propídeo *in vitro*; presença de fragmentação celular e nuclear dentro de pequenos corpos (corpos apoptóticos); e ou a presença de fagossomos (KROEMER, *et al* , 2005).

A busca por estratégias para o tratamento do câncer tem gerado um grande interesse para compreender o mecanismo das vias de morte celular (SINGH *et al.*, 2010). A morte celular pode ocorrer por diferentes modos sendo classificada de acordo com as características morfológicas e bioquímicas inerentes a cada processo. Desse modo, a morte celular pode acontecer por: Senescência, Catastrófe Mitótica, Necrose, Autofagia, e Apoptose (GRIVICICH *et al.*, 2007).

3.1.3.1. Senescência

A senescência celular é definida pela perda irreversível do potencial de divisão celular das células somáticas. Constitui um processo metabólico ativo essencial para o envelhecimento. Ocorre através de um controle genético que envolve a deterioração dos telômeros e ativação de genes supressores tumorais (HAYFLICK; MOORHEAD, 1961; GRIVICICH *et al.*, 2007).

3.1.3.2. Catástrofe mitótica

Catástrofe mitótica refere-se ao processo de morte celular no qual a célula tenta se dividir sem que o DNA tenha sido devidamente reparado por causa do funcionamento defeituoso do ponto de checagem do ciclo celular, o que resulta na formação de células gigantes, multinucleadas com cromossomos condensados sendo morfológicamente distinto das outras formas de mortes celulares (SINGH *et al.*, 2010).

3.1.3.3. Necrose

A necrose ocorre através do inchaço das células com perda da integridade da membrana plasmática, desorganização do citoplasma, e condensação da cromatina, esses efeitos acontecem devido às injúrias que impedem as células de controlar seus fluidos e equilíbrio iônico. Neste processo o conteúdo celular é liberado, o que ocasiona danos às células vizinhas e inflamação local. A necrose é considerada uma resposta passiva, embora alguns estudos recentes apontem que possa haver regulação genética (GRIVICICH, 2007).

3.1.3.4. Autofagia

A autofagia ocorre em resposta a um estresse metabólico que resulta da degradação dos componentes celulares. Neste processo, porções do citoplasma são encapsulados por membranas dando origem a estruturas denominadas de autofagossomos que se fusionam com os lisossomos, e tem seu conteúdo degradado pelas hidrolases lisossomais (GRIVICICH, 2007).

3.1.3.5. Apoptose

Kerr *et al.*, em 1972 adotaram o nome ‘apoptose’ para descrever um aspecto morfológico específico de morte celular. Neste processo a célula sofre redução do volume celular (picnose),

condensação da cromatina, fragmentação nuclear, pouca ou nenhuma modificação ultraestrutural de organelas citoplasmáticas e a desintegração da membrana celular sem extravasamento do conteúdo celular para o meio externo. Esse processo não gera inflamação pois, os restos celulares, após a fragmentação de uma célula afetada, são rapidamente eliminados por células próximas. (KERR et al, 1972). Assim, o termo "apoptose" deve ser aplicado exclusivamente aos eventos de morte celular que ocorrem com a manifestação destas características morfológicas (KROEMER et al, 2009).

A apoptose consiste na morte celular programada regulada por diversos fatores e que participa de diferentes processos fisiológicos tais como da morfogênese no desenvolvimento embriológico, da homeostase de órgãos ou tecidos através da eliminação das células que perderam sua função, da maturação da eritropoese e da epiderme. A apoptose também participa de importantes processos patológicos tais como inflamações agudas e crônicas e das neoplasias. O processo de apoptose é bem diferente da necrose que é considerada um processo “acidental” que ocorre em virtude de exposição da célula a estímulos nocivos muito intensos enquanto a apoptose é um processo ativo que envolve a síntese proteica e expressão de antígenos de superfície (BONINI, et al., 2000). A figura abaixo descreve as principais características morfológicas que diferem a apoptose da necrose.

Table: 1 Principais diferenças morfológicas entre necrose e apoptose. **Fonte:** Adaptado de Bonini et al, 2000

Características	Apoptose	Necrose
Distribuição no Tecido	Células isoladas	Grupos de células
Reação Tecidual	Fagocitose, Sem inflamação	Exudado celular, Inflamação

Morfologia	“Encolhimento” da célula; Organelas Intactas; Cromatina fragmentada condensada e distribuída na periferia do núcleo; Membrana Celular Intacta.	Edema celular; Organelas danificadas; Cromatina fragmentada; aleatoriamente Membrana celular danificada.
-------------------	---	---

3.1.3.5.1. Vias de transdução de sinais da apoptose

A apoptose acontece através de um complexo mecanismo envolvendo uma cascata de reações moleculares dependentes de energia. O processo apoptótico é mediado pelas caspases que são proteases divididas em caspases iniciadoras (8, 9 e 10) e as caspases efetoras (3, 6 e 7). Existem duas vias principais: a via extrínseca ou de receptor de morte e a via intrínseca ou via mitocondrial (figura 1). Para dar início a apoptose, as caspases que se encontram na forma inativa (pró-caspases) precisam ser ativadas (ELMORE, 2007).

A via intrínseca é ativada por estresse intracelular ou extracelular e a sinalização em resposta a esses insultos são direcionados para a mitocôndria (GRIVICICH et al, 2007). Esta via é mediada pelos membros da família Bcl-2, uma importante classe de proteínas reguladoras que está dividida em membros anti apoptóticos como a Bcl-2 e Bcl-xL e pro apoptóticos como a Bax e a Bak. O Bcl-2 é um dos mais conhecidos proto oncogenes que está relacionado a supressão da apoptose. Um outro exemplo da família Bcl-2 é a proteína Bax que pode se apresentar sob a forma de homodímeros que determinam a apoptose ou como heterodímeros com a proteína Bcl-2, inibindo a apoptose e determinando a sobrevivência da célula (BONINE et al., 2000). A heterodimerização entre os membros proapoptótico e antiapoptóticos da família Bcl-2 tem função antiapoptótica e é mediada pela proteína BH3 (DEGTEREV et al., 2001). Estímulos, como dano ao DNA, levam ao aumento na expressão das proteínas pró-apoptóticas o que induz a célula a apoptose (GRIVICICH et al, 2007). Após ativação pelo estímulo apoptótico, a mitocôndria libera o citocromo c, AIF (Fator indutor de apoptose) e outros fatores apoptogênicos do espaço intermembranar para o citosol (IGNEY; KRAMMER, 2002). Esse processo envolve a formação de um megaporo que contém diversas proteínas e abrange as membranas interna e externa da mitocôndria por onde ocorre a liberação do citocromo c para o citoplasma, onde participará da ativação da apoptose através da

formação do apoptossomo, que consiste em um complexo formado pela associação do citocromo c com a APAF-1 (Fator de ativação da protease associada a apoptose 1) e a caspase -9, esse complexo promove a clivagem e consequente ativação da caspase 9 que será então liberada para clivar a caspase efetora 3 ocasionando a apoptose (GRIVICICH et al, 2007).

Na via extrínseca a apoptose é mediada por uma superfamília de receptores TNF (Fator de Necrose Tumoral). Esses receptores são ativados por seus ligantes naturais como CD95, TRAIL – R1 (ligante R1 indutor de apoptose relacionado ao TNF) ou TRAIL-R2. A ligação do receptor ao seu ligante irá atrair o FADD (Proteína do domínio de morte associado ao Fas) dando origem ao DISC (Complexo sinalizante de morte induzida). Através desse complexo as caspases iniciadoras 8 e 10 serão recrutadas e depois ativadas pela clivagem, isso permitirá a ativação das principais caspases efetoras, as caspases 3, 6 e 7, que concluem o processo apoptótico (IGNEY; KRAMMER, 2002).

Figura 3. Vias de Transdução de sinais da apoptose. Fonte: Alenzi et al, 2010

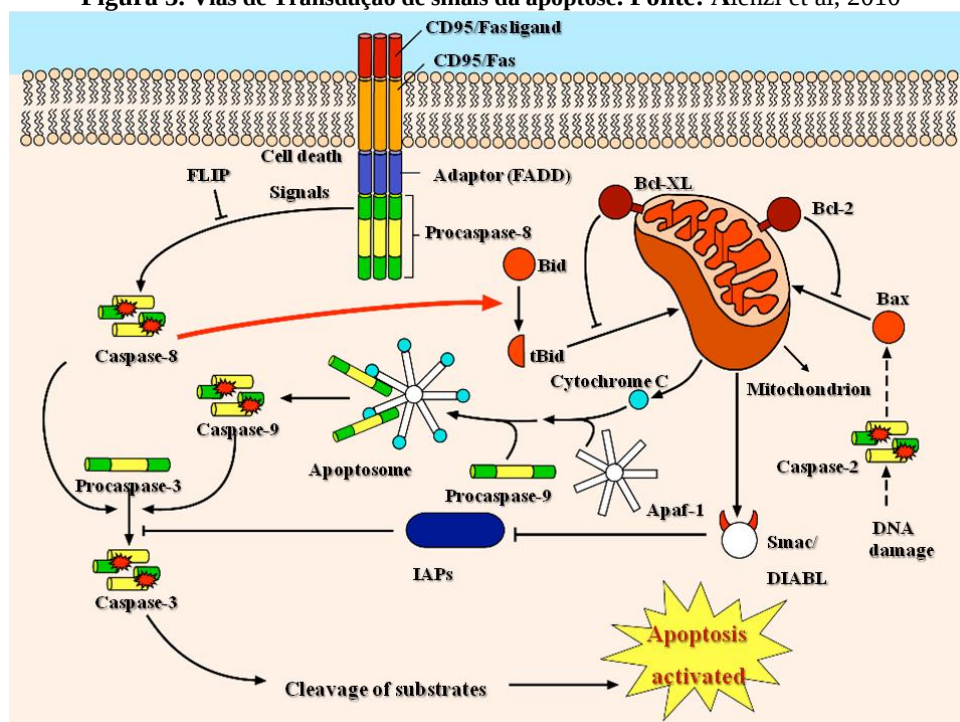


Figura 3. Vias de Transdução de sinais da apoptose. O sinal apoptótico é iniciado pela trimerização mediada pela ligação direta dos membros da família de receptores de morte como o Fas. Isso conduzirá a formação do complexo de DISC e a ativação da procaspase-8 induzida por proximidade. A caspase-8 ativa pode diretamente clivar a procaspase-3 começando assim a fase de execução da apoptose. Alternativamente, a clivagem do membro pró-apoptótico da família Bcl-2, Bid conduz a amplificação do sinal pró-apoptótico por via mitocondrial. Esta via também é usada na apoptose induzida pelo stress citotóxico. Isso leva a liberação de fatores pró apoptóticos como o citocromo c e a Smac/Diablo do compartimento intramembranar da mitocôndria para o citosol. A liberação do citocromo c conduz a formação do apoptossomo, que ativa a caspase-3.

A apoptose acontece de modo bastante controlado, onde diversas proteínas agem induzindo ou inibindo este processo de morte celular. Os membros pró e anti-apoptóticos da família Bcl-2 atuam alterando a permeabilidade da membrana mitocondrial. Outra forma de controle é exercida pelas proteínas FLIPs (proteína inibidora) que se liga ao FADD (*Fas Adaptor Death Domain*), uma proteína adaptadora ligada ao Fas, prevenindo a ativação da caspase-8 interrompendo deste modo a apoptose. Também há o controle exercido pelas IAPs que são proteínas inibidoras da apoptose, tais como a apolone e a survivina que agem através da sua ligação às caspases bloqueando a atividade destas. Por outro lado a ação anti apoptótica das IAPs pode ser inibida pela ação da proteína SMAC/diablo (Segundo ativador mitocondrial de caspase) que durante a apoptose é liberada pela mitocôndria podendo se ligar as IAPs permitindo que as caspases sejam liberadas e ativadas para o processo de apoptose (IGNEY; KRAMMER, 2002; GRIVICICH, et al, 2007).

3. 1. 4. Tratamento contra o câncer

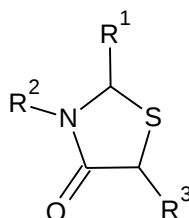
O tratamento para o câncer é realizado principalmente por cirurgia, radioterapia e quimioterapia. No entanto, a maioria dos fármacos utilizados na quimioterapia afeta apenas a divisão celular sendo considerados antiproliferativos, por não apresentar efeitos inibitórios específicos sobre outras características importantes do câncer como, por exemplo, o poder de invasão e metástase, ou a angiogênese. A ação apenas antiproliferativa produz efeitos colaterais por afetar também as células normais que se dividem rapidamente. O maior entendimento da biologia da célula do câncer permitiu a exploração de novos mecanismos de ação para o desenvolvimento de novos fármacos, atualmente existem diversas abordagens moleculares que estão em fase de investigação tais como estudos de drogas que visam à alteração da expressão gênica, à inibição da invasão do tumor e metástase, à inibição da angiogênese, ou ainda o estudo de novas drogas citotóxicas que induzem a apoptose (BERNARDI et al., 2003). Dentre as novas classes de compostos em estudo para o tratamento do câncer estão os heterocíclicos sintéticos derivados 4-tiazolidinonas.

3. 1. 5. Derivados das 4-Tiazolidinonas

Os compostos que contem o núcleo 4- tiazolidinona representam uma classe de compostos de grande interesse científico devido as suas propriedades químicas e ao extenso espectro de atividades biológicas descrita em diversos trabalhos. O núcleo 4- tiazolidinona pertence a uma classe de compostos derivados das tiazolidinas, e consiste em um anel com cinco membros que contém dois heteroátomos sendo um átomo de enxofre na posição 1, um átomo de nitrogênio na posição 3 e um grupo carbonila na posição 4. Esta molécula pode apresentar diversos grupos

substituintes nas posições 2, 3, e 5 (SINGH *et al*, 1981) o que torna possível um grande número de análogos estruturais. Deste modo, a atividade biológica dos derivados 4- tiazolidinonas podem ser atribuídas aos grupos substituintes (figura 4) que causam modificações nos padrões físico-químicos e estruturais moleculares. (LIENSEN, *et al.*, 2008; VERÇOZA, *et al.*, 2009).

Figura 4. Estrutura química do anel 4- tiazolidinona



3. 1. 5. 1. Atividade biológicas das 4-tiazolidinonas

Os derivados 4- tiazolidinonas exibem um amplo espectro de atividades biológicas tais como anti-viral (RAWAL *et al*, 2008); antimicobacteriana (KUÇUKGZEL *et al*, 2002), antifúngica (VERÇOZA *et al*, 2009); KUÇUKGUZEL *et al*, 2006) antiinflamatória (ALLEN *et al.*, 2004, VIGORITA *et al*, 2001), antibiótica (KUCUKGUZEL *et al*, 2002; FEITOZA *et al*, 2012; KAVITHA *et al*, 2006) e recentemente, a atenção tem sido dedicada à construção de novos derivados com ação anticancer (WANG *et al*, 2011; HAVRYLYUK ET AL, 2009; HAVRYLYUK *et al*, 2010). Devido a essa gama de atividades biológicas apresentadas em várias pesquisas, estes compostos vêm ultimamente ganhando importância junto à comunidade científica. Vários trabalhos estão sendo desenvolvidos por grupos acadêmicos e pela indústria farmacêutica tendo por base esta classe de compostos (LIENSEN *et al.* 2008).

Rawal *et al* (2008) demonstraram que uma série de novos derivados 2,3 – diaril-1,3-tiazolidin-4-ona foram avaliados quanto a sua capacidade de inibir o vírus da hepatite C (VHC). Apresentando inibição da atividade da RNA polomerase NS5B, *in vitro* (enzima que é crucial para a replicação do VHC).

Uma série de 2-(2,6 dibromophenyl)-3-heteroaril-1,3-tiazolidi-4-onas foram sintetizados e avaliados como inibidores da enzima transcriptase reversa do tipo 1 (HIV-1 RT) seletiva para o vírus da imunodeficiência humana. Os resultados mostraram que o teste com oito compostos inibiram efetivamente a replicação do HIV-1 (RAWAL *et al*, 2008).

Vários estudos demonstram a atividade antimicrobiana das 4-tiazolidinonas, pesquisas recentes demonstraram que compostos 4-tiazolidinônicos contendo grupo ácido na posição 5 do anel tiazolidínico apresentaram notáveis resultados quanto a inibição do crescimento de alguns

microorganismos incluindo bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos (Verçoza, et al, 2009).

Em trabalho recente, Feitoza, et al (2012) avaliaram a atividade antimicrobiana e citotóxica do núcleo 4-tiazolidinona, utilizando uma série de 5-benzilideno-2-[(piridina-4-ilmetileno) hidrazono]-thiazolidin-4-onas e seus precursores 2-[(piridina-4-ilmetileno) hidrazono]-thiazolidin-4-onas. Esta série de compostos foi avaliada *in vitro* frente a bactérias e espécies de fungos, onde um dos intermediários apresentou considerável atividade antibiótica contra *B. subtilis* e *C. albicans*. A atividade citotóxica foi eficaz para a inibição do crescimento celular em linhagens de células de leucemia mielocítica crônica (K-562) e carcinoma de pulmão humano (NCI-H292).

Esses resultados confirmam a atividade antibiótica apresentada por Kuçukguzel et al, em 2002, que testaram novos derivados 4-tiazolidinonas, 1,3,4- oxadiazoles quanto a sua atividade antimicobacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv e antimicrobiana frente a várias bactérias e fungos. Dois compostos foram mais ativos demonstrando 90 e 98% de inibição do crescimento de micobactérias de *M. tuberculosis* H37Rv.

A atividade antimicrobiana das 4- tiazolidinonas também foi observada por Kavitha e colaboradores em 2006, que sintetizaram uma nova série de derivados 4-thiazolidinonas, análogos 2,3- dissustituído - 1,3 thiazolidin-4-onas e testaram estes compostos para a avaliação de sua eficácia como agentes antimicrobianos *in vitro* pela difusão de disco e método de microdiluição contra estirpes patogênicas, tais como *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Xanthomonas campestris*, a *Xanthomonas oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum*, espécies de *Trichoderma*, e as espécies de *Fusarium monaliforme*. Cinco dos análogos testados apresentaram atividade microbiana potente quando comparados com as drogas de uso padrão.

Vigorita e colaboradores, 2001 demonstraram a atividade anti-inflamatória de vários compostos da série 3,3-(1,2-etanodiol)-bis [2-(3,4-dimetoxifenil)-4-tiazolidinona contendo o anel 4-thiazolidinona através do experimento de edema de patas induzida por carragena, atividade analgésica pelo teste de contorções abdominais pelo ácido acético e teste da placa quente em ratos, ressaltando que todos os compostos demonstraram menores efeitos ulcerosos e toxicidade aguda que a indometacina e fenilbutazona que são os fármacos padrões.

Allen et al. (2004) também estudaram sobre inflamação demonstrando que derivados tiazolidinônicos 2,3,5 - trissustituídos possuem ação anti-inflamatória por ação antagonista dos receptores responsáveis pela migração de células T para o local da inflamação.

Havrylyuk et al, (2009) sintetizaram compostos 5-benzilideno-4-tiazolidinona e realizaram experimentos para atividade antiproliferativa em diversas linhagens de células humanas. Os compostos testados apresentaram considerável inibição do crescimento de células tumorais. O

composto que apresentou melhor atividade anticancer demonstrou seletividade para as linhagens de células de câncer de cólon especialmente a HT-29. Em concordância com estes resultados, alguns compostos da série 2-fenilamino-4-tiazolidinonas tem sido estudado e considerados como inibidores potentes do crescimento do carcinoma de cólon humano (VERMA et al., 2008).

Em 2010, Havrylyuk, et al, realizaram triagem antitumoral de vários novos derivados 4-tiazolidinonas com metade benzotiazol. A atividade antitumoral *in vitro* dos compostos sintetizados foi testada pelo Instituto Nacional do Câncer e dois destes revelou atividade anticâncer frente a leucemia, melanoma, pulmão, cólon, ovário, próstata, rins e mama. A atividade antiproliferativa frente a linhagens celulares de melanoma humano metastático também foi observada em análogos de tiazolidínicos por Li et al, em 2007 onde os compostos testados apresentaram seletividade para essa linhagem celular.

Em trabalho recente, Guimarães et al, 2012, verificaram a atividade citotóxica e antimicrobiana *in vitro* de derivados 4- tiazolidinonas, utilizando uma série 5-benzilideno-2-[(piridina-2-ilmetileno) – hidrazono] - tiazolidin-4-ona. Onde quatro destes compostos se mostraram promissores como agentes anticancer, sendo mais eficazes que o fármaco padrão, etoposide em células HEP-2. Outros dois compostos mostraram considerável atividade antimicrobiana contra *Mycobacterium smegmatis* e *Candida albicans*.

Alguns mecanismos são propostos para a ação anticâncer do derivados de 4- tiazolidinonas, dentre eles o estudo realizado por Geronikaki *et al.*, em 2008, que indicou alguns derivados tiazoles/tiazolidinonas como inibidores da SHP-2, uma proteína envolvida na sinalização por fatores de crescimento cuja mutação nessa proteína provoca sua ativação constitutiva que está presente em alguns tipos de leucemias.

Em Degterev et al., (2001) foi verificado que derivados 4- tiazolidinonas inibem a heterodimerização Bcl-2/Bcl-xL mediada pelo domínio BH3 na função antiapoptótica, liberando membros pró-apoptóticos da família Bcl-2, os quais dão início à apoptose.

Estes resultados apresentados reforçam o interesse e a importância em estudar novos compostos derivados de 4-tiazolidinonas, através da investigação da atividade citotóxica e elucidação de alguns dos possíveis mecanismos de ação a fim de verificar a ação farmacológica dos mesmos.

REFERÊNCIAS

ALENZI, F. Q.; LOTFY, M.; WYSES, R. K. Review: Swords of Cell Death: Caspase Activation and Regulation **Asian Pacific J Cancer Prevention** v.11 p. 271-280 2010.

ALLEN, S.; NEWHOUSE, B.; ANDERSON, A. S.; FAUBER, B.; ALLEN, A.; CHANTRY, D.; EBERHARDT, C.; ODING, J.; BURGESS, L. E. Discovery and SAR of trissubstituted Thiazolidinones as CCR4 Antagonist. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p.1619-1624, 2004.

BERNARDI, A.; JACQUES-SILVA, M. C.; LENZ, G. Abordagem molecular no desenvolvimento de fármacos antitumorais. **Infarma**, v. 15, n. 9-10, p. 61-63, 2003.

BONINI, A. L.; MOURA, L. A. R.; FRANCO, M.; Revisão: Apoptose em Glomerulopatias **J Bras Nefrol**; v. 22(2), p.70-7, 2000.

CHAVES, A. P.; GOMES, J. A. P.; HÖFLING-LIMA, A. N. Alterações oculares induzidas pela quimioterapia. **Arq. Brás. Oftalmol.** v 70 p.718-725, 2007.

COSTA-LOTUFO, L.V.; CUNHA, G. M. A.; FARIAS, P. A. M.; VIANA, G. S. B.; CUNHA, K. M. A.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; GRAMOSA, N. V.; RAO, V. N. S. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon**, v. 40, p. 231–1234, 2002.

DEGTEREV, A., LUGOVSKOY, A., CARDONE, M., MULLEY, B., WAGNER, G; MITCHISON, T. and YUAN, J., Identification of small- molecule inhibitors of interaction between the BH3 domain and Bcl-xL. *Nature Cell Biology*, v. 3, p. 173-182, 2001.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Progmmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, v.35, n. 4, p. 465-516, 2007.

FEITOZA, D. D.; ALVES, A. J.; LIMA, J. G.; ARÚJO, J. M.; AGUIAR, S. J.; RODRIGUES, M. D.; SILVA, T. G.; NASCIMENTO, S. C.; GÓES, A. J. S. Synthesis, antimicrobial and cytotoxic activities of 5-benzylidene-2-[(pyridine- 4-ylmethylene) hydrazono]-thiazolidin-4-one and 2-[(pyridine-4-ylmethylene) hydrazono]-thiazolidin-4-one derivatives . **Quim. Nova**. v. XY P. 1-5, 2012.

FOSTER, I. Cancer: A cell cycle defect. **Radiography**, v. 14, p. 144-149, 2008.

GERONIKAKI, A., ELEFThERIOU, P., VICINI, P., ALAM, I., DIXIT, A. and SAXENA, A. K., 2- Thiazolylimino/Heteroarylimino – 5 – arylidene – 4- thiazolidinones as New Agents with SHP-2 Inhibitory Action. *J. Med. Chem.*, v. 51, p. 5221-5228, 2008.

GUIMARÃES NETO, E. A. G., ARAÚJO, J. M., RODRIGUES, M. D., SILVA, T. G., NASCIMENTO, S. C., MILITÃO, G. C. G., GÓES, A. J. S., LIMA, J., G., Synthesis, Cytotoxic and Antimicrobial activities of 5- benzylidene- 2 – [(pyridine-2-ylmethylene) hydrazono] thiazolin-4-one Derivatives. *Lat. Am. J. Pharm.*, v. 31, p. 235-239, 2012.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

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

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

HARRIS, C. C. Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. **Cancer Res.**, v. 51, p. 5023 – 5044; 1991.

HARRINGTON, K. J. Biology of Cancer. *Medicine*, v. 36, n.1, p.1-4, 2007.

HAVRYLYUK, D.; ZIMENKOVSKY, B.; LESYK, R. Synthesis and Anticancer Activity of Novel Nonfused Bicyclic Thiazolidinone Derivatives. **Phosphorus, Sulfur, and Silicon** v. 184 p. 638-650, 2009.

HAVRYLYUK, D.; MOSULA, L.; ZIMENKOVSKY, B.; VASYLENKO, O.; GZELLA, A.; AND LESYK, R. Synthesis and anticancer activity evaluation of 4-thiazolidinones containing benzothiazole moiety. European Journal of Medicinal Chemistry v.45, p. 5012-5021, 2010.

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.*, v.25, p. 585-621, 1961.

IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews | cancer* vol. 2, p. 277 -288, 2002.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil). Estimativas 2012: incidência de câncer no Brasil. Disponível em <<http://www.inca.gov.br>> acessado em 24/09/2012.

JAKOBISIAK, M., LASEK, W., GOLAB, J. Natural mechanisms protecting against cancer. **Immunology Letters**, v. 90, pp.103-122; 2003.

KAVITHA, C. V.; BASAPPA, C. S. A.; NANJUNDA, A. K. S.; MANTELINGU, A. S.; DORESWAMY, B. M. A.; SRIDHAR, B. J.; PRASADB, S.; RANGAPPAA, K. S. Synthesis of new bioactive venlafaxine analogs: Novel thiazolidin-4-ones as antimicrobials. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** v.14 p. 2290–2299, 2006.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H. AND CURRIE, A. R.; Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics **Br. J. Cancer** v.26, p. 239, 1972.

KUÇUKGUZEL, S. G.; ORUÇ E. E.; ROLLAS S.; SAHIN F.; OZBEK A. Synthesis, characterisation and biological activity of novel 4-thiazolidinones, 1,3,4-oxadiazoles and some related compounds **European Journal of Medicinal Chemistry** v.37 p.197–206 2002.

KUÇUKGUZEL, G.; KOCATEPE, A.; DE CLERCQ, E.; SAHIN, F.; GULLUCE, M. Synthesis and Biological Activity of 4- Thiazolidinones, Thiosemicarbazides Derived from Diflunisal Hydrazide. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, p. 353-359, 2006.

KROEMER, G., EL-DEIRY, W.S., GOLSTEIN, P., PETER, M.E., VAUX, D., VANDENABEELE, P., ZHIVOTOVSKY, B., BLAGOSKLONNY, M.V., MALORNI, W., KNIGHT, R.A., PIACENTINI, M., NAGATA, S., AND MELINO, G., Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death and Differentiation. **Nature** v.12, p. 1463–1467; 2005.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, ES.; BAEHRECKE, EH.; BLAGOSKLONNY, MV.; EL-DEIRY, WS.; GOLSTEIN, P.; GREEN, DR.; HENGARTNER, M.; KNIGHT, RA.; KUMAR, S.; LIPTON, SA.; MALORNI, W.; NUÑEZ, G.; PETER, ME.; TSCHOPP, J.; YUAN. J.; PIACENTINI, M.; ZHIVOTOVSKY, B.; AND MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death, **Cell Death Differ.** 2009. v.16 (1), p. 3–11, 2009.

LI, W.; LU, Y.; WANG, Z.; DALTON, J. T.; MILLER, D. D. Synthesis and antiproliferative activity of thiazolidine analogs for melanoma. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v17, p. 4113-4117, 2007.

LIENSEN, A. P.; AQUINO, T. M.; GÓES, A. J. S.; LIMA, J. G.; FARIA, A. R.; ALVES, A. J. Métodos de obtenção, reatividade e importância biológica de 4- tiazolidinonas. **Quim. Nova**, v 31, p. 369-376, 2008.

PEREIRA, A. C.; CARMO, E. D.; SILVEIRA, V. A. S.; AMADEI, S. U.; ROSA, L. E. B. O Papel das MMP-2 e -9 no desenvolvimento do carcinoma epidermoide. **Revista Brasileira de Oncologia** v. 3 p. 257-262 2006.

RAWAL, R. K.; TRIPATHI, R.; KATTI, S. B.; PANNECOUQUE, C.; DE CLERCQ, E. Design and synthesis of 2-(2,6-dibromophenyl)-3-heteroaryl-1,3-thiazolidin-4-ones as anti-HIV agents European Journal of Medicinal Chemistry v. 43, p. 2800-2806, 2008.

RAWAL R. K.; KATTI S. B.; KAUSHIK-BASU N.; ARORA, P.; PAN, Z. Non-nucleoside inhibitors of the hepatitis C virus NS5B RNA-dependant RNA polymerase: 2-aryl-3-heteroaryl-1,3-thiazolidin-4-one derivatives. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**.v.18 (23), p. 6110-4, 2008.

SINGH, S. P.; PARMAR, S. S.; RAMAN, K.; STENBERG, V. I. Chemistry and Biological Activity of Thiazolidinones. Chemical Reviews, v. 81, p. 175-203, 1981.

SINGH, R., GEORGE, J., SHUKLA, Y., Review: Role of senescence and mitotic catastrophe in cancer therapy **Cell Division**, p. 5- 4, 2010. <http://www.celldiv.com/content/5/1/4>

SMYTH, M. J.; DUNN, G. P.; SCHREIBER, R. D. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. **Advances in Immunology**, v. 90, p. 1-50. 2006.

VERÇOZA, G. L.; FEITOZA, D. D.; ALVES, A. J.; AQUINO, T. M.; LIMA, J. G.; ARAÚJO, J. M.; CUNHA, I. G. B.; GÓES, A. J. S. Síntese e avaliação da atividade antimicrobiana de novas 4-tiazolidinonas obtidas a partir de formilpiridina tiossemicarbazonas. **Quim. Nova**. v. 32, p.1405-1410, 2009.

VERMA, A. ; SARAF, S. K. ; 4- Thiazolidinone- A biologically active scaffold. European Journal of Medicinal Chemistry, v. 43, p. 897-905, 2008.

VIGORITA, M. G., OTTANA, R., MONFORTE, F., MACCARI, R., TROVATO, A., MONFORTEB, M. T. and TAVIANO, M. F. Synthesis and Antiinflammatory, Analgesic Activity of 3,30-(1,2-Ethanediy)-bis[2-aryl-4-thiazolidinone] Chiral Compounds. Part 10y. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** v.11 p. 2791–2794, 2001.

WANG, S.; ZHAO, Y.; ZHANG, G.; LY, Y.; ZHANG, N.; GONG, P. Design, synthesis and biological evaluation of novel 4-thiazolidinones containing indolin-2-one moiety as potential antitumor agent. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v 46, p. 3509-3518, 2011.

SINGH, S P; PARMAR, S. S.; RAMAN, K.; STENBERG, V. I. Chemistry and Biological Activity of thiazolidinones. **Chemical Reviews**, v. 81, p. 175 – 203, 1981.

CAPÍTULO II

4. ARTIGO CIENTÍFICO I

Synthesis, Cytotoxic and Antimicrobial activities of 5- benzyldene – 2 – [(pyridine – 2 – ylmeththylene) hydrazono] – thiazolidine – 4 – one Derivatives.

Artigo publicado Latin American Journal of Pharmacy (formerly Acta Farmacéutica Bonaerense)



Latin American Journal of Pharmacy
(formerly *Acta Farmacéutica Bonaerense*)
Lat. Am. J. Pharm. **31** (2): 235-9 (2012)

Regular Article
Received: February 9, 2012
Revised version: March 6, 2012
Accepted: March 9, 2012

Synthesis, Cytotoxic and Antimicrobial activities of 5-benzylidene-2-[(pyridine-2-ylmethylene)hydrazono]-thiazolidin-4-one Derivatives

Eraldo A.G. NETO ¹, Janete M. ARAÚJO ², Maria D. RODRIGUES ², Teresinha G. SILVA ²,
Silene C. NASCIMENTO ², Gardênia C.G. MILITÃO ², Alexandre J.S. GÓES ² & José G. LIMA ^{1*}

¹ Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco,
Recife 50670-901, Brazil

² Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 50670-901, Brazil

SUMMARY. A novel series of 5-benzylidene-2-[(pyridine-2-ylmethylene)hydrazono]-thiazolidin-4-ones **3a-i** has been synthesized. 2-[(Pyridine-2-ylmethylene)hydrazono]-thiazolidin-4-ones **2a-c** were also obtained and used as intermediates to give the target compounds. The *in vitro* cytotoxic activity was evaluated for both series. The findings obtained showed that the compounds **2a**, **2b**, **3b** and **3c** were effective against the HEP-2 cell lines with IC₅₀ in the 1.6 - 0.5 µg/mL range, whereas the compounds **2a** (IC₅₀= 3.6 µg/mL), **2b** (IC₅₀= 2.4 µg/mL) and **3f** (IC₅₀= 3.5 µg/mL) showed good inhibitory effects against HT-29 cell lines. As complementary biological test, all 4-thiazolidinones were evaluated for antimicrobial activity against various bacterial and fungal species.

less toxicity to normal human fibroblasts at concentrations up to 195 μ M. The authors also revealed that the nitrogen substitution in the 4-thiazolidinone ring blocked cytospecific anticancer activity and although the R' site was lenient to substitution, the R'' site required an -NMe₂ group at the 4-position for optimal activity.

Based on these facts, our research group has recently investigated the cytotoxic properties of the 4-thiazolidinone scaffold, utilizing a series of 5-benzylidene-2-[(pyridine-4-ylmethylene)hydrazono]-thiazolidin-4-ones (Fig. 1b). In particular, compound 1 (R = Ph, R₁ = NMe₂) showed excellent anticancer activity against human lung carcinoma (NCI-H292) cell line with IC₅₀ = 1.38 μ g/mL. This compound showed equipotent to methotrexate (IC₅₀ = 1.31 μ g/mL) and more active than etoposide (IC₅₀ = 2.75 μ g/mL) at inhibiting cancer cell growth¹⁰.

As a part of our continuing research directed toward the structural development of 4-thiazolidinone as a multitemplate for lead discovery, we report here the synthesis and cytotoxic activity of a new isomeric series of 5-benzylidene-2-[(pyridine-2-ylmethylene)hydrazono]-thiazolidin-4-ones **3a-i** and their precursors 2-[(pyridine-2-ylmethylene)hydrazono]-thiazolidin-4-ones **2a-c** (Fig. 2). As complementary work, all 4-thiazolidinones were evaluated for antimicrobial activity against various bacterial and fungal species.

MATERIALS AND METHODS

Synthesis

The synthesis of the thiosemicarbazone derivatives (**1a-c**) are reported in our recent

Materials and Instruments

The melting points were determined on BÜCHI-535 apparatus and are uncorrected. IR spectra were measured on BRUKER IFS-66 IR spectrophotometer. HRMS were recorded on Varian MAT 711 spectrometer 70 eV electron impact. NMR were recorded on UNITY PLUS-300 MHz-VARIAN spectrometer by using tetramethylsilane as internal standard. The chemical shifts are reported in δ units, and coupling constants (*J*) are reported in hertz. TLC development was conducted on 0.25 mm silica gel plates (60F₂₅₄, Merck).

General synthetic procedure process for compounds **2a-c**

A solution of 4.54 mmol of thiosemicarbazones **1a-c**, 4.54 mmol of 2-chloroacetic acid, and 6.9 mmol of sodium acetate anhydrous in 25 mL of ethanol was stirred until reflux until the completion of the reaction (8-24 h). After, the solution was cooled to 0 °C, and the precipitate was collected with filter under vacuum and washed with hot methanol and water.

General synthetic procedure process for compounds **3a-i**

A solution of 1.36 mmol of 4-thiazolidinones **2a-c**, 1.36 mmol of aldehyde aromatic, and two drops of piperidine in 10 mL of ethanol was stirred until reflux until the completion of the reaction (4-10 h). After, the solution was cooled to 0 °C, and the precipitate was collected with filter under vacuum and washed with hot ethanol and water.

Cytotoxic activity

Human larynx carcinoma (HEp-2) and human colon adenocarcinoma (HT-29) cell lines were purchased from the Adolfo Lutz Institute, São Paulo, Brazil. A DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), enriched with 10% of fetal bovine serum, 1% of L-glutamine and 1% of antibiotics (penicillin and streptomycin), was used for cell cultivation and to perform the tests. The cytotoxic activity was investigated using the MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Cell suspensions were diluted to 105 cells/mL, suitably prepared and distributed in plates of culture with 96 wells (225 μ L in each well), then incubated at 37 °C in a humid atmosphere with 5% of CO₂. After 24 h, 25 μ L of either the synthesized compounds or the reference drugs (doxorubicin and etoposide) was added to each well. The plates were incubated again at 37 °C for 72 h. Then, 25 μ L of MTT solution (5 mg/mL) was added to each well, and the mixture was incubated at 37 °C for 2 h. At the end of this period, the culture medium with the MTT excess was aspirated and after that, 100 μ L of DMSO was added to each well to dissolve the formazan crystals. The optical den-

sity (OD) of the wells was measured at 540 nm and compared to the control (cells with medium only). The data represent the mean of three experiments in triplicate and were expressed as means $\pm$ SD. IC₅₀ and their 95% confidence intervals were determined from nonlinear regression using the program SigmaPlot version 11. The IC₅₀ value was defined as the concentration at which 50% survival of cells was observed.

Antimicrobial Activity

Bacterial and fungal species used in the antimicrobial evaluation were obtained from Departamento de Antibióticos and Instituto de Micologia cultures collections, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil. Namely, *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02), *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86), *Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 416), *Klebsiella pneumoniae* (UFPEDA 396), *Mycobacterium smegmatis* (UFPEDA 71), *Candida albicans* (UFPEDA 1007), *C. krusei* (UFPEDA 1002), *Malassezia furfur* (UFPEDA 1320), *Aspergillus niger* (UFPEDA 2003), species. The antibacterial and antifungal activities are reported preliminary utilizing disc diffusion method. In this method, disks containing known amounts of an antimicrobial agent were placed on the surface of an agar plate that has been inoculated with a stan-

dardized suspension of microorganisms tested. Paper discs with only DMSO were used as negative controls. The MZI (Mean Zone Inhibition) for rifampicin (antibacterial), and nystatin (antifungal) was referred to as a reference value (mm). All experiments were carried out three times and repeated if the results differed. For MIC assays, a stock solution (1 mg/mL) of test compounds was prepared in DMSO solvent. Further, the serial dilution of test compounds was carried out and the concentrations used ranged from 10 for 1000 μ g/mL. Test compounds at various concentrations were added to culture medium in a test tube and different strains were inoculated at 108 bacteria/mL concentration. Tryptic Soy Agar was utilized for culture medium. The tubes were incubated at 37 °C for 24 h and then examined for the presence or absence of growth organisms tested. The MIC values were obtained from the lowest concentration of the test compounds where the tubes remained clear, indicating that the bacterial or fungal growth was completely inhibited at this concentration. The MIC values were expressed in μ g/mL.

RESULTS AND DISCUSSION

The 4-thiazolidiones **2a-c** and **3a-i** were prepared with satisfactory yield, and characterized based on their physical, analytical and spectral data. The data for **2b** and **3b** are described below:

Data for 3-methyl-2-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazono)thiazolidin-4-one **2b**: Reaction time: 24 h. Gray solid, 77%; mp 157-158 °C. Rf: 0.55 (ethyl acetate:hexane, 3:7). IR (KBr) cm⁻¹: ν : 1717 (NC=O), 1620 and 1552 (C=N), 1298 (NCS), 1118 (N-N=C), 1055 (CS); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 400 MHz/ppm) δ : 8.43 (s, 1H, CH=N), 3.71 (s, 2H, S-CH₂), 3.23 (s, 3H, CH₃); pyridine ring: 8.58 (d, 1H, J = 8.0 Hz) 8.03 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 7.70 (t, 1H, J = 8.0 Hz), 7.26 (t, 1H, J = 8.0 Hz); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz/ppm): δ 172.06 (C=O), 166.14 (N=C), 157.69 (CH=N), 32.42 (CH₂-S), 29.91 (CH₃); pyridine ring: 152.81 (Cq), 148.88, 137.09, 124.84, 121.73; HRMS (ES⁺): 257.0475 [M+Na]⁺ C₁₀H₁₀N₄OS requires 257.0458.

Data for 5-(4-(dimethylamino)benzylidene)-2-(2-(pyridine-2-ylmethylene)hydrazono)thiazolidin-4-one **3b**: Reaction time: 14 h. Red solid; yield 56%; mp 255-257 °C. Rf: 0.6 (ethyl acetate:hexane, 1:4). IR (KBr) cm⁻¹: ν : 1694 (NC=O), 1625 and 1525 (C=N), 1583 (C=C), 1294 (NCS), 1214 (N-N=C), 1004 (CS); ¹H NMR

(300 MHz DMSO- d_6) δ : 12.18 (s, 1H, NH), 8.40 (s, 1H, CH=N), 7.78 (s, 1H, HC=C), 7.45 (d, J = 8.0 Hz, 2H, Ar-H), 6.90 (d, J = 8.0 Hz, 2H, Ar-H), 3.05 (s, 6H, N(CH₃)₂); pyridine ring: 8.67 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 8.07 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 7.93 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 7.64 (t, J = 6.4 Hz); HRMS (ES⁺): 374.1054 [M+Na]⁺ C₁₈H₁₇N₅OS requires 374.0801.

IR spectra of the compounds **2a-c** revealed the presence of lactam C=O stretching bands and NCS bending vibration of the ring at 1709-1721 cm⁻¹ and 1292-1383 cm⁻¹, respectively. This is considered to be a strong confirmation of the thiazolidinone nucleus formation¹⁴. The ¹H NMR spectra revealed the presence of a single signal at 3.71-3.98 ppm corresponding to methylene moiety of thiazolidinone nucleus¹⁵. On the other hand, peaks resonated in the range 32.43-38.34, 165.77-167.20 and 171.69-174.04 ppm in the ¹³C NMR spectra were assigned for S-CH₂, C=N and C=O moieties^{16,17}.

IR spectra of **3a-i** showed absorption band corresponding to the stretching mode ν (C=O) of the lactam group at about 1694-1715 cm⁻¹. The exocyclic C=C bond was also assigned by means of the IR spectra, which showed a stretching band in the region of 1533-1599 cm⁻¹. In their ¹H NMR spectra, the introduction of 5-arylidene moiety was confirmed through the absence of the signal of 5-CH₂ protons of **2a-c** and the presence of resonances assigned to the methine hydrogen appearing as singlet (7.63-7.81 ppm). Unfortunately, the very low solubility of

compounds **3a-i** in usual solvents was a limitation for a valuable record of their ¹³C NMR spectra. HRMS data fully agree with the proposed structure.

Initially, the compounds **2a-c** and **3a-i** were evaluated for antiproliferative activity against the HEP-2 (mucoepidermoid carcinoma of larynx) and HT-29 (Human colon adenocarcinoma) cell lines^{18,19}. Among the twelve compounds tested, five drugs, named **2a**, **2b**, **3b**, **3c** and **3f**, showed excellent to moderate cytotoxic effects (Table 1). The remaining seven compounds showed no significant antiproliferative activity even at 25 μ g/mL. The known antitumor agents, doxorubicin and etoposide were included as reference compounds. The IC₅₀ values of **2a**, **2b**, **3b** and **3c** against HEP-2 cell line were only in the 1.6 - 0.5 μ g/mL range, and thus were much more active than etoposide (IC₅₀ = 6.10 μ g/mL). As for the relationship between cytotoxicity and the different substitution on the ring phenyl of the compounds **3b** (IC₅₀ = 0.7 μ g/mL) and **3c** (IC₅₀ = 0.5 μ g/mL), we did not observe a signifi-

compound	Cell Lines IC ₅₀ (μ g/mL) ^b	
	HEP-2	HT-29
2a	1.6	3.6
2b	0.5	2.4
3b	0.7	14.7
3c	0.5	20.4
3f	13.2	3.5
Doxorubicin	nt	0.4
Etoposide	6.10	nt

Table 1. Cytotoxic activity in tumor cells of some compounds **2** and **3** ^a. ^a The data represented the mean of three experiments in triplicate. ^b IC₅₀ and their 95% confidence intervals were determined from nonlinear regression using the program SigmaPlot version 11. The IC₅₀ value was defined as the concentration at which 50% survival of cells was observed. nt = not tested.

cant difference between electron-donating ((CH₃)₂N) and electron-withdrawing (NO₂) groups for the contribution to anticancer activity. In contrast, compound **3f** (IC₅₀ = 13.2 μ g/mL) was 2-fold less active than reference drug. On the other hand, none of the compounds (IC₅₀ = 20.4 - 2.4 μ g/mL) were more effective than reference doxorubicin (IC₅₀ = 0.4 μ g/mL) in HT-29 cells, but compounds **2a**, **2b** and **3f** showed good inhibitory effects with IC₅₀ = 3.6 μ g/mL, IC₅₀ = 2.4 μ g/mL and IC₅₀ = 3.5 μ g/mL, respectively.

After, the compounds **2a-c** and **3a-i** were also tested to antimicrobial activity by the disc diffusion method against various bacterial and fungal species. The mean zone inhibition (MZI) for rifampicin (antibacterial) and nystatin (antifungal) was referred as a reference value (in mm). Except for compounds **2a** and **2b**, none of the tested compounds displayed good inhibition of the growth (MZI above or equal to 16 mm) of Gram positive and Gram negative bacteria, and fungi in relation to the reference drugs. The thiazolidinone **2a** showed significant MZI for *M. smegmatis* (20 mm) and for *C. albicans* (17 mm), but this compound demonstrated higher values of MIC (>500 μ g/mL and 62 μ g/mL, respectively) when compared with rifampicin (MIC = 125 μ g/mL) and nystatin (MIC = 50 μ g/mL). Besides, the activity against *C. albicans* was found for compound **2b** (16 mm), but this *N*-methyl-4-thiazolidinone derivative showed higher value of MIC (500 μ g/mL) regarding the nystatin. It has been known that the introduction of arylidene moieties at 5 position of the 4-

thiazolidinone ring enhanced the antimicrobial activity²⁰. As regards the relationships between the structure and the detected antimicrobial activity, the 5-benzylidene derivatives **3a-i** did not show neither antibacterial nor antifungal efficacy.

CONCLUSION

Nine new 5-benzylidene-2-[(pyridine-2-ylmethylene)hydrazono]-thiazolidin-4-ones **3a-i** were synthesized and tested together with starting 2-[(pyridine-2-ylmethylene)hydrazono]-thiazolidin-4-ones **2a-c** for their *in vitro* cytotoxic and antimicrobial activities. Compounds **2a**, **2b**, **3b** and **3c** could be good starting points for developing better anticancer agents, because they were more effective than etoposide in HEP-2 cells. Antimicrobial assessment indicated that compounds **2a** against *M. smegmatis* and *C. albicans*, and **2b** against *C. albicans* showed considerable antibiotic activity.

Acknowledgements. The authors acknowledge Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado

de Pernambuco (FACEPE).

REFERENCES

- Stewart, B.W. & P. Kleihues (Eds): "World Cancer Report 2003". Available at <<http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2003/index.php>>.
- Goto, K.N., P.C. Cheng, C.Y. Lai, H.Y. Hung, T.H. Chen, P.C. Wu *et al.* (2010) *J. Med. Chem.* **53**: 6699-705.
- Das, S.G., B. Srinivasan, D.L. Hermanson, N.P. Bleeker, J.M. Doshi, R. Tang *et al.* (2011) *J. Med. Chem.* **54**: 5937-48.
- Avendano, C. & J.C. Menendez (2002) *Curr. Med. Chem.* **9**: 159-93.
- Verma, A. & S. K Saraf, (2008) *Eur. J. Med. Chem.* **43**: 897-05.
- Liesen, A. P., T. M. Aquino, C. S. Carvalho, V. T. Lima, J. M. Araújo, J. G. Lima *et al.* (2010) *Eur. J. Med. Chem.* **45**: 3685-91.
- Vicini, P.; A., A. Geronikaki, M. Incerti, F. Zani, J. Dearden & M. Hewitt (2008) *Bioorg. Med. Chem.* **16**: 3714-24.
- Wang, S., Y. Zhao, G. Zhang, Y. Lv, N. Zhang & P. Gong (2011) *Eur. J. Med. Chem.* **46**: 3509-18.
- Zhou, H., S. Wu, S. Zhai, A. Liu, Y. Sun, R. Li *et al.* (2008) *J. Med. Chem.* **51**: 1242-51.
- Feitoza, D.D., A.J. Alves, J.G. de Lima, J.M. Araújo, J.S. Aguiar, M.D. Rodrigues *et al.* (2012) *Quim. Nova*, **35** (2), in press.
- Verçoza, G. L., D.D. Feitoza, A.J. Alves, T.M. Aquino, J.G. Lima, J.M. Araújo *et al.* (2009) *Quim. Nova* **32**: 1405-10.
- Bonde, C.G. & J. N. Gaikwad (2004) *Bioorg. Med. Chem.* **12**: 2151-61.
- Ottanà, R., R. Maccari, R. Ciurleo, P. Paoli, M. Jacomelli, G. Manao *et al.* (2009) *Bioorg. Med. Chem.* **17**: 1928-37.
- Çapan, G., N. Ulusoy, N. Ergenç & M. Kiraz (1999) *Monatsh. Chem.* **130**: 1399-07.
- Ergenç, N., G. Capan, N. S. Günay, S. Özkirimli, M. Güngör & S. Özbey (1999) *Arch. Pharm.* **332**: 343-7.
- Küçüküzümlü, S. G., E. E. Oruç, S. Rollas, F. Sahin & A. Özbek (2002) *Eur. J. Med. Chem.* **37**: 197-06.
- Küçüküzümlü, G., A. Kocatepe, E. Clercq, F. Sahin & M. Güllüce (2006) *Eur. J. Med. Chem.* **41**: 353-59.
- Alley, M.C., D.A. Scudiero, A. Monsk, M. Hursey, M.J. Czerwinski, D.L. Fine *et al.* (1988) *Cancer Res.* **48**: 589-601.
- Mosmann, T. (1983) *J. Immunol. Methods* **16**: 55-63.
- Vicini, P.; A. Geronikaki, A. Kitka, M. Incerti & F. Zan (2006) *Bioorg. Med. Chem.* **14**: 3859-64.

5. ARTIGO CIENTÍFICO II

Avaliação da atividade citotóxica de derivados 4 - tiazolidinonas

Artigo a ser submetido ao periódico Internacional: **Anticancer Research**

Evaluation of Cytotoxic Activity of Derivatives 4 - Thiazolidinones

*Maria do Desterro Rodrigues^a ; Eraldo Antunes Guimarães Neto^b; José Gildo Lima^b; Alexandre José da Silva Góes^a, Gardênia Carmem Gadelha Militão^c; Claudia do O Pessoa^d, Letícia Veras Costa-Lotufo^d, Diego Veras Wilke^d, Teresinha Gonçalves da Silva^a; Silene Carneiro do Nascimento^a.

^a Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brasil.

^b Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brasil.

^c Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brasil.

^d Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

*Corresponding author: Maria do Desterro Rodrigues, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brasil. Phone +55 31 81 2126-8866, E-mail address: mdrodrigues@yahoo.com.br

Abstract

In this study we have examined the antitumor activities of six 4-thiazolidinones derivatives. The compound 2-[(2-piridinyI-metileno)hydrazono]-4-thiazolidinone, (composto 2), showed better results with IC₅₀ values between 0.5 and 3.3 µg/mL after 72h of incubation on three tumor cell lines and thus was chosen for further study on the mechanism of cell death. The test compound showed no hemolytic activity against mice erythrocytes (EC₅₀ > 250µg/mL). In trypan blue exclusion test there was a reduction in the viable cell number after a 48 h treatment. Morphological analysis after May- Grunwald - Giemsa staining showed reduction of cell volume, chromatin fragmentation and some cellular debris. DNA fragmentation was observed after 48h treatment while no significant reduction on cell membrane integrity was found. These data suggest that HL60 cells undergo apoptosis after treatment with compound 2.

Keywords: Cytotoxicity activity, 4 - Thiazolidinones, Apoptosis.

1. Introduction

The exploration of privileged structures in drug discovery has gained significant popularity in medicinal chemistry over the past years [1]. Thiazolidinones are the derivatives of thiazolidine which belong to an important group of heterocyclic compounds containing sulfur and nitrogen in a five member ring. A lot of research work on thiazolidinones has been done in the past. The nucleus is also known as wonder nucleus because it gives out different derivatives with all different types of biological activities. Numbers of methods for synthesis by using various agents are available in the references [2].

Thiazolidin-4-one ring systems, display a broad spectrum of biological activity such as anti-mycobacterial [3], anti-fungal [4][3], antiinflammatory [5], antibiotic [6][7][8] and recently, considerable attention has been devoted to the construction of new derivatives of 4-thiazolidinone moieties with anticancer activities[9][10][11].

Zhou et al 2008, identified ten cytoselective compounds from 372 thiazolidinone analogues by applying iterative library approaches, these compounds selectively killed both non-small cell lung cancer cell line H460 and its paclitaxel-resistant variant H460taxR at an IC_{50} between 0.21 and 2.93 μM while showing much less toxicity to normal human fibroblasts at concentrations up to 195 μM . [12].

In 2009, Havrylyuk et al., tested new derivatives of bicyclic thiazolidinones in lung, ovarian, colon, leukemia, melanoma, ovarian, prostate and kidney human tumor cell lines. Some compounds of the series showed cytotoxic activity in all cell lines tested, being more selective in the lineage of melanoma (M14) and for leukemia (CCRF-CEM). In 2012, Wang et al, synthesized a number of derivatives related to the 4-thiazolidinonas core indolin-2-one and evaluated the cytotoxic activity of these compounds in four human cancer cell lines HT-29 (human colon cancer), H460 (human lung cancer), MDA-MB-231 (human breast cancer) and SMMC-7721 (human liver cancer). The results showed that most of the compounds exhibited cytotoxic activity considered moderate to excellent against one or more strains of cancer cells. In recent work, Guimaraes Neto et al, 2012 assessed the cytotoxic and antimicrobial activity of the 4-thiazolidinone nucleus, using a series of 5-benzylidene-2-[(pyridine-2-ylmethylene) hydrazono]-thiazolidin-4-one derivatives. This series of compounds was evaluated for the in vitro cytotoxic and antimicrobial activities. Four compounds could be good starting points for the developing better anticancer agents, because they were more effective than the etoposide in Hep-2 cells and two others compounds showed considerable antibiotic activities against *M. smegmatis* and *C. albicans* [10][13].

Considering the importance of these research area, the aim of the present study was to evaluate the *in vitro* antitumor activitie of some 4-thiazolidinones as well as the investigate possibles mechanism of action of these compounds on human tumor cells.

2. Experimental

2.1. Synthesis of Compounds

The synthesis of the compounds 1 to 6 (**figure 1**) are reported in our recent work [13]. Briefly, the synthesis of 2-[(pyridine-2-ylmethylene)hydrazono]-thiazolidin-4-ones was performed by condensation of 2-formylpyridine thiosemicarbazones with 2-chloroacetic acid in the presence of sodium acetate anhydrous in ethanol, and isolation in good yield ranging from 67 to 82%. The final compounds 5-arylidene-4-thiazolidinones were obtained by Knoevenagel condensation of the previous products with commercially available aromatic aldehydes (benzaldheyde, 4-dimethylaminobenzaldehyde and 4-nitrobenzaldehyde) in yields varying from 44 to 65%. The reaction was carried out in ethanol at reflux with piperidine as catalyst [13]. All compounds were identified by IR, HRMS and NMR spectroscopy [13].

2.2. Animals

Swiss mice (female, 25-30g) obtained from the central animal house of Universidade Federal de Pernambuco, Brazil, were used. The animals were housed in cages with free access to food and water. All animals were maintained on a 12 h: 12h light- dark cycle (lights on at 6:00 a. m.). The animals were treated according to the ethical principles of animal experimentation of COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, Brasil). The Animal Studies Committee of Universidade Federal de Pernambuco approved the experimental protocols (Number 23076032201/2012-30).

2.3. Cell lines

Cytotoxicity studies were carried out on human cell line NCI-H292 (mucoepidermoid carcinoma of the lung) K562 (chronic myelocytic leukemia) e HL-60 (acute promyelocytic leukemia) obtained from cell bank of the Rio de Janeiro, Brazil. The cells were maintained in DMEM - Minimum Essential Medium Eagle modified Dulbecco's (Sigma), with the exception of HL-60 cell line that was grown in RPMI 1640. All cell lines were supplemented with 10% fetal calf

serum (GIBCO), 1% antibiotic solution (penicillin 1000 IU / mL + streptomycin 250 µg / mL) and 1 % L-glutamine 200 mM.

2.4. *Citotoxic activity*

The cytotoxicity tests were carried out using the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO/USA) reduction assay. For all experiments, tumor cells were plated in 96-well plates (10^5 cells/mL for adherent cells or 3×10^5 cells/mL for leukemia). Tested compound (0.39–25 µg/mL) dissolved in DMSO 1% were added to each well and incubated for 72 h. Compound 2 was also evaluated after 24 and 48 h of incubation. Control groups received the same amount of DMSO. After 69h of treatment 25 µL of MTT (5 mg/mL) was added, three hours later, the MTT-formazan product was dissolved in 100 µL of DMSO, and absorbance was measured at 595 nm in plate spectrophotometer. Doxorubicin (0.01–5 µg/mL) was used as positive control. Data are presented as IC_{50} values with their 95% confidence intervals (CI 95%) obtained by nonlinear regression.

2.5. Determination of hemolytic activity in erythrocytes of swiss mice (*mus musculus*)

This assay enables to assess the potential of test compounds in damage to the cell plasma membrane, or by forming pores or by rupture total [14]. Blood was collected from three Swiss mice (*Mus musculus*) by cardiac puncture, the animals were pre-anesthetized with a mixture of Ketamine 10% and Xylazine 2% at a concentration of 0.1 mL/10 g and 0.07 mL/10 g body weight of animal at 2 µL and 1 µL volume of approximately, by intraperitoneally. Erythrocytes were washed with saline (0.85% NaCl + 10 mM CaCl₂) by centrifugation (3000 rpm/5min), the supernatant was discarded and resuspended in saline to obtain a suspension of erythrocytes (SE) 2%. These experiments were performed in 96-well plates: On 1st column were adicionados 100µl of saline (negative control), the second column, 50 µl of saline solution and 50 µl of vehicle (white) In the 3rd column were added 80 µL saline + 20 µL Triton X - 100 1% (positive control); the 4th to the 11th column of saline + 100 µl of solution (1.95 to 250 µg / mL) diluted in 10% DMSO were

plated. Then 100 μ L of the solution of erythrocytes was plated in each well. After incubation for 1 h under constant agitation at room temperature, the supernatant was analyzed. The scanning was conducted in automatic plate reader (540 nm). The 50% effective concentration (EC_{50}) and their 95% confidence intervals were determined from nonlinear regression. Products with EC_{50} values $<200 \mu\text{g/mL}$ are considered active [14].

2.6. Study of the mechanism involved in the leukemia cell (HL-60) cytotoxicity

The following experiments were performed in order to investigate the mechanism involved in the cytotoxic effect of (2) against HL-60 cells using a 48h exposure. The compound was dissolved in DMSO and was added to cell cultures of HL-60 cells (3×10^5 cells/mL) to obtain final concentrations of 3.0 and 6.0 $\mu\text{g/mL}$. Doxorubicin (0.03 $\mu\text{g/mL}$) was used as a positive control.

2.7. Trypan blue exclusion

Cell viability was determined by the trypan blue dye exclusion test after incubation of HL-60 cells with 4 - thiazolidinone. Aliquots from wells were removed from cultures after 48 h of incubation and cells were scored in a Neubauer chamber.

2.8. Analysis of morphological changes

Untreated or -treated HL-60 cells were examined for morphological changes by light microscopy (Metrimpex Hungary/PZO-Labimex Modelo Studar lab®). To evaluate morphology, cells were harvested, transferred to cytospin slides, fixed with methanol for 1min and stained with Giemsa-May-Grunwald. Doxorubicin (0.03 $\mu\text{g/mL}$) was used as a positive control.

2.9. Flow Cytometry Analysis

The assays described below were performed with compound 2.

2.10. Analysis of DNA content and cell membrane integrity

HL-60 cells were incubated at 25 °C for 30 min, in the dark, in a lysis solution containing 0.1% citrate, 0.1% Triton X-100 and 50 µg/mL propidium iodide. Cell fluorescence was then determined by flow cytometry. HL-60 cell membrane integrity was evaluated by the exclusion of propidium iodide (50µg/mL). Cell fluorescence was determined by flow cytometry in a Guava EasyCyte Mine using Guava Express Plus software. Five thousand events were evaluated per experiment and cellular debris was omitted from the analysis.

2.11. *Statistical analysis*

For cytotoxicity assays, the IC₅₀ values and their 95% confidence intervals were obtained by nonlinear regression using the Graphpad program (Intuitive Software for Science, San Diego, CA). In order to determine differences, data were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey`s test ($p < 0.05$).

3. Results

3.1. *Evaluation of Cytotoxic and Hemolytic Activity of novel 4 – thiazolidinones*

Analysis of cytotoxicity of the samples tested (Table 1) showed that the compound **(2)** was the most active one, with IC₅₀ values under 3.3 µg/mL. The results also indicated that compound **(2)** showed some selectivity for leukemic cell lineages, with IC₅₀ values of 0.5 µg/mL for HL-60 and 0.39 µg/mL for K562 cells. None of the compounds caused murine erythrocyte hemolysis (EC₅₀ > 250µg/mL). In order to investigate the activity of compound **(2)** at leukemia cell lineages, a cytotoxic analysis after 24 and 48 was performed. It was observed that the compound **(2)** has IC₅₀ > 25µg/mL at both lineages after 24 hours of treatment. The 48 hours treatment caused a reduction on cell viability with IC₅₀ values of 3,0 µg/mL at HL-60 and 7,1 µg/mL at K562 cells (Table 2).

3.2. *Analysis of Cell Viability– By Test exclusion of Trypan Blue*

The sample was analyzed after 48 hours of incubation at 3 and 6 $\mu\text{g/mL}$. Figure 2 showed a reduction on viable cell number (72.2% at 3 $\mu\text{g/mL}$ and 91.01% at 6 $\mu\text{g/mL}$) compared to the negative control. The number of non-viable cells after treatment with compound 2 at 6 $\mu\text{g/mL}$ and doxorubicin was increased.

3.4. Analysis of Cell Morphology - Colouring May – Grünwald – Giemsa

After 48h of incubation, negative control, (HL-60 cells not treated) exhibited typical non adhered cell morphology, such as round shape, intact nuclear and plasma membrane and the presence of mitotic cells (figure 2A). Cells treated with compound 2 exhibited morphological alterations consistent with apoptosis, including cell volume reduction, nuclear fragmentation and cell debris at both concentrations tested (3.0 $\mu\text{g/mL}$ and 6.0 $\mu\text{g/mL}$) (figure 2 C and 2 D respectively). At group treated with 6.0 $\mu\text{g/mL}$ it was observed the appearance of necrosis features, such as eosinophilia and loss of membrane integrity (Figure 2 D). Doxorubicin (0.03 $\mu\text{g/mL}$) induced reduction of cell volume, chromatin condensation and nuclear fragmentation in HL-60 cells, showing all characteristics that are consistent with apoptosis.

3.5. Analysis of membrane integrity and DNA Fragmentation By Flow cytometry

No DNA fragmentation or membrane damage was observed after treatment with compound 2 at 3 $\mu\text{g/mL}$. Otherwise after treatment with 6 $\mu\text{g/mL}$ there was increase 43.33% of DNA fragmentation (figure 3).

4. Discussion

The in vitro cytotoxic assay on three tumor cell lines (HL-60, K562- and NCI-H292) indicated that the six compounds showed excellent cell growth inhibition in at least one of the strains tested. The compounds tested showed the lowest IC_{50} values for HL-60 and K562 leukemic cell lines. The substance 2 was more active. Studies by Geronikaki et al, (2008) indicated that some derivatives thiazoles / thiazolidinones cause inhibition of SHP-2, a protein involved in signaling by growth

factors whose mutation causes its constitutive activation, which is present in some types of leukemias [15]. Also, Havrylyuk et al, (2009) Havrylyuk et al, (2010) and Wang et al, (2011) reported the in vitro cytotoxic activities of various derivatives 4-thiazolidinones in tumor cell lines of different histological types. Since compound 2 was the most active, this substance was chosen to continue the studies. Compound 2 did not cause lysis of erythrocytes of mice ($EC_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$) suggesting that the cytotoxic action of the compound is not related to direct damage to the cell plasma membrane and that possibly occurs by more specific mechanisms [9][10][11][14]. In fact, treatment of cells for short periods (24h) with the compound 2 did not cause a reduction in cell number. Only 48 hours after treatment was observed significant cytotoxicity, which was most pronounced after 72h of treatment, indicating that the action of the compound is time - dependent. The process of apoptotic cell death has some characteristics that are described by Kerr et al., at 1972, such as the reduction of cell volume, chromatin condensation, nuclear fragmentation without leakage of cell contents into the medium external. In this case, unlike what happens in necrosis, no inflammatory process occurs [16]. Thus, the term "apoptosis" must be applied only to cell death events that occur during the manifestation of these several morphological characteristics [17]. For this purpose, we proceeded the morphological analysis of treated cells by staining with May - Grunwald - Giemsa after 48 hours of treatment. Reduction of cell volume, chromatin fragmentation and some cellular debris were found. Analysis of DNA fragmentation and membrane integrity was performed by flow cytometry after treatment for 48 hours with the compound 2 that showed no significant damage of the cell membrane in any of the tested concentrations. Otherwise, DNA fragmentation was significantly enhanced compared to negative control after 48h treatment with $6 \mu\text{g/mL}$. The fact that no DNA fragmentation was observed in the concentration of the compound 2 with $3 \mu\text{g/mL}$ may suggest that this is initially causing cell cycle arrest prior to the occurrence of apoptosis, since it was observed a reduction in viable cells number accessed by trypan blue test. These results are consistent with findings made by the morphological staining May - Grunwald -

Giemsa and suggest that the cell death pattern of HL-60 cells treated with 4 - thiazolidinones derivative occurs by apoptosis.

The mechanism by which apoptosis cell death occurs is mainly by two signaling pathways, the intrinsic pathway or mitochondrial pathway and the extrinsic or death receptor. The intrinsic or mitochondrial pathway of apoptosis is triggered by intra and extra cellular stress. This pathway is mediated by Bcl-2 protein family which is divided into pro-apoptotic members such as Bax and Bak and as antiapoptotic Bcl-2 and Bcl-xL [18]. A work done by Degterev et al., 2001, indicated that derivatives containing the core 4-thiazolidinones bind to the binding site of the BH3 domain of anti apoptotic protein Bcl-xL, preventing its heterodimerization with proapoptotic members of the Bcl-2 family such as BAX or BAK, leaving them free to induce cells to apoptosis [19]. Finally, our findings to suggest the compound 2 derived from 4 - thiazolidinones as a promising molecule for further studies in drug development against cancer.

Acknowledgements

The authors acknowledge Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (CAPES) and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco - (FACEPE) for their financial support.

Tablet 1:

Hemolytic Potential Evaluation in murine erythrocytes and cytotoxicity of compound 2 on tumor cells by the MTT method after 72 h incubation. (IC₅₀) Concentration causing 50% growth inhibition and confidence interval (CI), Effective Concentration (EC₅₀).

Substances	HL-60 (IC₅₀)/CI	NCI – H (IC₅₀)/CI	K562 (IC₅₀)/CI	Murine erythrocytes (EC₅₀)
Compound 1	0.7 0.5-0.8	2.4 1.7-3.4	2.1 1.5-3.0	>250
Compound 2	0.5 0.4 – 0.7	3.3 2.6 – 4.1	0.3 0.1-0.9	>250
Compound 3	0.6 0.6-0.7	3.6 3.1- 4.2	0.6 0.4-0.8	nt
Compound 4	1.5 1.3-1.7	2.7 2.4-3.1	0.7 0.5-1.0	nt
Compound 5	2.0 1.5 – 2.5	9.7 7.6 – 12.3	0.11 0.09 - 0.11	>250
Compound 6	1.4 1.0 - 1.9	8.9 8.0 - 9.8	0.08 0.06 - 0.11	>250
Doxorrubicina	0.02 0.01 – 0.02	0.01 0.004-0.3	0.14 0.009 – 0.23	nt

nt – not tested

Table 2:

HL60 and K562 tumor cells in cytotoxicity by MTT method after 24, 48 and 72 h incubation. (IC₅₀) Concentration causing 50% growth inhibition, and (CI) confidence interval.

		Compound (2)		
		IC₅₀ (µg/mL)		
Time/ Cell lineage		24h	48h	72 h
HL-60	>25 µg/mL		3.0 2.2- 4.0	0.5 0.4 – 0.7
K562	25 µg/mL		7.8 6.8 - 8.9	0.3 0.1-0.9

Figure 1: Compounds and antiproliferative assay. **A)** Structure of the compounds of series 2-[(pyridine-2-ylmethylene)hydrazono]-thiazolidin-4-one and 5-benzylidene-2-[(pyridine-2-ylmethylene)hydrazono]-thiazolidin-4-one. **B)** Effect of compound (2) on the viability of cell line HL-60 determined by trypan blue test after 48 hours of incubation. The negative control was treated with vehicle (DMSO) for diluting the substances tested. Doxorubicin (0.03 $\mu\text{g/mL}$) was used as positive control. Bars represent the mean $\pm$ SE of three independent experiments. Values compared to the negative control by Analysis of Variance (ANOVA) followed by Tukey's test ($p < 0.05$).

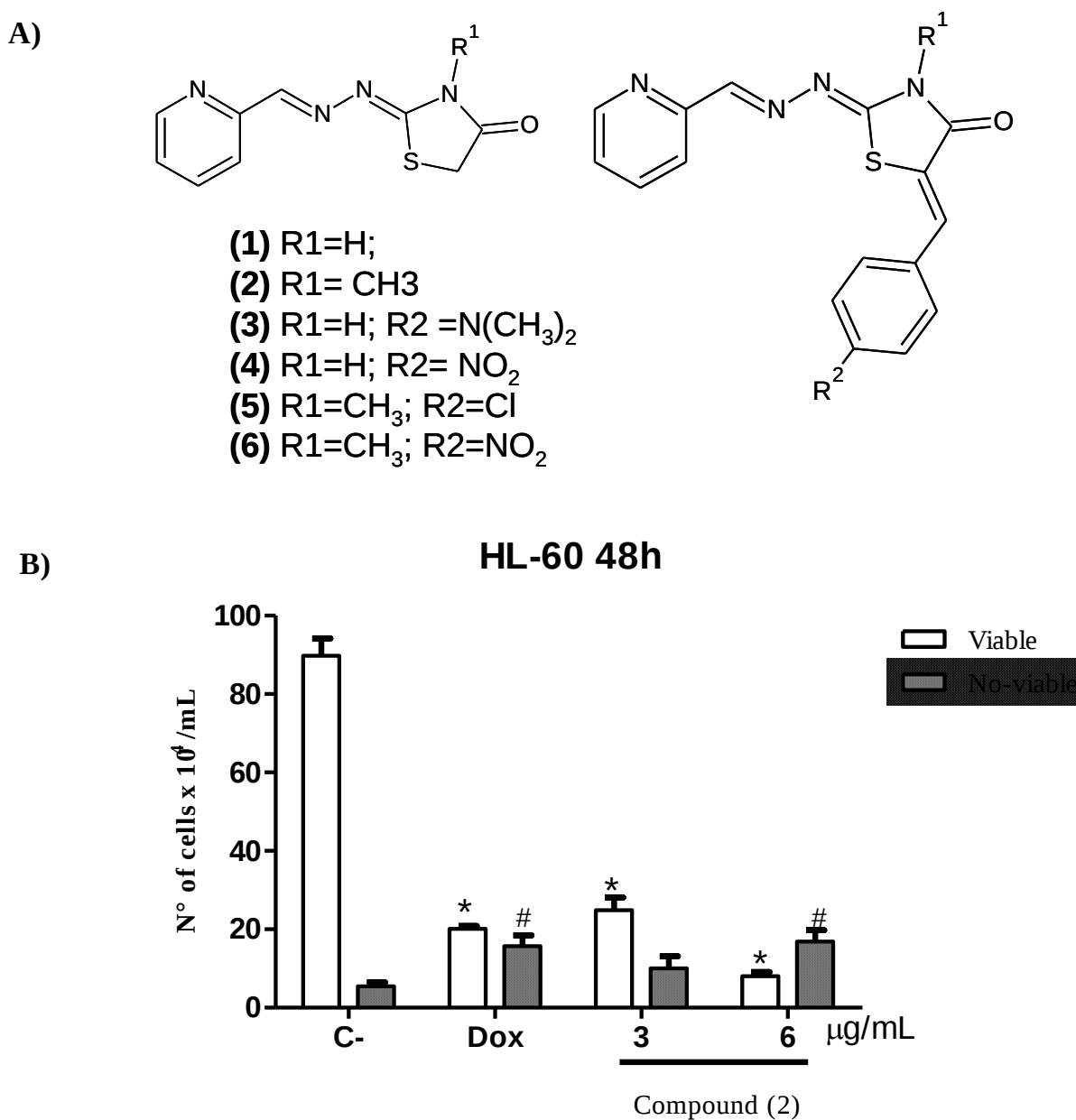
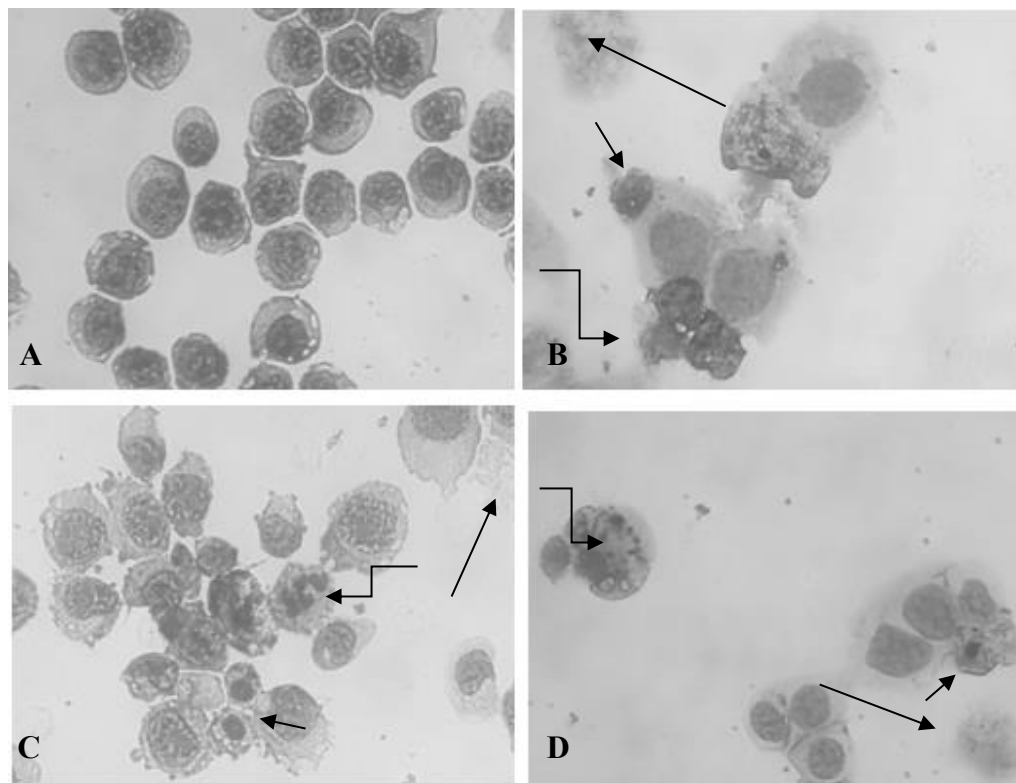
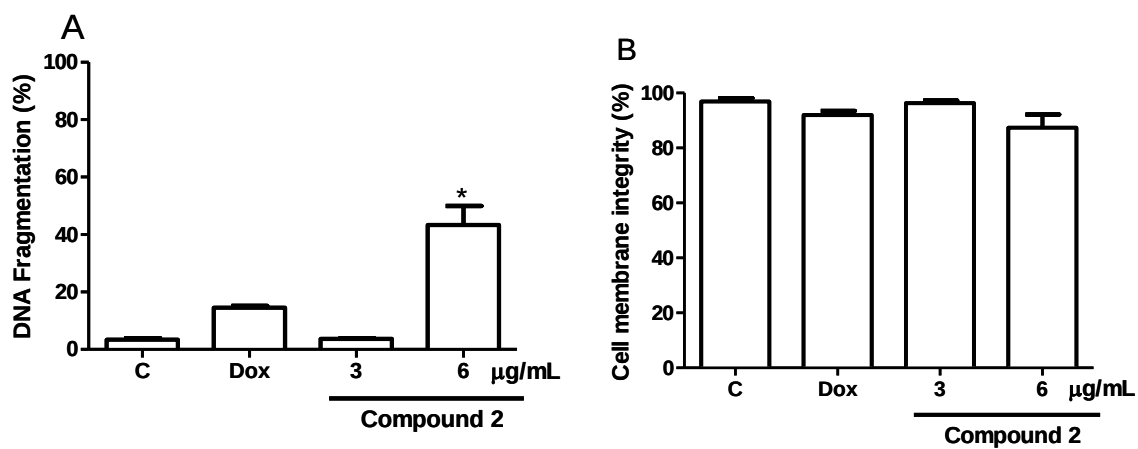


Figure 2: Microscopic analysis of morphology of HL-60 cells after 48 h of incubation, stained with May - Grunwald - Giemsa and viewed by light microscopy. (A) negative control treated only with the vehicle used to dilute the substances tested. (B) positive control treated with doxorubicin (0.03 mg / mL). (C) and (D) Cells treated with compound (2) concentrations of 3.0 mg / mL and 6.0 mg / mL respectively. The arrows indicate apoptotic aspect observed: (short arrows) reducing the volume, (curves arrows) nuclear fragmentation and (long arrows) cellular debris.



400X magnification MO

Figure 3: Flow cytometric analysis of compound 2 effects in HL-60 cells. A – DNA fragmentation was determined by nuclear fluorescence using propidium iodide, Triton X-100 and citrate, B – cell viability by the exclusion of propidium iodide.



REFERÊNCIAS

- [1] KAMINSKY, D., ZIMENKOVSKY, B., LESSYK, R. Synthesis and in vitro anticancer activity of 2,4- azolidinedione-acetic acids derivatives European Journal of Medicinal Chemistry v.44, p. 3627-3636, 2009.
- [2] ABHINIT, M., GHODKE, M., PRATIMA, N.A., Exploring Potencial of 4- thiazolidinone: A brief reiew. International Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 1, p. 47-64, 2009.
- [3] KUÇUKGUZEL, G.; KOCATEPE, A.; DE CLERCQ, E.; SAHIN, F.; GULLUCE, M. Synthesis and Biological Activity of 4- Thiazolidinones, Thiosemicarbazides Derived from Diflunisal Hydrazide. European Journal of Medicinal Chemistry, v. 41, p. 353-359, 2006.
- [4] VERÇOZA, G. L.; FEITOZA, D. D.; ALVES, A. J.; AQUINO, T. M.; LIMA, J. G.; ARAÚJO, J. M.; CUNHA, I. G. B.; GÓES, A. J. S. Síntese e avaliação da atividade antimicrobiana de novas 4- tiazolidinonas obtidas a partir de formilpiridina tiossemicarbazonas. Quim. Nova. v. 32, p.1405-1410, 2009.
- [5] ALLEN, S.; NEWHOUSE, B.; ANDERSON, A. S.; FAUBER, B.; ALLEN, A.; CHANTRY, D.; EBERHARDT, C.; ODING, J.; BURGESS, L. E. Discovery and SAR of trissubstituted Thiazolidinones as CCR4 Antagonist. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, v. 14, p.1619-1624, 2004.
- [6] KUÇUKGUZEL, S. G.; ORUÇ E. E.; ROLLAS S.; SAHIN F.; OZBEK A. Synthesis, characterisation and biological activity of novel 4-thiazolidinones, 1,3,4-oxadiazoles and some related compounds European Journal of Medicinal Chemistry v.37 p.197–206 2002.
- [7] FEITOZA, D. D.; ALVES, A. J.; LIMA, J. G.; ARÚJO, J. M.; AGUIAR, S. J.; RODRIGUES, M. D.; SILVA, T. G.; NASCIMENTO, S. C.; GÓES, A. J. S. Synthesis, antimicrobial and cytotoxic activities of 5-benzylidene-2-[(pyridine- 4-ylmethylene) hydrazono]-thiazolidin-4-one and 2-[(pyridine-4-ylmethylene) hydrazono]-thiazolidin-4-one derivatives . Quim. Nova. v. XY P. 1-5, 2012.
- [8] KAVITHA, C. V.; BASAPPA, C. S. A.; NANJUNDA, A. K. S.; MANTELINGU, A. S.; DORESWAMY, B. M. A.; SRIDHAR, B J.; PRASADB, S.; RANGAPPAA, K. S. Synthesis of new bioactive venlafaxine analogs: Novel thiazolidin-4-ones as antimicrobials. Bioorganic & Medicinal Chemistry v.14 p. 2290–2299, 2006.
- [9] WANG, S.; ZHAO, Y.; ZHANG, G.; LY, Y.; ZHANG, N.; GONG, P. Design, synthesis and biological evaluation of novel 4-thiazolidinones containing indolin-2-one moiety as potential antitumor agent. European Journal of Medicinal Chemistry, v 46, p. 3509-3518, 2011.
- [10] HAVRYLYUK, D.; ZIMENKOVSKY, B.; LESYK, R. Synthesis and Anticancer Activity of Novel Nonfused Bicyclic Thiazolidinone Derivatives. Phosphorus, Sulfur, and Silicon v. 184 p. 638-650, 2009.
- [11] HAVRYLYUK, D.; MOSULA, L.; ZIMENKOVSKY, B.; VASYLENKO, O.; GZELLA, A.; AND LESYK, R. Synthesis and anticancer activity evaluation of 4-thiazolidinones containing benzothiazole moiety. European Journal of Medicinal Chemistry v.45, p. 5012-5021, 2010.

- [12] ZHOU, H., WU, S., ZHAI, S., LIU, A., SUH, Y., LI, R., ZHANG, Y., EKINS, S., SWAAN, P. W., FANG, B., ZHANG, B., and YAN, B. Desing, Synthesis, Cytoselective Toxicity, Structure – Activity Relationships, and Pharmacophore of Thiazolidinones Derivatives Targeting Drug-Resistant Lung Cancer Cells. *J. Med. Chem.* v. 51, p.1242-1251, 2008.
- [13] GUIMARÃES NETO, E. A. G., ARAÚJO, J. M., RODRIGUES, M. D., SILVA, T. G., NASCIMENTO, S. C., MILITÃO, G. C. G., GÓES, A. J. S., LIMA, J., G., Synthesis, Cytotoxic and Antimicrobial activities of 5- benzylidene- 2 – [(pyridine-2-ylmethylene) hydrazono] thiazolin-4-one Derivatives. *Lat. Am. J. Pharm.*, v. 31, p. 235-239, 2012.
- [14] COSTA-LOTUFO, L.V.; CUNHA, G. M. A.; FARIAS, P. A. M.; VIANA, G. S. B.; CUNHA, K. M. A.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; GRAMOSA, N. V.; RAO, V. N. S. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. *Toxicon*, v. 40, p. 231–1234, 2002.
- [15] GERONIKAKI, A., ELEFThERIOU, P., VICINI, P., ALAM, I., DIXIT, A. and SAXENA, A. K., 2- Thiazolylimino/Heteroarylimino – 5 – aryldiene – 4- thiazolidinones as New Agents with SHP-2 Inhibitory Action. *J. Med. Chem.*, v. 51, p. 5221-5228, 2008.
- [16] KERR, J. F. R.; WYLLIE, A.H. AND CURRIE, A. R.; Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics *Br. J. Cancer* v.26, p. 239,1972.
- [17] KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, ES.; BAEHRECKE, EH.; BLAGOSKLONNY, MV.; EL-DEIRY, WS.; GOLSTEIN, P.; GREEN, DR.; HENGARTNER, M.; KNIGHT, RA.; KUMAR, S.; LIPTON, SA.; MALORNI, W.; NUÑEZ, G.; PETER, ME.; TSCHOPP, J.; YUAN. J.; PIACENTINI, M.; ZHIVOTOVSKY, B.; AND MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death, *Cell Death Differ.* 2009. v.16 (1), p. 3–11, 2009.
- [18] WEI, M. G, ZONG, W X., CHENG, E. H. Y., LINDSTEN, T., PANOUTSAKOPOULOU, V., ROSS, A. J., ROTH, K. A., MACGREGOR, G. R., THOMPSON, C. B. and KORSMEYER, J. S., Proapoptotic BAX and BAK: A Requisite Gateway to Mitochondrial Dysfunction and Death. *Science*, v. 292, p. 727-230, 2001.
- [19] DEGTEREV, A., LUGOVSKOY, A., CARDONE, M., MULLEY, B., WAGNER, G; MITCHISON, T. and YUAN, J., Identification of small- molecule inhibitors of interaction between the BH3 domain and Bcl-xL. *Nature Cell Biology*, v. 3, p. 173-182, 2001.

6. CONCLUSÕES GERAIS

A avaliação antimicrobiana indicou que novos derivados 4- tiazolidinonas da classe 5- benzilideno -2 - [piridina-2-ilmetileno) hydrazona] - tiazolidina - 4 - ona apresentaram considerável atividade antibiótica. Seis destes novos derivados 4 - tiazolidinonas demonstraram atividade citotóxica frente às linhagens de câncer HL-60, K562, NCI-H 292, HT-29 e HEp-2. Os melhores resultados foram observados no composto 2, apresentando os menores valores de CI_{50} para as linhagens de leucemia. Os compostos 1, 2, 3 e 4 são moléculas promissoras por apresentar maior efeito antiproliferativo que os apresentados pelo etoposide, substância utilizada como padrão. Os compostos 1, 2, 5 e 6 não apresentaram atividade hemolítica em eritrócitos murinos indicando que a morte celular ocorreu por mecanismos mais específicos. Também foi observado que quando testado frente às células de leucemia HL-60 o composto 2 apresentou características morfológicas condizentes com o processo de morte celular por apoptose.

Diante destes resultados, estudos posteriores deverão ser realizados para a análise da expressão dos genes envolvidos na morte celular por apoptose a fim de investigar por qual via este processo ocorre.

ANEXO

Normas da Revista Anticancer Research

Escopo e Política

Instructions to Authors

General Policy

ANTICANCER RESEARCH (AR) will accept original high quality works and reviews on all aspects of experimental and clinical cancer research. The Editorial Policy suggests that priority will be given to papers advancing the understanding of cancer causation, and to papers applying the results of basic research to cancer diagnosis, prognosis, and therapy. AR will also accept the following for publication: (a) Abstracts of scientific meetings on cancer, following consideration and approval by the Editorial Board; (b) Announcements of meetings related to cancer research; (c) Short reviews (of approximately 120 words) and announcements of newly received books and journals related to cancer, and (d) Announcements of awards and prizes.

The principal aim of AR is to provide for the prompt publication of original works of high quality, generally within 1-2 months from final acceptance. Manuscripts will be accepted on the understanding that they report original unpublished works on the cancer problem that are not under consideration for publication by another journal, and that they will not be published again in the same form. All material submitted to AR will be subject to review, when appropriate, by two members of the Editorial Board and by one suitable outside referee.

The Editors reserve the right to improve manuscripts on grammar and style. The Editors and Publishers of AR accept no responsibility for the contents and opinions expressed by the contributors. Authors should warrant due diligence in the creation and issuance of their work.

NIH Open Access Policy

The journal acknowledges that authors of NIH funded research retain the right to provide a copy of the final manuscript to the NIH four months after publication in ANTICANCER RESEARCH, for public archiving in PubMed Central.

Copyright

Once a manuscript has been published in ANTICANCER RESEARCH, which is a copyrighted publication, the legal ownership of all published parts of the paper has passed from the Author(s) to the journal. Material published in the journal may not be reproduced or published elsewhere without written consent of the Managing Editor.

Format

Two types of papers may be submitted: (i) Full papers containing completed original work, and (ii) short papers. Additionally, the Editors may invite review articles concerning fields of recognisable progress. Papers should contain all essential data in order to make the presentation clear. Reasonable economy should be exercised with respect to the number of tables and illustrations

used. Papers should be written in clear, concise English. Spelling should follow that given in the "Shorter Oxford English Dictionary".

Manuscripts

Submitted manuscripts should not exceed fourteen (14) pages (approximately 250 words per double - spaced typed page), including abstract, text, tables, figures, and references (corresponding to 4 printed pages). Papers exceeding four printed pages will be subject to excess page charges. All manuscripts should be divided into the following sections:

- (a) First page including the title of the presented work [not exceeding fifteen (15) words], full names and full postal addresses of all Authors, name of the Author to whom proofs are to be sent, key words, an abbreviated running title, an indication "clinical", "epidemiological", or "experimental" study, and the date of submission. *(Note: The order of the Authors is not necessarily indicative of their contribution to the work. Authors may note their individual contribution(s) in the appropriate section(s) of the presented work.)*
- (b) Abstract not exceeding 150 words, organized according to the following headings: Background/Aim - Materials and Methods/Patients and Methods - Results - Conclusion
- (c) Introduction
- (d) Materials and Methods/Patients and Methods
- (e) Results
- (f) Discussion
- (g) Acknowledgements
- (h) References

All pages must be numbered consecutively. Footnotes should be avoided. Review articles may follow a different style according to the subject matter and the Author's opinion. Review articles should not exceed 35 pages (approximately 250 words per double-spaced typed page) including all tables, figures, and references.

Figures

All figures (whether photographs or graphs) should be clear, high contrast, glossy prints of the size they are to appear in the journal: 8.00 cm (3.15 in.) wide for a single column; 17.00 cm (6.70 in.) for a double column; maximum height: 20.00 cm (7.87 in.). Graphs must be submitted as photographs made from drawings and must not require any artwork, typesetting, or size modifications. Symbols, numbering and lettering should be clearly legible. The number and top of each figure must be indicated on the reverse side. Original karyotypes and photographs should be provided wherever possible, and not photographic copies. Colour plates are charged.

Tables

Each table should be submitted on a separate page, typed double-spaced. Tables should be numbered with Roman numerals and should include a short title.

Nomenclature and Abbreviations

Nomenclature should follow that given in "Chemical Abstracts". Standard abbreviations will be preferable. If a new abbreviation is used, it must be defined at its first usage.

References

Citations for the reference sections of submitted works should follow the standard form of "Index Medicus" and must be numbered consecutively. In the text, references should be cited by number. Examples:

1 Sumner AT: The nature of chromosome bands and their significance for cancer research. *Anticancer Res* 1: 205-216, 1981.

2 McGuire WL and Chamnes GC: Studies on the oestrogen receptor in breast cancer. *In: Receptors for Reproductive Hormones* (O' Malley BW, Chamnes GC (eds.). New York, Plenum Publ Corp., pp 113-136, 1973.

Clinical Trials

Authors of manuscripts describing clinical trials should provide the appropriate clinical trial number in the correct format in the text.

For International Standard Randomised Controlled Trials (ISRCTN) Registry (a not-for-profit organization whose registry is administered by Current Controlled Trials Ltd.) the unique number must be provided in this format: ISRCTNXXXXXXXX (where XXXXXXXX represents the unique number, always prefixed by 'ISRCTN'). Please note that there is no space between the prefix 'ISRCTN' and the number. Example: ISRCTN47956475.

For Clinicaltrials.gov registered trials, the unique number must be provided in this format: NCTXXXXXXXX (where XXXXXXXX represents the unique number, always prefixed by 'NCT'). Please note that there is no space between the prefix 'NCT' and the number. Example: NCT00001789.

Submission of Manuscripts

Follow the Instructions to Authors regarding the format of your manuscript and references. There are 3 ways to submit your article (NOTE: PLEASE USE ONLY ONE OF THE ABOVE OPTIONS. DO NOT SUBMIT YOUR ARTICLES TWICE. IN CASE YOUR SUBMISSION IS NOT COMPLETE, YOU WILL BE NOTIFIED ACCORDINGLY.):

1. To submit your article online please visit: [IIAR-Submissions](#).
2. You can send your article via e-mail to journals@iiar-anticancer.org. Please remember to always indicate the name of the journal you wish to submit your paper. The text should be sent as a Word document (*.doc) attachment. Tables, figures and cover letter can also be sent as e-mail attachments.
3. You can send the manuscript of your article via regular mail in a USB stick, DVD, CD or floppy disk (including text, tables and figures) together with three hard copies of your manuscript to the following address:

John G. Delinassios

International Institute of Anticancer Research (IIAR)

Editorial Office of ANTICANCER RESEARCH, IN VIVO, and

CANCER GENOMICS & PROTEOMICS

1st km Kapandritiou-Kalamou Road

P.O. Box 22, GR-19014 Kapandriti, Attiki

GREECE

Submitted articles will not be returned to Authors upon rejection.

Galley Proofs

Unless otherwise indicated, galley proofs will be sent to the first-named Author of the submission. Corrections of galley proofs should be limited to typographical errors.

Reprints

Twenty-five copies of each communication will be provided free of charge. Additional copies or PDF files may be ordered after the acceptance of the paper. Requests for additional reprints should be addressed to the Editorial Office.

Specific information about publishing in Anticancer Research and additional instructions to Authors.

1. Anticancer Research (AR) closely follows the new developments in all fields of experimental and clinical cancer research by (a) inviting reviews on topics of immediate importance and substantial progress in the last three years, and (b) providing the highest priority for rapid publication to manuscripts presenting original results judged to be of exceptional value. Theoretical papers will only be considered and accepted if they bear a significant impact or formulate existing knowledge for the benefit of research progress.
2. Anticancer Research will consider the publication of conference proceedings and/or abstracts provided that the material submitted fulfills the quality requirements and instructions of the journal, following the regular review process by two suitable referees.
3. An acknowledgement of receipt, including the article number, title and date of receipt is sent to the corresponding author of each manuscript upon receipt. If this receipt is not received within 20 days from submission, the author should call or write to the Editorial Office to ensure that the manuscript (or the receipt) was not lost in the mail.
4. Each manuscript submitted to AR is sent for review in confidence to two suitable referees with the request to return the manuscript with their comments to the Editorial Office within 12 days from receipt. If reviewers need a longer time or wish to send the manuscript to another expert, the manuscript may be returned to the Editorial Office with a delay. All manuscripts submitted to AR, are treated in confidence, without access to any person other than the Managing Editor, the journal's secretary, the reviewers and the printers.
5. All accepted manuscripts are peer-reviewed and carefully corrected in style and language, if necessary, to make presentation clear. (There is no fee for this service). Every effort is made (a) to maintain the personal style of the author's writing and (b) to avoid change of meaning. Authors will

be requested to examine carefully manuscripts which have undergone language correction at the pre-proof or proof stage.

6. Authors should pay attention to the following points when writing an article for AR:

- The Instructions to Authors must be followed in every detail.
- The presentation of the experimental methods should be clear and complete in every detail facilitating reproducibility by other scientists.
- The presentation of results should be simple and straightforward in style. Results and discussion should not be combined into one section, unless the paper is short.
- Results given in figures should not be repeated in tables.
- Figures (graphs or photographs) should be prepared at a width of 8 or 17 cm with legible numbers and lettering.
- Photographs should be clear glossy prints of high contrast, presenting the actual observation described in the legend and in the text. Each legend, should provide a complete description, being self-explanatory, including technique of preparation, information about the specimen and magnification.
- Statistical analysis should be elaborated wherever it is necessary. Simplification of presentation by giving only numerical or % values should be avoided.
- Fidelity of the techniques and reproducibility of the results, should be points of particular importance in the discussion section. Authors are advised to check the correctness of their methods and results carefully before writing an article. Probable or dubious explanations should be avoided.
- Authors should not cite results submitted for publication in the reference section. Such results may be described briefly in the text with a note in parenthesis (submitted for publication by... authors, year).
- The Reference section should provide as complete a coverage of the literature as possible including all the relevant works published up to the time of submission.
- By following these instructions, Authors will facilitate a more rapid review and processing of their manuscripts and will provide the readers with concise and useful papers.

7. Following review and acceptance, a manuscript is examined in language and style, and galley proofs are rapidly prepared. Proofs of articles accepted for urgent publication may be sent to Author(s) without pre-correction, thus they may contain a higher than usual number of printing errors. Second proofs are not sent unless required.

8. Authors should correct their galley proofs very carefully and preferably twice. An additional correction by a colleague always proves to be useful. Particular attention should be paid to chemical formulas, mathematical equations, symbols, medical nomenclature etc. Any system of correction marks can be used in a clear manner, preferably with a red pen. Additions or clarifications are allowed provided that they improve the presentation but do not bring new results (no fee).

9. Articles submitted to AR may be rejected without review if:

- they do not fall within the journal's policy.
- they do not follow the instructions to authors.
- language is unclear.
- results are not objectively based on valid experiments.
- they repeat results already published by the same or other authors before the submission to AR.
- Rejection rate (2002): 64%

Submitted articles will not be returned to Authors upon rejection.

10. Authors who wish to prepare a review should contact the Managing Editor of the journal in order to get confirmation of interest in the particular topic of the review and to allow programming of space availability. The expression of interest by the Managing Editor does not necessarily imply acceptance of the review by the journal.

11. Authors may inquire information about the status of their manuscript(s) by calling the Editorial Office at +30-22950-53389, Monday to Friday 9.00-16.00 (Athens time), or by sending an e-mail to journals@iiar-anticancer.org.

12. Reprints of published articles are usually delivered to the corresponding Author, within 1 month after publication.

13. Authors who wish to edit a special issue on a particular topic should contact the Managing Editor.

14. Authors, Editors and Publishers of books are welcome to submit their books for immediate review in AR. There is no fee for this service.

(This text is a combination of advice and suggestions contributed by Editors, Authors, Readers and the Managing Editor of AR).

Copyright © 2009 - International Institute of Anticancer Research (J.G. Delinassios). All rights reserved (including those of translation into other languages). No part of this journal may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitter in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, microfilming, recording or otherwise, without written permission from the Publisher.